

Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



**Dissertation**

**Die Aufklärung der Tertiärstruktur des antimikrobiellen Peptids  
Hydramacin-1 mit Hilfe der mehrdimensionalen heteronuklearen  
NMR-Spektroskopie und die Untersuchung seines  
Wirkmechanismus**



von

**Sascha Jung**



**Die Aufklärung der Tertiärstruktur des antimikrobiellen Peptids  
Hydramacin-1 mit Hilfe der mehrdimensionalen heteronuklearen  
NMR-Spektroskopie und die Untersuchung seines  
Wirkmechanismus**

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

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur Sascha Jung

Kiel  
2008

## Summary

Recently, a new antimicrobial peptide, hydramacin-1, has been discovered in the fresh water polyp *Hydra magnipapillata*. Hydramacin-1 participates in the polyp's epithelial defense by exhibiting strong bactericidal activity at micromolar concentrations. To characterize the antibacterial mode of action of hydramacin-1, the tertiary solution structure of the protein was determined using multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy. In addition, the interaction of hydramacin-1 with liposomes and bacteria was investigated. As a prerequisite for structure/activity studies, a protocol for the recombinant production of hydramacin-1 using a bacterial over-expression system and a purification protocol was established.

The three-dimensional structure of hydramacin-1 possesses a disulfide-bridge stabilized  $\alpha/\beta$ -motif which is characteristic for the knottin-protein fold. Comparison with proteins of the same protein fold showed that hydramacin-1 has the highest homology to the scorpion-toxin like protein superfamily. This superfamily already has five protein families. Due to the substantial sequence and structural differences to representative members of the five families, hydramacin-1 represents the founding member of a new protein family that has been named macins.

Investigation of the interaction of hydramacin-1 with liposomes and bacteria revealed a membrane precipitation mechanism for activity. Based on the solution structure of hydramacin-1 a model explaining this cell/liposome precipitation effect is presented. Hydramacin-1 possesses two hydrophobic hemispheres which sandwich a band of positively charged residues. The two hemispheres of the peptide immerse into the outer leaflets of two membranes of different liposomes or bacteria. Thereby, the band of positively charged residues of hydramacin-1 stabilizes the interface between the two-membrane-peptide complexes by interaction with the negative surface charges of the polar head groups of the two membranes. This leads to the progressive formation of aggregates of liposomes or bacteria. Currently, a comparable model has not been described for the action of antimicrobial proteins. Therefore, the model explaining the mode of action of hydramacin-1 extends our knowledge of mechanisms of antimicrobial peptides.

## Zusammenfassung

Die Untersuchung der epithelialen Abwehr des Süßwasserpolyphen *Hydra magnipapillata* führte zur Entdeckung eines neuen, hochaktiven antimikrobiellen Peptids, Hydramacin-1. Dieses tötet Gram-negative und Gram-positive Bakterien im mikromolaren Konzentrationsbereich. Um den Wirkmechanismus von Hydramacin-1 zu charakterisieren, wurde in der vorliegenden Arbeit seine Tertiärstruktur mit Hilfe der mehrdimensionalen heteronuklearen NMR-Spektroskopie aufgeklärt sowie seine Interaktion mit Liposomen und Bakterien untersucht. Dazu erfolgte zunächst die Etablierung eines Protokolls für die rekombinante Herstellung des Peptids in Bakterien und seine Reinigung.

Die Tertiärstruktur des Hydramacin-1 zeigt ein Disulfidbrücken-stabilisiertes  $\alpha/\beta$ -Strukturmotiv, welches für die sogenannte Knottin-Faltungstopologie charakteristisch ist. Der Vergleich mit den Knottin-Proteinen zeigt, dass Hydramacin-1 zur Superfamilie der Skorpionotoxin-ähnlichen Proteine die höchste Strukturhomologie besitzt. In dieser Superfamilie gibt es bereits fünf Familien. Dennoch weist Hydramacin-1 im Vergleich mit jeweils einem Repräsentanten aus jeder Familie maßgebliche Sequenz- und Strukturunterschiede auf. Hydramacin-1 ist daher das erste Mitglied einer neuen Familie innerhalb der Superfamilie der Skorpionotoxin-ähnlichen Proteine, die fortan als *Macin*-Familie bezeichnet wird.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Interaktion von Hydramacin-1 mit Liposomen und Bakterien zeigen, dass dieses Peptid in der Lage ist, sowohl Liposomen als auch Bakterien zu präzipitieren. Mit der Kenntnis der Tertiärstruktur von Hydramacin-1 konnte ein Modell formuliert werden, welches diesen Präzipitationseffekt erklärt: Hydramacin-1 besitzt zwei hydrophobe Hemisphären, welche durch ein Band aus kationischen Aminosäureresten voneinander getrennt sind. Die beiden Hemisphären des Peptids insertieren in die jeweils äußere Lipidschicht der Membranen zweier Liposomen oder Bakterien. Der so gebildete zwei-Membranen-Peptid-Komplex wird dabei durch das Band aus kationischen Aminosäureresten stabilisiert, welches in Wechselwirkung mit den negativen Oberflächenladungen der Membranen tritt. Infolge der fortschreitenden Vernetzung vieler verschiedener Liposomen beziehungsweise Bakterienzellen, bilden diese immer größer werdende Aggregate. Ein vergleichbares Modell wurde bisher noch nicht beschrieben und erweitert somit den Kenntnisstand über die Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Summary .....</b>	<b>2</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Antimikrobielle Peptide – Ein Überblick .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Vielfalt der antimikrobiellen Peptide .....	7
1.1.2 Wirkmechanismen von antimikrobiellen Peptiden .....	8
1.1.3 Die epitheliale Abwehr von Hydra .....	10
<b>1.2 Aufklärung der Tertiärstruktur von Proteinen.....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie .....	12
1.2.2 Mehrdimensionale heteronukleare NMR-Spektroskopie.....	14
<b>1.3 Zielsetzung.....</b>	<b>16</b>
<b>2 Materialien und Methoden .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Verwendete Medien, Lösungsmittel und Puffer .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Durchführung der Versuche.....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Klonierung.....	24
2.2.2 Transformation.....	25
2.2.3 Expression .....	25
2.2.4 Proteinreinigung.....	26
2.2.4.1 ZELLAUFSCHLUSS UND WASCHEN DER EINSCHLUSSKÖRPER.....	26
2.2.4.2 IMMOBILISIERTE-METALL-AFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE.....	26
2.2.4.3 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION .....	27
2.2.4.4 DISKONTINUIERLICHE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE.....	27
2.2.4.5 RENATURIERUNG .....	28
2.2.4.6 PROTEOLYTISCHE SPALTUNG .....	28
2.2.4.7 GRADIENTEN-RP-HPLC UND LYOPHILISATION .....	28
2.2.5 Circular dichroismus-Spektroskopie .....	29
2.2.6 Massenspektrometrie zur Analyse der intramolekularen Disulfidverknüpfung .....	30
2.2.7 Mehrdimensionale gepulste Fourier-Transform-NMR-Spektroskopie.....	30
2.2.7.1 DURCHFÜHRUNG DER EXPERIMENTE .....	31

2.2.7.2	<i>SEQUENZSPEZIFISCHE ZUORDNUNG</i> .....	32
2.2.7.3	<i>ZUORDNUNG STRUKTURELEVANTER NMR-SIGNALE</i> .....	32
2.2.8	<i>Strukturberechnung</i> .....	32
2.2.9	<i>Untersuchung des Wirkmechanismus</i> .....	33
2.2.9.1	<i>HERSTELLUNG VON LIPOSOMEN</i> .....	33
2.2.9.2	<i>UNTERSUCHUNG DER SEKUNDÄRSTRUKTUR VON HYDRAMACIN-1 IN GEGENWART VON LIPOSOMEN MIT HILFE DER CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE</i> .....	34
2.2.9.3	<i>UNTERSUCHUNG DES EINTAUCHENS VON HYDRAMACIN-1 IN DIE MEMBRAN VON LIPOSOMEN MIT HILFE DER FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE</i> .....	34
2.2.9.4	<i>UNTERSUCHUNG DER AGGREGATION VON LIPOSOMEN MIT HILFE DER FLUORESZENZMIKROSKOPIE</i> .....	35
2.2.9.5	<i>UNTERSUCHUNG DER AGGREGATION VON BAKTERIEN MIT HILFE DER LICHTMIKROSKOPIE</i> .....	35
2.2.9.6	<i>UNTERSUCHUNG DER AGGREGATION VON BAKTERIEN MIT HILFE DER ELEKTRONENMIKROSKOPIE</i> .....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
3.1	<b>Expression, Proteinreinigung und Sekundärstrukturanalyse</b> .....	<b>39</b>
3.2	<b>Tertiärstruktur von Hydramacin-1</b> .....	<b>43</b>
3.3	<b>Vergleich der Tertiärstrukturen von Hydramacin-1 und Repräsentanten der Skorpionotoxin-ähnlichen Proteinsuperfamilie</b> .....	<b>65</b>
3.4	<b>Wechselwirkung von Hydramacin-1 mit Modellmembranen</b> .....	<b>67</b>
3.5	<b>Wechselwirkung von Hydramacin-1 mit Bakterien</b> .....	<b>71</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>76</b>
<b>5</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>82</b>
	Abkürzungen .....	83
	Literaturverzeichnis .....	85
	Lebenslauf .....	92
	Publikationen und Poster .....	93
	Danksagung .....	94
	Erklärung .....	96

# 1 Einleitung

Als Sir Alexander Fleming 1945 für die Entdeckung des Penicillins den Nobelpreis für Medizin überreicht bekam, warnte er davor, dass Bakterien durch einen unbedachten Umgang mit Antibiotika gegen diese resistent werden können [1]. Nur wenige Jahre darauf bewahrheitete sich diese Warnung. Bereits ein Jahr nach der weltweiten Einführung von Penicillin wurden erste Penicillin-resistente Bakterienstämme entdeckt [2]. Seither besteht ein Wettkampf zwischen Mensch und pathogenen Mikroorganismen, in welchem die Suche des Menschen nach neuen Antibiotika der enormen Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen gegenübersteht [3].

Auf Grund der wachsenden Zahl resistenter Bakterienstämme gegenüber konventionellen Antibiotika und insbesondere wegen des Erscheinens von multiresistenten Stämmen, sind in den letzten Jahren die sogenannten antimikrobiellen Peptide (AMPs) immer weiter in den Vordergrund gerückt [4]. Sie töten Mikroorganismen mittels weit weniger speziellen Strategien, indem sie als Primärziel mit deren Membran in Wechselwirkung treten und diese zerstören [5, 6]. Die Erlangung einer Resistenz gegenüber AMPs würde eine grundlegende Änderung der Zusammensetzung der Zellmembran erfordern [7]. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist jedoch durch die vielseitigen Anforderungen an die Eigenschaften einer Zellmembran sehr gering, da eine derartige Änderung mit dem Überleben nicht vereinbar ist. AMPs sind somit der neue Hoffnungsträger der Medizin im Kampf gegen pathogene Mikroorganismen.

## 1.1 Antimikrobielle Peptide – Ein Überblick

Das Gewebe multizellulärer Organismen stellt eine reichhaltige Nahrungsquelle für Mikroorganismen dar [8]. Deshalb haben vielzellige Lebewesen epitheliale Abwehrsysteme entwickelt um nicht vollständig von Parasiten befallen oder verdaut zu werden [8, 9].

Antimikrobielle Peptide partizipieren als Teil des angeborenen Immunsystems an der ersten Abwehrreaktion eines Vielzellers gegenüber einer Infektion, beispielsweise mit Bakterien, Pilzen oder auch Viren [10]. Sie sind aus Sicht der Evolution sehr alt und ihre Gene in vielen verschiedenen vielzelligen Organismen konserviert. Damit widersprechen sie der allgemeinen Vorstellung, dass Mikroorganismen scheinbar gegenüber jeder erdenklichen Substanz eine Resistenz entwickeln könnten [6].

Die nachfolgenden Abschnitte geben zunächst einen Überblick über die Vielfalt der bisher bekannten AMPs. Des Weiteren werden die verschiedenen Wirkmechanismen, welche die antimikrobielle Aktivität der Peptide erklären, vorgestellt. Abschließend wird auf die AMPs als Teil der epithelialen Abwehr des Süßwasserpolyyps *Hydra* eingegangen.

### 1.1.1 Vielfalt der antimikrobiellen Peptide

Die ersten publizierten AMPs waren die Cecropine A und B im Jahr 1980 [11, 12]. Seitdem ist die Anzahl der entdeckten AMPs stark angestiegen. Mittlerweile sind weit über 800 verschiedene Peptide in der *Antimicrobial Data Base* (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>; Stand 06. Mai 2008) hinterlegt worden [13].

Es gibt verschiedene Ansätze um AMPs zu gruppieren. Diese sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Möglichkeiten der Unterteilung von AMPs [4, 6, 14, 15].**

Gruppierungsmerkmal	Beispiel
Anzahl, Anordnung sowie intramolekulare Verknüpfung vorhandener Cysteine	Bactenecin 1, Protegrin 1, Defensine
Positive oder negative Oberflächennettoladung	Cecropine, Dermicidin
Amphiphiler Charakter	Magainin, Cecropine
Abstammung von einem gemeinsamen Vorläufermolekül	Cathelicidine, Buforin 2
Erhöhter Gehalt bestimmter Aminosäuren	Prophenine, Indolicidine, Histatine
Nicht-/Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen	Magainin, Defensine

Einige der in Tabelle 1 genannten Merkmale treten häufig gekoppelt auf, so dass AMPs in verschiedenen wissenschaftlichen Rezensionen in folgende zwei Gruppen unterteilt werden: Peptide mit einer überwiegenden  $\beta$ -Faltblattstruktur und zwei bis vier intramolekularen Disulfidverknüpfungen sowie  $\alpha$ -helikale Peptide mit amphiphilem Charakter [6, 14, 16]. Des Weiteren lassen sich AMPs auch anhand ihrer Tertiärstruktur unterteilen. Man unterscheidet vier Klassen:  $\beta$ -Faltblatt-Peptide,  $\alpha$ -helikale Peptide, Schleifen-Peptide und *extended peptides* [17]. Letztere besitzen in Abwesenheit einer Zielmembran eine lineare, flexible Konformation und beinhalten keine Sekundärstrukturelemente. Diese werden erst durch die Wechselwirkung mit Lipiden der Zielmembran gebildet.

Neben dem heterogenen Erscheinungsbild der AMPs zeigen sich auch starke Abweichungen bei den jeweiligen Wirkungsspektren. Bis heute existieren jedoch nur wenige Modelle um die Wirkungsweise der AMPs zu erklären.

### **1.1.2 Wirkmechanismen von antimikrobiellen Peptiden**

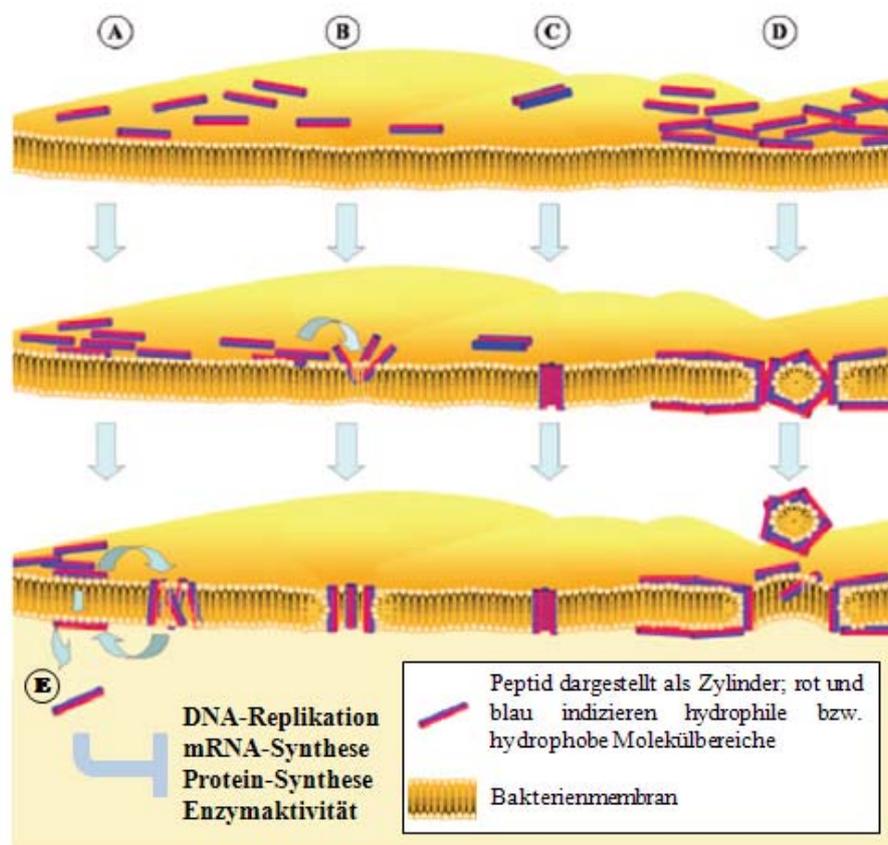
Die meisten AMPs besitzen eine positive Nettoladung oder amphiphile Ladungsverteilung auf ihrer Oberfläche [14]. Die elektrostatische Wechselwirkung mit den negativ-geladenen Bestandteilen der mikrobiellen Zielmembran ermöglicht die Anlagerung der AMPs, was bei allen Mechanismen den initialen Schritt darstellt [5, 14]. Die auf die initiale Anlagerung folgenden Schritte, welche zu einer Permeabilisierung der betroffenen Membran führen, sind am besten für die Wechselwirkung von AMPs mit der Membran von Bakterien verstanden [6]. Anhand dieser wurden vier Modelle entwickelt [16].

Das *aggregate model* (Abb. 1A) beschreibt die Ausbildung von mizellenähnlichen Zusammenlagerungen von Peptiden und Membranlipiden, wobei die Peptide keine Vorzugsorientierung im Bezug auf die Membranebene vorweisen [16]. Die Aggregate führen zur Bildung von ungleichförmigen Kanälen, welche in Größe und Halbwertszeit variieren. Die Kanäle können sowohl eine Membranpermeabilisierung bewirken als auch eine Translokation von Peptiden durch die Membran, wenn die Aggregate zerfallen. Hingegen beschreibt das *toroidal pore model* (Abb. 1B) die Ausbildung einer Pore. Diese ist aus den senkrecht zur Membranebene orientierten Peptiden selbst und den reorientierten Kopfgruppen benachbarter Membranlipide zusammengesetzt [16]. Letztere sind zum Lumen der Pore exponiert. Im *barrel-stave model* (Abb. 1C) bilden die Peptide ebenfalls transmembrane Poren [16]. Diese bestehen jedoch ausschließlich aus AMP-Oligomeren, wobei die hydrophilen Moleküloberflächen der Peptide zum Lumen der Pore gerichtet sind. Die hydrophoben Moleküloberflächen werden hingegen zum hydrophoben Kern der Membran exponiert. Das *carpet model* (Abb. 1D) beschreibt die lokal konzentrierte Anordnung von Peptidaggregaten an der Zielmembran [16]. Dabei werden die jeweiligen Membranbereiche, wie durch einen Teppich, abgedeckt. Nach Erreichen einer Schwellenkonzentration kommt es zu einem detergenzähnlichen Effekt. Dieser kann dazu führen, dass sich die Membranlipide zu Mizellen zusammenlagern, welche sich daraufhin von der Membran lösen und in dieser ein Loch zurücklassen.

Die in den vier Modellen beschriebenen Wechselwirkungen zwischen AMPs und Membran führen letztendlich zu einer Störung der Integrität beziehungsweise der Funktion der

Membran [6]. Infolge dessen kann es zu einer Membrandepolarisierung oder zum Ausströmen des Zellinhaltes kommen, was zum Tod der Zellen führt.

Neben den zur Membranpermeabilisierung führenden AMPs existieren weitere, welche ihre Zielzellen auf anderem Wege töten [16]. Ihr Mechanismus beginnt ebenfalls mit der initialen Anlagerung an die Zielmembran. Darauf folgt eine Translokation der Peptide ins Cytosol. Dort angelangt, können die Peptide überlebenswichtige zelluläre Prozesse, wie die Synthese von Nukleinsäuren, Proteinen oder auch die Aktivität essentieller Enzyme, stören (Abb. 1E).

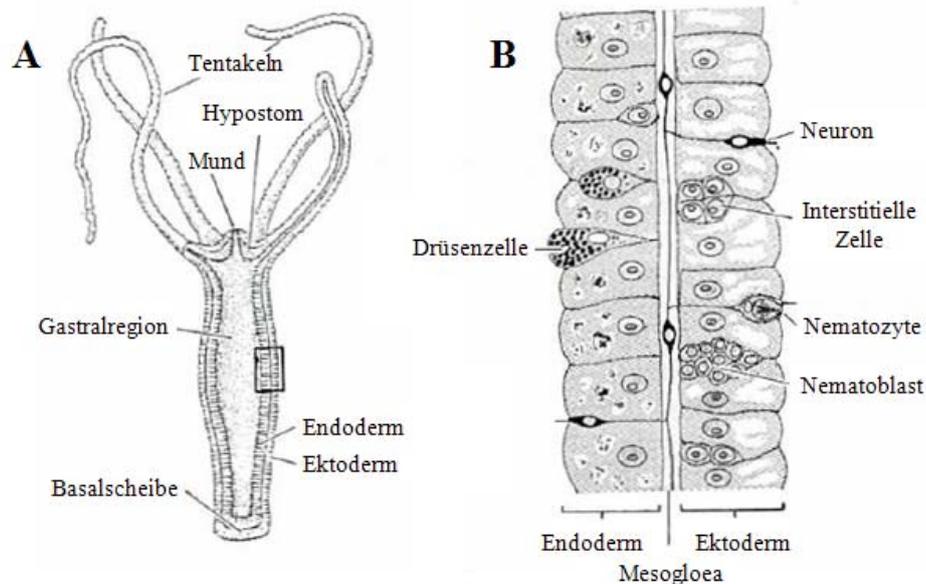


**Abbildung 1: Modelle der Wirkmechanismen von antibakteriellen Peptiden.**

(A) *aggregate model*. (B) *toroidal pore model*. (C) *barrel-stave model*. (D) *carpet model*. (E) Störung überlebenswichtiger zellulärer Prozesse (Aus: Jenssen et al. [16], mit freundlicher Genehmigung; verändert).

### 1.1.3 Die epitheliale Abwehr von *Hydra*

Der phylogenetisch sehr alte Vielzeller *Hydra* gehört zum Stamm der Nesseltiere, welcher sich bereits vor 500 Millionen Jahren entwickelte [18]. Dieser Süßwasserpolyt besitzt ausschließlich zwei Epithelien, das Endoderm und das Ektoderm, welche durch eine extrazelluläre Matrix, die Mesogloea, voneinander getrennt werden (Abb. 2) [18]. Die Epithelzellen stellen mit 20 % den Hauptteil aller Zellen in *Hydra* dar [19].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Süßwasserpolyten *Hydra*.** (A) Querschnitt durch die longitudinale Körperachse. (B) Vergrößerte Darstellung des mittels Rechteck markierten Epithelbereiches aus 2A. (Aus: Schaller et al. [20], mit freundlicher Genehmigung; verändert).

Der Lebensraum von *Hydra* enthält ein breites Spektrum an fakultativ pathogenen Organismen, wie Bakterien, Pilze, Algen und Parasiten [21, 22]. Das Epithel des Polypen wird jedoch durch keine schützende Schicht, beispielsweise aus Chitin, von seiner Umwelt abgeschirmt (Abb. 2). Die *Hydra* steht somit permanent in unmittelbarem Kontakt zu den fakultativ pathogenen Organismen. Dennoch wurde das Vorliegen von Infektionen bei den Tieren bis heute nicht beschrieben. Im Gegenteil, die Haltung von *Hydra* unter sterilen Bedingungen führt dazu, dass sie gravierende Entwicklungsstörungen entwickeln, welche erst durch die Exposition der Tiere gegenüber unsterilen Bedingungen kompensiert werden [23]. Für verschiedene Spezies konnte zudem gezeigt werden, dass sie eine speziesspezifische Mikrofauna auf ihrem Epithel aufrechterhalten [22]. Sie ist die Folge aktiver Selektionsmechanismen der epithelzellenvermittelten angeborenen Immunabwehr [22]. Diese

stellt, wie bei allen Invertebraten, den einzigen Schutz dar, den *Hydra* zur Abwehr mikrobieller Pathogene hat [24]. Der Süßwasserpolytyp *Hydra* besitzt keine adaptive Immunabwehr. Offensichtlich ist die Gegenwart bestimmter Mikroorganismen und somit das Funktionieren der angeborenen Immunabwehr für das Wohlergehen dieser Tiere von essentieller Bedeutung.

Die angeborene Immunabwehr von *Hydra* umfasst auf zellulärer Ebene unter anderem die Fähigkeit der Epithelzellen zur Phagozytose [25]. Auf molekularer Ebene offeriert das Epithel eine induzierbare starke antimikrobielle Aktivität, welche auf zellulärer Ebene durch Neuronen vermindert wird [26]. Zudem sind die meisten Komponenten des Toll/TLR-Signalweges vorhanden, welcher einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunabwehr darstellt [27, 28]. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der epithelialen Abwehrmechanismen in *Hydra* konnten die Beteiligung von AMPs zeigen und führten unter anderem zur Entdeckung von Hydramacin-1 [29].

Hydramacin-1 wird ausschließlich im Endoderm exprimiert [29]. Die konstitutive Expression des Hydramacin-1-Gens wird in Gegenwart des Endotoxins Lipopolysaccharid erhöht. Damit weist *Hydra* eine eindeutige Reaktion auf die Gegenwart von Gram-negativen Bakterien auf. Das Hydramacin-1-Gen wird jedoch nicht durch doppelsträngige Ribonukleinsäure hochreguliert, die wie Lipopolysaccharid zu den sogenannten PAMPs (engl. *pathogen-associated molecular patterns*) gehört [28].

Neben Hydramacin-1 wurden noch weitere AMPs in *Hydra* entdeckt [29, 30]. Die Gene einiger dieser AMPs zeigten eine Zunahme ihrer Expression in Gegenwart einer wesentlich größeren Zahl verschiedener PAMPs beziehungsweise Gefahrensignale, wie Lipopolysaccharid, doppelsträngige Ribonukleinsäure, Flagellin, Signale apoptotischer Zellen und Natriumurat [29].

Im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation steht das antimikrobielle Peptid Hydramacin-1 und die Aufklärung seiner Tertiärstruktur.

## 1.2 Aufklärung der Tertiärstruktur von Proteinen

Die Funktion eines Proteins ist an dessen Tertiärstruktur gekoppelt [31]. Demnach ermöglicht die Kenntnis der Tertiärstruktur eines Proteins seine Funktion zu verstehen. Durch den Vergleich der Tertiärstrukturen von neu entdeckten Proteinen mit den Tertiärstrukturen von Proteinen, deren Funktion bereits bekannt ist, lässt sich einerseits die Funktion der neu entdeckten Proteine vorhersagen. Andererseits stellt dieser Vergleich eine Möglichkeit dar,

um Proteine zu klassifizieren. Dabei können auch solche Proteine einander zugeordnet werden, die auf Grund ihrer Primärstrukturen keine Homologie aufweisen.

Eine Möglichkeit die Tertiärstruktur von Proteinen aufzuklären ist die mehrdimensionale heteronukleare Kernmagnetresonanz(=NMR, engl. *Nuclear-magnetic resonance*)-Spektroskopie.

### **1.2.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie**

Die NMR-Spektroskopie nutzt die Eigenschaft des Kernspins von Atomkernen. Der Kernspin verursacht ein magnetisches Moment, welches mit einem äußeren Magnetfeld in Wechselwirkung treten kann. Diese Wechselwirkung führt zu dem Phänomen der kernmagnetischen Resonanz, welches die Aufspaltung der Energieniveaus des Kernspins eines entsprechenden Atomkerns in mehrere Zustände beschreibt [32].

Das Proton stellt den wichtigsten Atomkern für die NMR-Spektroskopie dar. In einem äußeren homogenen Magnetfeld kann sich der Kernspin des Protons parallel ( $\alpha$ -Zustand) beziehungsweise antiparallel ( $\beta$ -Zustand) zu den Feldlinien des Magnetfeldes ausrichten. Der  $\alpha$ -Zustand weist dabei ein leicht niedrigeres Energieniveau auf als der  $\beta$ -Zustand. Weiterhin rotiert das magnetische Moment eines entsprechenden Kerns in einer Präzessionsbewegung um die Richtung der Feldlinien des äußeren Magnetfeldes. Die im Bereich von Radiowellen liegende Frequenz dieser Rotation wird als Larmor-Frequenz bezeichnet und entspricht der Resonanzfrequenz dieses Kerns. Zwischen dem  $\alpha$ - und dem  $\beta$ -Zustand kann somit ein Übergang induziert werden, indem Radiowellen eingestrahlt werden, deren Frequenz dem Energieunterschied zwischen den beiden Energieniveaus, das heißt deren Larmor-Frequenz, entspricht.

Die Larmor-Frequenz ist eine für jeden Kern desselben Elements charakteristische Größe. Sie wird jedoch durch die chemische Umgebung eines entsprechenden Kerns beeinflusst, weil sowohl die Elektronen des betrachteten Kerns selbst, als auch die Elektronen der Nachbaratome, schwache magnetische Felder erzeugen, welche die Atomkerne schwach aber distinkt vom äußeren Feld abschirmen. Dieses Phänomen wird als chemische Verschiebung bezeichnet. Daher lassen sich zwei Protonen desselben Moleküls mit unterschiedlichen Nachbaratomen anhand ihrer voneinander abweichenden chemischen Verschiebungen beziehungsweise Larmor-Frequenzen unterscheiden.

Auf Grund seines leicht niedrigeren Energieniveaus, nehmen von allen Protonen eines Moleküls, welches in ein äußeres homogenes Magnetfeld gebracht wird, geringfügig mehr

Protonen den  $\alpha$ -Zustand ein. Die magnetischen Momente aller Kernspins der Atome dieses Moleküls lassen sich deshalb zu einer makroskopischen Gesamtmagnetisierung  $M_0$  addieren, welche ungleich Null ist. Die zeitliche Entwicklung dieser Größe wird im Spektrometer gemessen.

Die makroskopische Gesamtmagnetisierung hat vektoriellen Charakter und lässt sich in drei Komponenten zerlegen, die jeweils in eine andere der drei Dimensionen eines Raums wirken. Im thermodynamischen Gleichgewicht ist nur die Magnetisierungskomponente in Richtung des Magnetfeldes vorhanden. Diese verläuft laut Definition in z-Richtung. Die transversalen Komponenten in x- und y-Richtung weisen keine Vorzugsrichtung auf und kompensieren sich daher. Beim Anlegen eines weiteren äußeren Magnetfeldes in Form eines Radiofrequenzpulses, welcher orthogonal zur z-Achse der makroskopischen Gesamtmagnetisierung gerichtet ist, kann transversale x- beziehungsweise y-Magnetisierung erzeugt werden, wenn die Kerne des Moleküls die Radiofrequenzen im Bereich ihrer Lamor-Frequenzen absorbieren. Dies bringt die makroskopische Gesamtmagnetisierung aus dem thermodynamischen Gleichgewicht und führt zur Induktion einer detektierbaren Spannung in einer Empfängerspule. Nach dem Radiopuls strebt die makroskopische Gesamtmagnetisierung wieder in den Grundzustand. Dies wird als Relaxation bezeichnet und durch die longitudinale Relaxationszeit  $T_1$  sowie die transversale Relaxationszeit  $T_2$  charakterisiert. Sie wird durch die Wechselwirkung der Kernspins mit ihrer Umgebung ( $T_1$ ) beziehungsweise der Kernspins untereinander ( $T_2$ ) verursacht.

Bei kleinen Molekülen besitzen  $T_1$  und  $T_2$  vergleichbare Werte. Größere Moleküle, wie Proteine, haben hingegen eine gegenüber  $T_1$  wesentlich kürzere  $T_2$ -Relaxation. Letztere ist deshalb auch maßgeblich für die Abnahme der Spannung verantwortlich, welche in der Empfängerspule induziert und detektiert wird, und bedingt das als *FID* (engl. *Free-induction decay*, freier Induktionszerfall) bezeichnete Messsignal in der NMR-Spektroskopie. Mit Hilfe der Fourier-Transformation wird der *FID* aus der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne überführt. Dadurch können all jene Lamor-Frequenzen, welche durch die einzelnen Kerne eines gemessenen Moleküls emittiert wurden, in einem entsprechenden Spektrum als chemische Verschiebung dargestellt werden.

Die einfachste Form der NMR-Spektroskopie ist das eindimensionale (1D-)Experiment. Es besteht aus einem Präparations- und einem Detektionsschritt. Die Präparation entspricht der oben beschriebenen Anregung aller magnetisch aktiven Kerne mit Hilfe eines Radiofrequenzpulses. Die Detektion umfasst die anschließende Messung des *FID*. Nach Fourier-Transformation erhält man ein 1D-NMR-Spektrum in dem die Signalintensität der

detektierten Frequenzen über der chemischen Verschiebung aufgetragen ist. Für größere Moleküle ist die Auswertung eines 1D-Spektrums unmöglich, weil sich die Signale der einzelnen Kerne überlagern und nicht mehr voneinander unterschieden werden können. Die Überlagerungen können jedoch sowohl durch die Einführung zusätzlicher spektraler Dimensionen als auch durch die Einbringung von anderen Kernen, welche die Eigenschaft des Kernspins besitzen, kompensiert werden.

### 1.2.2 *Mehrdimensionale heteronukleare NMR-Spektroskopie*

Die Einführung weiterer spektraler Dimensionen in ein NMR-Experiment wird durch die Ausnutzung der Wechselwirkung zwischen magnetisch aktiven Kernen beziehungsweise durch den zwischen ihnen möglichen Transfer von Magnetisierung erreicht [32]. Dabei sind zwei Mechanismen für diesen Transfer wesentlich: Die skalare Kopplung und der Kern-Overhauser-Effekt (NOE, engl. *Nuclear-Overhauser effect*). Die skalare Kopplung beschreibt die Übertragung von Magnetisierung zwischen Kernen, welche über die dazwischen liegenden Bindungen direkt miteinander koppeln. In der Regel werden Kopplungen über mehr als drei Bindungen nicht beobachtet. Beim NOE handelt es sich um eine über den Raum wirkende Interaktion relaxierender Dipole. In erster Näherung ist die Stärke dieser Wechselwirkung umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des zwischen den Kernen liegenden Abstands. Ein Transfer von Magnetisierung über den Raum kommt in der Regel nur zustande, wenn die entsprechenden Kerne nicht weiter als 5 Å voneinander entfernt sind. Gegenüber dem 1D-Experiment kommen bei einem 2D-Experiment zwei weitere Schritte hinzu, nämlich Evolution und die Mischsequenz, welche zwischen Präparation und Detektion eingefügt sind. Während der Evolution können die angeregten Kerne über einen vorgegebenen Zeitraum frei präzedieren. Während der Mischsequenz, welche aus Pulsen und Wartezeiten besteht, wird der Zustand der Magnetisierung am Ende der Evolution abgefragt, und zudem können die Kerne ihre Magnetisierung auf einen entsprechenden Nachbarkern transferieren. Durch die Erhöhung der Evolutionszeit um einen festen Betrag erhält man eine Serie von 1D-Spektren, welche in der Evolutionszeit moduliert sind. Wenn man die Signalintensitäten aus der Serie von 1D-Experimenten über der zunehmenden Evolutionszeit aufträgt, lässt sich ein weiterer *FID* beobachten. Durch Fourier-Transformation in Richtung zunehmender Evolutionszeit wird schließlich das 2D-Spektrum erhalten. Die Erweiterung des 2D-Experimentes um eine weitere Evolutions- und Mischphase führt zum Erhalt eines

3D-Spektrums. Letzteres wird erforderlich, wenn trotz der Entzerrung der Signale eines 1D-Spektrums im 2D-Spektrum weiterhin zahlreiche Überlagerungen auftreten.

Die dritte Dimension eines 3D-Spektrums kann einerseits durch die Einführung weiterer magnetisch aktiver Kerne, sogenannter Heterokerne, ermöglicht werden und andererseits durch die Verknüpfung zweier 2D-Experimente. Die beiden wichtigsten Heterokerne sind das Stickstoffisotop  $^{15}\text{N}$  und das Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$ . Mit der Einführung von Heterokernen wird die Proteinstrukturaufklärung deutlich vereinfacht. Die Isotopen-markierten Proteine ermöglichen die Aufnahme einer Fülle verschiedener Spektren, die jeweils eine andere Teilinformation enthalten, deren Kombination der sequenzspezifischen Zuordnung dient. Dabei wird jedes, der in diesen Spektren beobachteten Signale, einem bestimmten Proton im Protein zugeordnet.

Das TOCSY(engl. *Total-correlation spectroscopy*)-Spektrum enthält Signale von skalar gekoppelten Protonen, das heißt es korreliert ausschließlich die intraresidualen Protonen der Aminosäuren eines Proteins. Zur Berechnung der Tertiärstruktur eines Proteins werden jedoch interresiduale Proton-Proton-Abstände benötigt. Diese können im NOESY(engl. *Nuclear-Overhauser and exchange spectroscopy*)-Spektrum identifiziert werden, welches alle Protonen miteinander korreliert, die nicht weiter als 5 Å voneinander entfernt sind. Es werden somit einerseits die Signale aller intraresidualen Protonen einer jeweiligen Aminosäure detektiert. Andererseits werden aber auch Signale detektiert, welche Protonen zugeordnet sind, die auf Grund der Tertiärstruktur eine entsprechende räumliche Nähe vorweisen. Die Differenzierung zwischen den für die Strukturberechnung weniger bedeutsamen intraresidualen NOE-Signalen einer Aminosäure und den wesentlichen interresidualen NOE-Signalen erfolgt durch Vergleich des NOESY-Spektrums mit dem TOCSY-Spektrum.

Die Auswertung eines NOESY-Spektrums führt zu einer Liste von Protonen-Abständen, deren Größe durch die Intensitäten der entsprechenden NOE-Signale im Spektrum gegeben ist. Dabei ist die Signalintensität umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des zwischen zwei Kernen liegenden Abstands. Der kleinste mögliche Abstand wird dabei durch den van-der-Waals-Radius eines Protons (1,8 Å) vorgegeben und der größte durch den Mindestabstand, welcher zur Beobachtung eines NOEs erforderlich ist (5,0 Å). Die identifizierten Abstände dienen als Randbedingung für die Strukturberechnung, welche zu einem Ensemble von Strukturvorschlägen führt. Aus diesem Ensemble lässt sich letztlich eine mittlere Struktur ableiten.

### 1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Tertiärstruktur des antimikrobiellen Peptids Hydramacin-1 mit Hilfe der mehrdimensionalen heteronuklearen NMR-Spektroskopie sowie die Untersuchung seines antimikrobiellen Wirkmechanismus. Dies erforderte zunächst die Etablierung eines Protokolls, welches die Reinigung von nativem rekombinant hergestellten Hydramacin-1 im erforderlichen Millimolar-Maßstab ermöglichte. Das Protokoll sollte anschließend für die Herstellung von sowohl nicht-markiertem als auch von einfach- $^{15}\text{N}$ -sowie doppelt- $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -markiertem Peptid dienen. Abschließend wurde die nicht markierte Variante des Peptids zur Untersuchung des antimikrobiellen Wirkmechanismus und die markierten Varianten für die NMR-spektroskopische Strukturaufklärung verwendet.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Verwendete Medien, Lösungsmittel und Puffer

- LB-Medium
  - Anfertigt mit dem Kapsel-System von MP Biomedicals, LLC.
  - 25 Kapseln    10 g Trypton  
                  5 g Hefe-Extrakt  
                  10 g NaCl
  - *ad* 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
  - → autoklaviert und dann Zugabe von:
    - 100 µg Carbenicillin Dinatriumsalz (≥ 90 %, für die Biochemie, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  
- LB-Agar-Platte
  - 12 g Agar-Agar (hochreine Qualität, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 25 Kapseln für LB-Medium (MP Biomedicals, LLC.) → siehe LB-Medium
  - *ad* 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
  - → autoklaviert und nach Abkühlung auf ~50-60 °C Zugabe von:
    - 50 µg Ampicillin Natriumsalz (≥ 99 %, f. d. Molekularbiologie, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  
- Minimal-Medium
  - 7,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (≥ 99,5 %, p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 3,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (≥ 99,5 %, Fluka)
  - 2,0 g NaCl (≥ 99,5 %, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - *ad* 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
  - → autoklaviert und dann Zugabe von:
    - 0,2407 g MgSO<sub>4</sub> (wasserfrei, ≥ 98 % (KT), Fluka)
    - 0,82 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl (≥ 98 *atom* %, Campro Scientific)
    - 1,86 g D-<sup>13</sup>C-Glucose (≥ 99 *atom* %, Campro Scientific), wenn doppelt markiert oder 1,98 g α-D(+)-<sup>12</sup>C-Glucose·H<sub>2</sub>O (≥ 99,5 %, Ph.Eur., Carl Roth GmbH & Co. KG), wenn einfach markiert

- 100 µg Carbenicillin Dinatriumsalz ( $\geq 90\%$ , für die Biochemie, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  
- Lysepuffer
  - 8,0 g NaCl ( $\geq 99,5\%$ , p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 0,2 g KCl ( $\geq 99\%$ , Ph.Eur., USP, BP, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ( $\geq 99,5\%$ , p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 0,202 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( $\geq 99,5\%$ , Fluka)
  - 2 mL Tween® 20 ( $\geq 97\%$ , Ph.Eur., Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - *ad* 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
  - pH 7,4 (eingestellt mit Salzsäure rauchend (ROTIPURAN®, 37%, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG))
  
- Waschpuffer
  - Zusammensetzung wie Lysepuffer, ohne Tween® 20.
  
- Disaggregationspuffer
  - 6 M Guanidinhydrochlorid (Roche)
  - 50 mM TRIS (Ultra Qualität, PUFFERAN®,  $\geq 99,9\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - pH 7,2 (eingestellt mit Salzsäure rauchend (ROTIPURAN®, 37%, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG))
  
- Elutionspuffer
  - 6 M Guanidinhydrochlorid (Roche)
  - 50 mM TRIS (Ultra Qualität, PUFFERAN®,  $\geq 99,9\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 250 mM Imidazol ( $\geq 99\%$ , p.a., Ultra Qualität, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - pH 8,0 (eingestellt mit Salzsäure rauchend (ROTIPURAN®, 37%, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG))

- Renaturierungslösung I
  - 4 mM L-Glutathion reduziert ( $\geq 98\%$  für die Biochemie, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 0,4 mM Glutathion oxidiert ( $\geq 95\%$  (HPLC), Fluka)
  - Reinstwasser
  - pH  $\sim 9$  (eingestellt mit 5 M NaOH ( $\geq 99\%$ , p.a., ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG))
  
- Renaturierungspuffer II
  - 50 mM TRIS (Ultra Qualität, PUFFERAN®,  $\geq 99,9\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - pH 8,0 (eingestellt mit Salzsäure rauchend (ROTIPURAN®, 37%, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG))
  
- Laufmittel I für RP-HPLC
  - 20 mL Acetonitril/0,1 % (v/v) TFA (ROTISOLV®, LC-MS Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - *ad* 1 L 0,1 % TFA (v/v) (ROTISOLV®, LC-MS Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  
- Laufmittel II für RP-HPLC
  - 950 mL Acetonitril/0,1 % (v/v) TFA (ROTISOLV®, LC-MS Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - *ad* 1 L 0,1 % TFA (v/v) (ROTISOLV®, LC-MS Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  
- 2fach konzentrierter Laemmli-Puffer (reduzierend) für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
  - 2 mL Glycerin ( $\geq 99,9\%$ , Molecular Biology Grade, Calbiochem®)
  - 4 mL 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (ultra pure  $\geq 99\%$ , f. d. Elektrophorese, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 1 mL 2-Mercaptoethanol ( $\geq 99\%$  (GC), Fluka)
  - 0,002 mg Bromphenolblau (wasserlöslich, Indikator, Reag.Ph.Eur., Riedel-de Haën)

- 2,5 mL 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; TRIS (Ultra Qualität, PUFFERAN®,  $\geq 99,9\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG); Salzsäure rauchend (ROTIPURAN®, 37%, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- *ad* 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

- Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele

**Tabelle 2: Zusammensetzung der Gele für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.**

	<i>Sammelgel</i> 7,5 %	<i>Trenngel</i> 15 %	<i>Trenngel</i> 18 %
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), Carl Roth GmbH & Co. KG)	1,25 mL	6 mL	7,2 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8*	1,25 mL	-	-
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8*	-	3 mL	3 mL
10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (ultra pure $\geq 99\%$ , f. d. Elektrophorese, Carl Roth GmbH & Co. KG)	50 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L
Reinstwasser	2,45 mL	2,75 mL	1,55 mL
10 % (w/v) Ammoniumperoxydisulfat ( $\geq 98\%$ (RT), Fluka)	50 $\mu$ L	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (research grade, SERVA Electrophoresis GmbH)	5 $\mu$ L	6 $\mu$ L	6 $\mu$ L

\* TRIS (Ultra Qualität, PUFFERAN®,  $\geq 99,9\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG); Salzsäure rauchend (ROTIPURAN®, 37%, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG)

- 10fach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Puffer
  - 30,3 g TRIS (Ultra Qualität, PUFFERAN®,  $\geq 99,9\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 144 g Glycin ( $\geq 99\%$ , p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 10 g Natriumdodecylsulfat (ultra pure  $\geq 99\%$ , f. d. Elektrophorese, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - pH 8,3
  - *ad* 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

- Coomassie-Färbe-Lösung für Polyacrylamidgele
  - 250 mL Methanol (ROTIPURAN®,  $\geq 99,9\%$ , p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 100 mL Essigsäure (ROTIPURAN®, 100%, p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 0,1 % (w/v) Brilliant Blau G 250 (Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - *ad* 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
  
- Coomassie-Entfärbe-Lösung für Polyacrylamidgele
  - 100 mL Methanol (ROTIPURAN®,  $\geq 99,9\%$ , p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 100 mL Essigsäure (ROTIPURAN®, 100%, p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - *ad* 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
  
- Liposomenpuffer I
  - 10 mM HEPES (Roche)
  - 1 mM EDTA (Ultra,  $\geq 99\%$  (KT), Fluka)
  - pH 7,4 (eingestellt mit 5 M NaOH ( $\geq 99\%$ , p.a., ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG))
  
- Liposomenpuffer II
  - Zusammensetzung wie Liposomenpuffer I, zusätzlich 30 mM Calcein (*for fluorescence*, Fluka)
  
- Liposomenelutionspuffer
  - 10 mM HEPES (Roche)
  - 1 mM EDTA (Ultra,  $\geq 99\%$  (KT), Fluka)
  - 150 mM NaCl ( $\geq 99,5\%$ , p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - pH 7,4 (eingestellt mit 5 M NaOH ( $\geq 99\%$ , p.a., ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG))

- Natriumphosphatpuffer
  - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\geq 99\%$ , p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\geq 99,5\%$ , p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - → Der notwendige pH wurde durch Mischung der beiden Lösungen gleicher Konzentration eingestellt.
  
- Natriumazidlösung
  - 5 g  $\text{NaN}_3$  ( $\geq 99,9\%$ , p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - *ad* 2 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
  
- 10 %ige Glutaraldehydlösung
  - 200  $\mu\text{L}$  0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,8
  - 400  $\mu\text{L}$  50 %ige Glutaraldehydlösung (Fluka)
  - *ad* 2 mL Reinstwasser
  
- 3 %ige Osmiumsäurelösung
  - 5 mL  $\text{OsO}_4$  (4 %ig, für die Elektronenmikroskopie, Carl Roth GmbH & Co. KG)
  - 660  $\mu\text{L}$  0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,8
  - 1 mL Reinstwasser
  
- Agar 100 *resin kit*, *Hard*, Plano GmbH, Wetzlar
  - 20 mL Agar 100 *epoxy resin*
  - 9 mL *Hardener*, DDSA, EM *grade*
  - 12 mL *Hardener*, MNA, EM *grade*
  - 1,2 mL *Accelerator*, BDMA, c. 3 %, EM *grade*
  
- Uranylacetat-Lösung
  - 2,5 g Uranylacetat-Dihydrat (Merck KGaA)
  - *ad* 50 mL Reinstwasser

- Reynolds-Lösung
  - 1,33 g  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (Merck KGaA)
  - 1,76 g  $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck KGaA)
  - *ad* 30 mL Reinstwasser
  - → 30 min schütteln
  - 8 mL NaOH (Merck KGaA)
  - *ad* 50 mL Reinstwasser

## 2.2 Durchführung der Versuche

### 2.2.1 Klonierung

Hydramacin-1 wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas C. G. Bosch aus dem Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jens Michael Schröder aus der Universitäts-Hautklinik Kiel bei Untersuchungen der Spezies *Hydra magnipapillata* entdeckt [29].

Die Nukleotidsequenz des Hydramacin-1-Gens, welche die aktive Form von Hydramacin-1 kodiert, wurde von PD Dr. Jürgen Harder aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jens Michael Schröder mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pET-32a(+) (Novagen®) ligiert. Die verwendeten Oligonukleotide wurden zu diesem Zweck mit den Erkennungssequenzen für die beiden Restriktionsenzyme BglIII und NotI versehen. Dem Oligonukleotid zur Synthese des kodierenden Stranges wurde zudem die Nukleotidsequenz, welche die Schnittstelle für die Endoproteinase EnterokinaseMax<sup>TM</sup> (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) kodierte, eingefügt. Die beiden Oligonukleotide sind in Abbildung 3 dargestellt.

**Oligonukleotid zur Synthese des kodierenden Stranges:**

5'-ACTGAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGCAAATTGTTGATTGCTGGGAG-3'  
(enthält Restriktionsstellen für BglIII und KpnI, kodiert Schnittstelle für EnterokinaseMax<sup>TM</sup>)

**Oligonukleotid zur Synthese des komplementären Stranges:**

5'-ATTTGCGGCCGCTCAGTAACAGATGCAAGTCCA-3'  
(enthält Restriktionsstelle für NotI)

**Abbildung 3: Oligonukleotide für die Amplifikation der kodierenden Nukleotidsequenz des Hydramacin-1-Gens.**

Die Klonierung wurde so gestaltet, dass die Hydramacin-1-kodierende Nukleotidsequenz im selben Leserahmen lag wie die Sequenzen, welche einen Thioredoxin-tag und einen Histidin-tag kodieren. Die Expression dieses Fusionsgens führt zu einem entsprechenden Fusionsprotein, dessen Struktur schematisch in Abbildung 4 dargestellt ist.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Fusionsproteins.** Das Fusionsprotein enthält einerseits einen Thioredoxin-*tag* (Trx-*tag*), einen Histidin-*tag* (6xHis-*tag*) sowie einen Rest (R) der *multiple cloning site* des Vektors und andererseits Hydrarnacin-1, welches mit seinem N-Terminus direkt an eine Schnittstelle (ECS) für die Endoprotease EnterokinaseMax<sup>TM</sup> an R fusioniert vorliegt.

### 2.2.2 Transformation

680 ng des Plasmids wurden, gelöst in einem Mikroliter Reinstwasser, zu 10 µL einer Suspension von chemisch kompetenten Bakterien (*Escherichia coli* BL21 (DE3)) hinzugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Erhitzung des Transformationsansatzes bei 42 °C für eine Minute und eine anschließende Abkühlung auf Eis für drei Minuten. Nach Zugabe von 30 µL LB-Medium wurde der Transformationsansatz für eine Stunde bei 37 °C im Schüttler (*Thermomixer comfort*, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) bei 800 Umdrehungen pro Minute (UpM) inkubiert. Abschließend erfolgte die Ausplattierung der Bakteriensuspension auf eine Ampicillin-haltige LB-Agar-Platte sowie deren Inkubation bei 37 °C über Nacht. Von den verschiedenen über Nacht gewachsenen Klonen, wurden ausschließlich die Zellen eines einzelnen Klons für die nachfolgende Expression verwendet.

### 2.2.3 Expression

Die transformierten Bakterien wurden in 150 mL Carbenicillin-haltigem LB(engl. *Lysogeny broth*)-Medium beziehungsweise Minimal-Medium suspendiert und über Nacht bei 37 °C im Schüttler (GFL 3033, GFL mbH, Burgwedel) bei 180 UpM inkubiert. Anschließend wurden jeweils 500 mL LB-Medium durch Überführung von 5 mL der über Nacht gewachsenen Vorkultur inokuliert und ebenfalls bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Expression des Fusionsproteingens wurde bei einer optischen Dichte von 0,6 in LB-Medium beziehungsweise von 0,2 in Minimal-Medium durch die Zugabe von jeweils 500 µL einer 1 M IPTG-Lösung zu jeweils 500 mL Bakterienkultur induziert. Nach der Induktion wurden die Bakterien für drei bis vier Stunden weiter inkubiert.

## 2.2.4 *Proteinreinigung*

Das Fusionsprotein wurde von den Bakterien in denaturierter, nicht-löslicher Form synthetisiert. Dies führte zur Bildung großer Molekülaggregate, den sogenannten Einschlusskörpern, welche den Ausgangspunkt zur Herstellung von nativem rekombinanten Hydramacin-1 darstellten.

### 2.2.4.1 *ZELLAUFSCHLUSS UND WASCHEN DER EINSCHLUSSKÖRPER*

Nach Beendigung der Expression wurde die Bakteriensuspension für 15 min mit 10826 g zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge RC-5B, Rotor GS-3, USA) und der Überstand verworfen. Der Zellaufschluss beziehungsweise das Waschen der Einschlusskörper wurde durch die sechsmalige Wiederholung von Resuspendierung, Ultraschallbehandlung auf Eis und Zentrifugation erreicht. Dabei wurde das Bakteriensediment während der ersten drei Durchgänge jeweils in Lysepuffer und in den letzten drei Durchgängen in Waschpuffer resuspendiert. Im ersten Durchgang betrug die Länge der angewendeten Ultraschalldauer zum Zwecke eines umfassenden Zellaufschlusses 3x1 min (Sonopuls GM 2200, UV 2200, TT13, Bandelin *electronic*, Berlin) und in den nachfolgenden Durchgängen jeweils eine Minute. Die Zentrifugation erfolgte jedesmal mit 47850 g für 30 min (Sorvall-Zentrifuge RC-5B, Rotor SS-34, USA). Das gewaschene Sediment wurde abschließend bei Raumtemperatur in Disaggregationspuffer auf einem Rolltisch (*roller mixer SRT1 stuart*®, Bibby Sterilin Ltd, UK) über Nacht inkubiert.

### 2.2.4.2 *IMMOBILISIERTE-METALL-AFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE*

Die Separation der löslichen und unlöslichen Anteile, der über Nacht im Disaggregationspuffer inkubierten Probe, erfolgte mittels Zentrifugation bei 47850 g für 30 min (Sorvall-Zentrifuge RC-5B, Rotor SS-34, USA). Der Überstand wurde auf eine mit Disaggregationspuffer equilibrierte Ni<sup>2+</sup>-Agarose-Matrix (Qiagen, Hilden) gegeben und bei Raumtemperatur auf einem Rolltisch für 4 h inkubiert. Die Agarose mit adsorbierten Protein wurde durch Zentrifugation (Varifuge 3.0R, Heraeus Instruments, Osterode) bei 870 g für zwei Minuten sedimentiert, woraufhin der Überstand, der den Großteil ungebundener Proteine enthielt, dekantiert werden konnte. Anschließend erfolgte ein fünfmaliges Waschen der Agarose mit Disaggregationspuffer um unspezifisch adsorbierte Proteine zu entfernen. Die

Elution des Fusionsproteins von der gewaschenen Agarose erfolgte durch wiederholte Inkubation mit Elutionspuffer. Der Verlauf der Proteinreinigung wurde sowohl mit Hilfe der photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration in den jeweiligen Waschfraktionen beziehungsweise Elutionen verfolgt als auch mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

#### **2.2.4.3 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION**

Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes nach Messung der Absorption der Proteinlösung bei 280 nm im Zweistrahlphotometer (U-2001, Hitachi Instruments, Japan). Als Referenz diente die Absorption bei 280 nm des jeweiligen Puffers. Der verwendete Extinktionskoeffizient betrug für das Fusionsprotein  $\epsilon_{280} = 44300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und für das rekombinante Hydramacin-1  $\epsilon_{280} = 29940 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Die beiden Koeffizienten wurden nach der Methode von Gill und Hippel berechnet [33]. Die zur Berechnung der Proteinkonzentrationen benötigten Molekülmassen betragen für das Fusionsprotein 24061,3 Da und für das rekombinante Hydramacin-1 7009 Da.

#### **2.2.4.4 DISKONTINUIERLICHE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE**

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese [34] wurde mit dem Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Elektrophoresesystem von BIO-RAD (CA, USA) bei 200 V durchgeführt. Entsprechende Proben wurden 1:1 mit 2fach konzentriertem Laemmli-Puffer gemischt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Proteine wurden nach der Elektrophorese mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Ihr Molekulargewicht wurde durch Vergleich mit den Protein-Standards #SM0431 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) beziehungsweise *Mark12<sup>TM</sup> Unstained Standard* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verifiziert.

Bakterienhaltige Proben aus den Expressionskulturen wurden für 10 min zentrifugiert (5417R, Eppendorf AG, Hamburg) und der Überstand dekantiert. Nach Resuspendierung der Bakterien in 8 M Harnstoff-Lösung (Riedel-de Haën) erfolgte die Mischung mit 2fach konzentriertem Laemmli-Puffer sowie die Erhitzung der Proben für 5 min. Anschließend wurden diese erneut für 2 min zentrifugiert, für 1 min bei 95 °C erhitzt und der Überstand auf das Gel aufgetragen.

#### **2.2.4.5 RENATURIERUNG**

Die Renaturierung des Fusionsproteins erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde die Konzentration des im Disaggregationspuffer gelösten Fusionsproteins auf 0,3 mg/mL eingestellt und diese Lösung mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (LKB-Pump P-1, Pharmacia, Schweden) der stark gerührten Renaturierungslösung I zugetropft (1 Tropfen pro Sekunde). Das Volumen der Renaturierungslösung I betrug das 5fache der vorverdünnten Proteinlösung, so dass am Ende der Vermengung beider Lösungen die Konzentration von denaturierendem Guanidinhydrochlorid bei einem Mol pro Liter lag. Der pH-Wert dieser Lösung wurde auf 8,5 eingestellt. Danach wurde sie mit Stickstoff überschichtet und bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren für 72 h inkubiert.

Die Proteinlösung wurde anschließend mittels Vivaspin20-Konzentratoren (Vivascience AG, Hannover) auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens konzentriert und für 48 h, bei Raumtemperatur und unter leichtem Rühren gegen einen 200fachen Volumenüberschuss des Renaturierungspuffers II dialysiert (ZelluTrans, MWCO: 4000-6000 Da, Carl Roth GmbH & Co. KG). Nach 24 h wurde die Dialyse in frisch angesetzten Renaturierungspuffer II fortgeführt.

#### **2.2.4.6 PROTEOLYTISCHE SPALTUNG**

Nach erfolgreicher Renaturierung konnte das Fusionsprotein mittels EnterokinaseMax<sup>TM</sup> (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) im Renaturierungspuffer II proteolytisch gespalten werden. Dabei wurden 0,1 u für die proteolytische Spaltung von 300 µg des Fusionsproteins eingesetzt. Die Inkubation des Fusionsproteins mit der Endoprotease fand über Nacht bei einer Temperatur von 37 °C unter leichtem Schwenken (90 UpM, GFL 3033, GFL mbH, Burgwedel) statt.

#### **2.2.4.7 GRADIENTEN-RP-HPLC UND LYOPHILISATION**

Im Anschluss an die proteolytische Spaltung wurde das rekombinante Hydramacin-1 vom Rest des ursprünglichen Fusionsproteins sowie von der zugesetzten EnterokinaseMax<sup>TM</sup> mit Hilfe einer Gradienten-RP-HPLC getrennt (880-PU, Jasco GmbH Deutschland, Groß-Umstadt). Nach Equilibrierung der präparativen C<sub>18</sub>-Säule (VP250/10, Macherey-Nagel, Düren) auf 25 % (v/v) des Laufmittels II beziehungsweise 75 % (v/v) des Laufmittels I

erfolgte die Auftragung und Trennung des Probengemisches. Dabei wurde der Anteil von Laufmittel II kontinuierlich um 1,39 % (v/v) pro Minute und somit die Konzentration an Acetonitril in der mobilen Phase erhöht. Beim Erreichen eines Anteils von 43 % (v/v) des Laufmittels II wurde dieser innerhalb von drei Minuten auf den Höchstwert von 100 % gebracht, um die maximale Elutionsrate zu erreichen. Die Detektion der eluierten Proteine erfolgte im UV-Bereich bei 280 nm (875-UV, Jasco GmbH Deutschland, Groß-Umstadt). Das eluierte Hydramacin-1 wurde anschließend gefriergetrocknet (Christ alpha 1-4, Christ Gefrier Trocknungsanlagen GmbH, Osterode) und seine Molekülmasse mittels MALDI-TOF(engl. *Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight*)-Massenspektrometrie (Proteomics Analyzer 4700 (MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer), Applied Biosystems, Framingham, USA) bestätigt. Als Matrix diente  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure, gelöst in 60 % (v/v) Acetonitril/ 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure.

### 2.2.5 *Circulardichroismus-Spektroskopie*

Mit Hilfe der Circulardichroismus(CD)-Spektroskopie wurde die Sekundärstruktur des rekombinant hergestellten Hydramacin-1 untersucht, sowie dessen Temperaturstabilität in einem Bereich von 20 °C bis 95 °C. Die Temperaturerhöhung lag bei 1 °C pro Minute. Die Messungen erfolgten an einem J-720 Spektropolarimeter (Jasco GmbH Deutschland, Groß-Umstadt) mit einer spektralen Bandbreite von 2 nm in Küvetten verschiedener Schichtdicke aus Quarzglas (Helma GmbH & Co. KG, Müllheim).

Die gemessene Elliptizität ( $\Theta_\lambda$ : in mgrad) wurde wie folgt auf die mittlere Molmasse der Aminosäurereste des Proteins (engl. *mean residue weight*; MRW: in g mol<sup>-1</sup>), auf die Schichtdicke der Probenlösung (d: in cm) sowie auf ihre Konzentration (c: in g cm<sup>-3</sup>) bezogen:

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

Die Kalibrierung des Spektrometers erfolgte nach der Methode von Chen und Yang [35].

### 2.2.6 *Massenspektrometrie zur Analyse der intramolekularen Disulfidverknüpfung*

Die Analyse der intramolekularen Disulfidverknüpfung mittels Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Dr. Christoph Gelhaus (Zoologisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Massenspektrometrie) durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Reduktion und Alkylierung von 2 µg Hydramacin-1 gelöst in 10 µL 0,01 % (v/v) TFA/Reinstwasser (ROTISOLV® LC-MS Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG). Dafür wurde die Probe mit 20 µL 50 mM Dithiothreitol (Roth) in SDS-Probenpuffer (10 % (w/v) Glycerin; 3,1 % (w/v) SDS; 65 mM (w/v) Tris (pH 6,8); 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) für 15 min bei 70 °C inkubiert. Auf die anschließende Zugabe von 1 M Iodacetamid in Reinstwasser bis zu einer finalen Konzentration von 150 mM Iodacetamid folgte eine weitere Inkubation bei 45 °C für 20 min. Danach wurden sowohl 2 µg Hydramacin-1 in reduzierter und alkylierter Form als auch 2 µg Hydramacin-1 in nicht-reduzierter Form auf ein diskontinuierliches 15 %iges Tricingel [36] ohne *spacer gel* aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit dem PerfectBlue™-System (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Zur Detektion der Proteinbanden wurde das Gel mit kolloidalem Coomassie-Brilliant-Blau [37] gefärbt. Aus den Banden wurde jeweils eine Probe ausgestanzt und das enthaltene Protein tryptisch gespalten. Trypsinisierung und Peptidelution erfolgten nach Schmidt et al. [38]. Von den beiden Proben wurden zunächst *Peptide mass fingerprints* im positiven Reflectronmodus (Proteomics Analyzer 4700 (MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer), Applied Biosystems, Framingham, USA) erstellt und miteinander verglichen. Nachfolgend wurden diejenigen Peptidionen selektiert, die im Falle der nichtalkylierten Probe vorhanden waren, aber nicht durch die tryptische Spaltung des alkylierten Proteins entstanden sind. Die selektierten Vorläuferionen wurden mittels *collision induced dissociation* Technologie weiter im Tandem-Massenspektrometrie-Modus fragmentiert [38]. Die erhaltenen Massenspektrometrie- und Tandem-Massenspektrometriespektren wurden mit dem Programm *SearchXLinks* [39] analysiert.

### 2.2.7 *Mehrdimensionale gepulste Fourier-Transform-NMR-Spektroskopie*

Für die NMR-Experimente wurden zwei unterschiedlich Isotopen-markierte Varianten von Hydramacin-1 hergestellt: Eine <sup>15</sup>N-markierte sowie eine <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C-markierte. Beide wurden in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 5,7) gelöst. Dieser bestand im Falle der <sup>15</sup>N-Variante aus 7 % (v/v) D<sub>2</sub>O/93 % (v/v) H<sub>2</sub>O (99,96 atom % D, Isotec Inc., USA) und im Falle der doppelt

markierten Variante zu 100 % aus D<sub>2</sub>O. Zu beiden Proben wurde Natriumazid bis zu einer finalen Konzentration von 0,05 % (w/v) zugesetzt. Mit den beiden Proben wurden die im nachfolgenden Text aufgelisteten Experimente durchgeführt.

### 2.2.7.1 DURCHFÜHRUNG DER EXPERIMENTE

Die NMR-Experimente wurden an einem Bruker DRX600 Spektrometer, ausgestattet mit einer für die Protonen-Detektion optimierten 5-mm z-Gradienten <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C-CryoProbe, bei 298 K durchgeführt.

Insgesamt erfolgten 14 verschiedene NMR-Experimente mit den Isotopen-markierten Hydramacin-1-Proben. Sie sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Durchgeführte NMR-Experimente.**

<i>Experiment</i>	<i>Komplexe Punkte der Datenmatrix (Kern)</i>			<i>Spektrale Breite [Hz]</i>		
	<i>t</i> <sub>1</sub>	<i>t</i> <sub>2</sub>	<i>t</i> <sub>3</sub>	<i>F</i> <sub>1</sub>	<i>F</i> <sub>2</sub>	<i>F</i> <sub>3</sub>
<b>HSQC [40-42]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	200 ( <sup>15</sup> N)	-	7508	2068	-
<b>HNCA [43-45]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	90 ( <sup>15</sup> N)	120 ( <sup>13</sup> C)	8389	1923	4167
<b>CBCANH [46]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	80 ( <sup>15</sup> N)	120 ( <sup>13</sup> C)	7508	1886	9206
<b>CBCA(CO)NH [47, 48]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	80 ( <sup>15</sup> N)	120 ( <sup>13</sup> C)	7508	1886	9206
<b>(H)C(CO)NH [49-54]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	40 ( <sup>15</sup> N)	140 ( <sup>13</sup> C)	8389	1923	10638
<b>3D-H(N)CO [43-45]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	80 ( <sup>15</sup> N)	142 ( <sup>13</sup> C)	7508	1886	2113
<b>HCACO [55]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	102 ( <sup>13</sup> C)	142 ( <sup>13</sup> C)	7508	4301	1962
<b>H(CCO)NH [49-54]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	42 ( <sup>15</sup> N)	98 ( <sup>1</sup> H)	8389	1923	8621
<b><sup>15</sup>N-editiertes TOCSY [56-58]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	82 ( <sup>15</sup> N)	256 ( <sup>1</sup> H)	7788	2068	7788
<b><sup>13</sup>C-editiertes TOCSY [59]</b>	1280 ( <sup>1</sup> H)	196 ( <sup>1</sup> H)	168 ( <sup>13</sup> C)	4195	4195	11312
<b><sup>15</sup>N-editiertes NOESY-HSQC [56-58, 60]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	74 ( <sup>15</sup> N)	264 ( <sup>1</sup> H)	7508	2068	7508
<b><sup>13</sup>C-editiertes NOESY-HSQC [56, 57, 61]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	126 ( <sup>13</sup> C)	256 ( <sup>1</sup> H)	7508	10718	7508
<b>2D-H(N)CO_A [62]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	142 ( <sup>13</sup> C)	-	7508	2113	-
<b>2D-H(N)CO_B [62]</b>	2048 ( <sup>1</sup> H)	142 ( <sup>13</sup> C)	-	7508	2113	-

Die Prozessierung der *FIDs* der jeweiligen NMR-Experimente wurde mit dem Programm NMRDraw [63] durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte mit dem Programm NMRView [64].

### 2.2.7.2 SEQUENZSPEZIFISCHE ZUORDNUNG

Die sequenzspezifische Zuordnung der intraresidualen Resonanzen der Aminosäuren von Hydramacin-1 wurde mit den folgenden Spektren durchgeführt: HSQC-Spektrum, <sup>15</sup>N- beziehungsweise <sup>13</sup>C-editierte TOCSY-Spektren, sowie HNCA-, CBCANH-, CBCA(CO)NH-, (H)C(CO)NH-, 3D-HNCO- und H(CCO)NH-Spektrum (siehe Tabelle 3).

### 2.2.7.3 ZUORDNUNG STRUKTURELEVANTER NMR-SIGNALE

Im Anschluss an die sequenzspezifische Zuordnung wurden in den <sup>15</sup>N- beziehungsweise <sup>13</sup>C-editierten NOESY-Spektren die für die Strukturberechnung wesentlichen interresidualen Resonanzen von den intraresidualen Resonanzen unterschieden und analysiert.

Des Weiteren erfolgte ein Vergleich der beiden 2D-*long range*-HNCO-Spektren [65], um im Protein vorkommende Wasserstoffbrücken zu identifizieren.

### 2.2.8 Strukturberechnung

Die in den NOESY-Spektren identifizierten strukturelevanten NOE-Signale wurden mit dem Programm NMRView [64] in Atomabstände umgerechnet. Die Kalibrierung der Abstände erfolgte dabei so, dass die mittlere Intensität aller NOE-Signale einem Abstand von 2,6 Å entsprach mit einer Toleranz vom 0,125fachen des entsprechenden Abstandes zum Quadrat. Die Signalintensitäten von Methylgruppen wurden halbiert. Weiterhin sind 1,8 Å und 5,0 Å als unterste beziehungsweise oberste Abstandsbegrenzung definiert worden. In den Berechnungen wurden zusätzlich 24 Abstände zur Definition der vier Disulfidbrücken integriert ( $2.0 \leq d(S_i^\gamma, S_j^\gamma) \leq 2.1$  Å;  $3.0 \leq d(C_i^\beta, S_j^\gamma) \leq 3.1$  Å;  $3.0 \leq d(S_i^\gamma, C_j^\beta) \leq 3.1$  Å) sowie 20 Abstände, welche die beobachteten Wasserstoffbrücken berücksichtigten. Dabei betrug der Abstand zwischen dem Donatorwasserstoffatom und dem Akzeptorsauerstoffatom 1.8-2.0 Å und der Abstand zwischen dem Akzeptorsauerstoffatom und dem Stickstoffatom, das kovalent an das Donatorwasserstoffatom gebunden war, 2.7-3.0 Å.

Anhand der vorgegebenen Abstände wurden mit Hilfe des Programmes CYANA [66] 500 Strukturberechnungen durchgeführt. Gemessen an den niedrigsten Werten der *target function* erfolgte die Generierung eines Ensembles von 20 Strukturen, in denen die vorgegebenen Abstände mit den geringsten Abweichungen erfüllt waren. Aus ihnen konnte mit dem Programm WHATIF [67] eine mittlere Struktur errechnet werden, welche nachfolgend mit dem Programm GROMOS [68] energieminiert wurde.

Die graphischen Darstellungen der Strukturen erfolgte mit den Programmen RIBBONS [69] und GRASP [70].

### **2.2.9 Untersuchung des Wirkmechanismus**

Die Untersuchung des Wirkmechanismus von Hydramacin-1 erfolgte anhand der Wechselwirkung mit mehreren Liposomentypen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung sowie mit lebenden Bakterien. Zur Untersuchung der Wechselwirkung des Peptids mit Liposomen wurden die CD-Spektroskopie, die Fluoreszenzspektroskopie und die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Die Wechselwirkung zwischen Hydramacin-1 und lebenden Bakterienzellen wurde mit Hilfe der Licht- sowie der Elektronenmikroskopie analysiert. Im folgenden Text werden die Herstellung der verwendeten Liposomen sowie die oben aufgelisteten Methoden näher beschrieben.

#### **2.2.9.1 HERSTELLUNG VON LIPOSOMEN**

Die verwendeten Liposomen wurden von Diplom-Biochemiker Matthias Michalek (Biochemisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) hergestellt, maßgeblich nach der Methode von Pick [71].

Zur Synthese dienten die folgenden Phospholipide von Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, U.S.A.) sowie von Fluka (Buchs, Schweiz): Sphingomyelin, L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (PC), L- $\alpha$ -Phosphatidylserin (PS), L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamin (PE), L- $\alpha$ -Phosphatidylinositol (PI), L- $\alpha$ -Phosphatidyl-DL-glycerin (PG) oder Asolectin (von Fluka).

Die Suspensionen der jeweiligen Liposomentypen wurden abschließend mit Hilfe einer NAP-5<sup>TM</sup>-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) entsprechend den Angaben des Herstellers in Liposomenelutionspuffer überführt. Von der Elution wurde nur das Volumen zwischen 0,3 mL und 0,65 mL als Ausgangssuspension für die nachfolgenden Experimente verwendet.

Es wurden sowohl Liposomen hergestellt, deren inneres Kompartiment den Liposomenpuffer I beinhalteten, als auch Liposomen, welche den Fluoreszenzfarbstoffhaltigen Liposomenpuffer II einschlossen.

### **2.2.9.2    *UNTERSUCHUNG DER SEKUNDÄRSTRUKTUR VON HYDRAMACIN-1 IN GEGENWART VON LIPOSOMEN MIT HILFE DER CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE***

Die Untersuchung der Sekundärstruktur von Hydramacin-1 erfolgte mit verschiedenen Liposomentypen, welche hinsichtlich der Membranphospholipide und somit in der Oberflächennettoladung variierten. Es wurden CD-Spektren des Peptids vor und nach Vermengung mit den Liposomen aufgenommen und anschließend miteinander verglichen. Die Messungen erfolgten an einem J-720 Spektropolarimeter (Jasco GmbH Deutschland, Groß-Umstadt) in einer Tandem-Quartzküvette (Helma GmbH & Co. KG, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 2x4,375 mm. Die Aufnahme jedes CD-Spektrums erfolgte in vierfacher Wiederholung.

Die Kammern der Tandem-Küvette wurden jeweils mit 800 µL befüllt, einerseits mit einer Hydramacin-1-Lösung (13 µg/mL) und andererseits mit einer 1:100-Verdünnung der entsprechenden Liposomensuspension. Die Experimente erfolgten sowohl bei pH 5,7 als auch bei pH 7,4 in 50 mM Natriumphosphatpuffer, wobei die Hydramacin-1-Lösung sowie die Verdünnung der Liposomensuspension mit 50 mM Natriumphosphatpuffer des entsprechenden pH-Wertes hergestellt wurden. Die Vermischung von Peptid und Liposomen erfolgte durch 40faches Umschwenken der Tandemküvette. Die Mischung wurde 20 min inkubiert bevor das entsprechende CD-Spektrum aufgenommen wurde.

### **2.2.9.3    *UNTERSUCHUNG DES EINTAUCHENS VON HYDRAMACIN-1 IN DIE MEMBRAN VON LIPOSOMEN MIT HILFE DER FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE***

Die Untersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie erfolgten bei Raumtemperatur am F-2500 Fluoreszenz-Spektrophotometer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) in einem Wellenlängenbereich zwischen 300 nm und 400 nm. Die Seitenketten der Tryptophane wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm zur Fluoreszenz angeregt.

Die Experimente erfolgten sowohl bei pH 5,7 als auch bei pH 7,4. Die gemessenen Proben enthielten 620 µL eines 50 mM Natriumphosphatpuffers mit entsprechend eingestelltem pH-Wert, in dem Hydramacin-1 mit einer Konzentration von 20 µg/mL gelöst war. Zu diesem

wurden 15  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Ausgangssuspension eines Liposomentyps gegeben. Unmittelbar nach Zugabe und Mischung der Probe erfolgte die Aufnahme des Fluoreszenzspektrums in dreifacher Wiederholung.

#### **2.2.9.4    *UNTERSUCHUNG DER AGGREGATION VON LIPOSOMEN MIT HILFE DER FLUORESZENZMIKROSKOPIE***

Aus der Suspension mit Calcein-haltigen Asolectin-Liposomen wurden 0,75  $\mu\text{L}$  entnommen und mit 29,25  $\mu\text{L}$  eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 5,7) vermischt, der 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hydramacin-1 enthielt. Während der Inkubation des Gemisches bei Raumtemperatur und starkem Schütteln (*Thermomixer comfort*, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) erfolgte nach 5 min sowie nach 30 min die Entnahme einer Probe von 1  $\mu\text{L}$ . Diese wurde auf einen Objektträger aufgebracht und an der Luft getrocknet. Als Kontrollen dienten Calcein-haltige Asolectin-Liposomen, welche nur mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 5,7) inkubiert wurden. Die Analyse der getrockneten Proben erfolgte am CKX 41 Mikroskop für Fluoreszenz- & Lichtmikroskopie (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg).

#### **2.2.9.5    *UNTERSUCHUNG DER AGGREGATION VON BAKTERIEN MIT HILFE DER LICHTMIKROSKOPIE***

Die verwendeten Bakterien der Gattungen *Escherichia coli* (DH5 $\lambda$ ), *Bacillus megaterium* (ATCC 14581) und *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) wuchsen über Nacht bei 37 °C und 225 UpM im Schüttler (Certomat R und Certomat H, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen). Die Bakterien wurden für 3 min mit 3800 g (Heareus Multifuge 3 Plus, Thermo Electron Corporation, Langenselbold) sedimentiert, zweimal mit 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 5,7) gewaschen und auf eine finale optische Dichte von 4,6 eingestellt. Zwischen den Waschschrritten erfolgte die Zentrifugation der Bakterien mit 3800 g (5417R, Eppendorf AG, Hamburg) für jeweils zwei Minuten.

Zu 9,4  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Bakteriensuspension wurden 0,6  $\mu\text{L}$  einer Hydramacin-1-Lösung (in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,7) gegeben, so dass die finale Peptidkonzentration 5  $\mu\text{M}$  betrug. Die Inkubation des 10  $\mu\text{L}$  Ansatzes erfolgte bei Raumtemperatur und 1000 UpM (*Thermomixer comfort*, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg). Nach 5 min, 30 min, 1 h und 2 h wurde jeweils 1  $\mu\text{L}$  der Suspension entnommen, auf einen Objektträger aufgetragen und an der Luft getrocknet. Die Analyse der Proben wurde

am CKX 41 Mikroskop für Fluoreszenz- & Lichtmikroskopie (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) durchgeführt.

#### **2.2.9.6    *UNTERSUCHUNG DER AGGREGATION VON BAKTERIEN MIT HILFE DER ELEKTRONENMIKROSKOPIE***

Für die Elektronenmikroskopie wurden Bakterien der Gattungen *Escherichia coli* (DH5 $\lambda$ ), *Bacillus megaterium* (ATCC 14581) und *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) verwendet. Die Untersuchungen erfolgten sowohl mit Bakterien, welche sich in der stationären Phase befanden, als auch mit Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase. Die Anzucht der Zellen erfolgte in beiden Fällen durch Dr. René Augustin aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas C. G. Bosch am Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Dabei orientierte sich die Anzucht der Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase an der Methode von Sahly et al. [72]. Bakterien in der stationären Phase stammten aus Kulturen, welche über Nacht bei 37 °C und 225 UpM im Schüttler (Certomat R und Certomat H, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) inkubiert wurden.

Die entsprechenden Bakterien wurden für 3 min mit 3800 g (Heareus Multifuge 3 Plus, Thermo Electron Corporation, Langenselbold) sedimentiert, zweimal in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 5,7) gewaschen und auf eine finale optische Dichte von 4,6 konzentriert. Zwischen den Waschschrritten erfolgte die Zentrifugation der Bakterien mit 3800 g (5417R, Eppendorf AG, Hamburg) für jeweils zwei Minuten. Von der Suspension gewaschener Bakterien wurden Aliquots in der Größenordnung von mindestens 50  $\mu$ L in mehrere 1,5 mL Reagiergefäße (Sarstedt, Nümbrecht) verteilt. Zu den Aliquots wurden verschiedene Mengen einer Hydramacin-1-Lösung zugesetzt, so dass die finalen Konzentrationen bei 5  $\mu$ M, 100  $\mu$ M oder 560  $\mu$ M Peptid lagen. Bei den Kontrollen erfolgte die Zugabe gleicher Volumina des entsprechenden Lösungsmittels ohne Hydramacin-1. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur unter stetigem Schwenken (50 UpM, Rotamax 120, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach) für 30 min, 60 min beziehungsweise 120 min inkubiert.

Die nachfolgende Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie erfolgte durch Frau Antje Thomas aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas C. G. Bosch am Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Im Anschluss an die Inkubation mit Hydramacin-1 wurden die Bakteriensuspensionen mit einer 10 %igen Glutaraldehydlösung versetzt, im Volumenverhältnis 1:1, und nach kurzem Durchmischen (*vortex*) unter stetigem Schwenken (50 *UpM*, Rotamax 120, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach) für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung von jeweils einem Aliquot aus jeder Probe in Kapillaren (*Cellulose Capillary Tubes*, Bal-Tec GmbH, Witten). Die Kapillaren wurden verschlossen und nach dem gleichen Protokoll bearbeitet wie die verbleibenden Bakteriensuspensionen in den 1,5 mL Reagiergefäßen. Bei den Kapillaren war jedoch zwischen den Waschschrritten sowie für den Austausch der eingesetzten Lösungen eine Sedimentation durch Zentrifugation nicht notwendig.

Nach der Präparation der Kapillaren wurden die in den Reagiergefäßen verbleibenden Bakterien sedimentiert (30 s, *Microcentrifuge*, SD 220 VAC, 6000 *rpm*, Carl Roth GmbH & Co. KG) und der Überstand dekantiert. Die Bakteriensedimente beziehungsweise die Kapillaren wurden nun dreimal mit 1,5 mL eines 10 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,8) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µL einer 3 %igen Osmiumsäurelösung und eine einstündige Inkubation unter stetigem Schwenken (50 *UpM*, Rotamax 120, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach). Danach wurden die Proben erneut sedimentiert und dreimal in 1,5 mL des 10 mM Natriumphosphatpuffers (pH 7,8) gewaschen. Als nächstes erfolgte eine schrittweise Senkung (10 %-Schritte) des Wassergehaltes der Proben mit Hilfe eines Ethanolgradienten, von 60 % bis 100 % EtOH (ROTIPURAN® ≥ 99,8 %, p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG). Dafür wurden die Bakteriensedimente beziehungsweise die Kapillaren nacheinander mit jeweils 1 mL der entsprechenden Ethanollösung für 15 min inkubiert. Den Abschluss des Ethanolgradienten bildete eine ebenfalls 15-minütige Inkubation mit 1 mL 100 % EtOH, welches mit einem Molekularsieb (0,3 nm, Perlform 2 mm, Merck KGaA, Darmstadt) behandelt worden ist.

Nach erneuter Sedimentation wurden die Proben für mindestens 5 min mit 1,5 mL 1,2-Propylendioxid (für die Elektronenmikroskopie, Merck KGaA, Darmstadt), welches ebenfalls mit einem Molekularsieb (0,3 nm, Perlform 2 mm, Merck KGaA, Darmstadt) behandelt worden ist, inkubiert. Danach erfolgte ein schrittweiser Austausch des Propylendioxids gegen Agar 100 *resin*, beginnend bei einem Mischungsverhältnis (v/v) von 2:1 über 1:1 und 1:2 von Propylendioxid zu Agar 100 *resin*, bezogen auf ein Volumen von 1,5 mL. Die jeweiligen Mischungen wurden jeweils für 30 min unter Umschwenken (*Testtube Rotator*, Breda Scientific, Niederlande) inkubiert. Nach abschließender Resuspendierung der

Sedimente beziehungsweise Kapillaren in 1,5 mL des Agar 100 *resin* erfolgte deren Inkubation über Nacht unter Umschwenken.

Am nächsten Tag konnten die sedimentierten Proben unter der Verwendung von frisch angesetztem Agar 100 *resin* eingebettet werden. In einer flachen Einbettungsgießform wurde das Harz dann bei 60 °C über Nacht ausgehärtet.

Von den ausgehärteten Proben konnten am Ultramikrotom (*Ultracut S*, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mit einem Diamantmesser (*histo*, DiS-Galetzka, Weinheim) Dünnschnitte mit einer Schnittdicke von 60 nm angefertigt werden. Die Schnitte wurden anschließend auf Kupfernetzchen (G2500C, Plano GmbH, Wetzlar) aufgenommen, welche mit einem Film aus Pioloform F (Plano GmbH, Wetzlar) beschichtet waren. Der letzte Schritt der Probenpräparation bestand in der Kontrastierung. Bei dieser wurden die Kupfernetzchen mit den aufgetragenen Schnitten zunächst mit Uranylacetat-Lösung benetzt und für 5 min inkubiert. Nach anschließender Spülung der Netzchen mit Reinstwasser erfolgte deren erneute Benetzung mit Reynolds-Lösung sowie eine Inkubation für 5 min. Die Kupfernetzchen wurden danach wiederum mit Reinstwasser abgespült und dann getrocknet.

Die so vorbereiteten Schnitte konnten unter dem Elektronenmikroskop TEM 208 S mit digitaler Bildauflösung (Philips GmbH, Hamburg) analysiert werden.

Alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. Friederike Anton-Erxleben aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas C. G. Bosch am Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel erstellt.

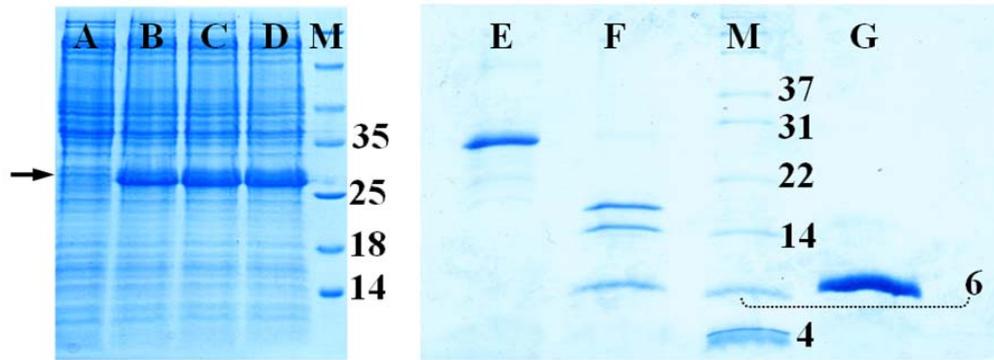
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression, Proteinreinigung und Sekundärstrukturanalyse

Das Fusionsprotein konnte bereits eine Stunde nach Induktion der Expression in den Bakterien detektiert werden. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der gelelektrophoretischen Analyse von Proben, welche vor und nach Induktion der Expression entnommen wurden. Auf allen Gelbahnen wurde dieselbe Menge an Bakterien aufgetragen. Bereits eine Stunde nach Induktion lässt sich deutlich die Anreicherung des Fusionsproteins in den Bakterien erkennen (Abb. 5B). Während alle Proteinbanden, welche bereits vor der Induktion vorhanden waren, ihre Intensität beibehielten, hat die Intensität der Bande für das Fusionsprotein nach zwei beziehungsweise nach drei Stunden zugenommen (Abb. 5C und D).

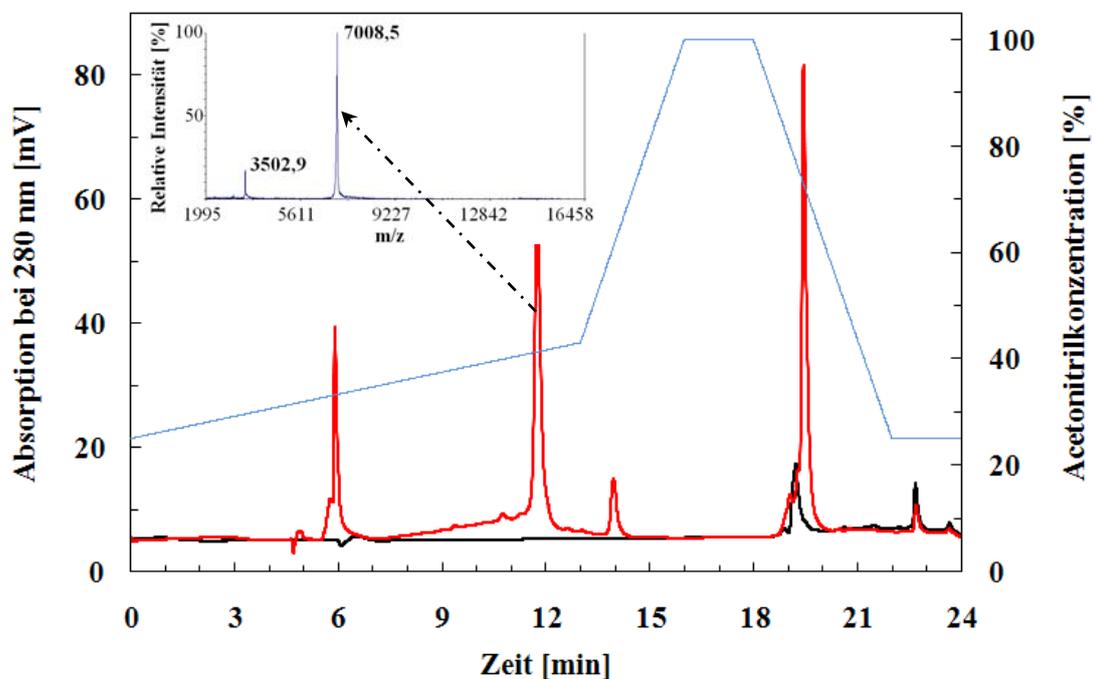
Das Fusionsprotein wurde in den Bakterien in denaturierter Form aggregiert und bildete in wässriger Lösung unlösliche Einschlusskörper. Diese wurden isoliert, gewaschen und solubilisiert. Aus der erhaltenen Proteinlösung konnte das Fusionsprotein isoliert und nachfolgend renaturiert werden, worauf es nahezu ohne Verunreinigungen durch andere Proteine vorlag (Abb. 5E).

In nativer Form konnte das Fusionsprotein durch eine Endoprotease proteolytisch gespalten werden. Die gelelektrophoretische Analyse der Probe nach der proteolytischen Spaltung lässt drei Proteinbanden erkennen (Abb. 5F). Die unterste dieser Banden lag bezüglich des Molekulargewichtstandards mit 6 kDa bis 14,4 kDa in der Größenordnung des rekombinanten Hydrumacin-1. Das Fusionsprotein war nach der proteolytischen Spaltung nicht mehr zu detektieren. Bei den beiden anderen Banden handelt es sich um zwei Varianten des N-terminalen Fusionsrestes. Von dem korrekt abgespaltenen Fusionsrest wurde durch die Endoprotease nochmals ein 15-mer auf C-terminaler Seite abgeschnitten, was zu der kleineren der beiden Banden führte. Das 15-mer selbst konnte durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5: Expression und Reinigung des Fusionsproteins sowie von Hydrumacin-1.** A bis D zeigen die gelelektrophoretischen Trennungen von Proteinen aus den Totallysaten von Bakterien, welche (A) vor der Induktion der Expression sowie (B) 1 h, (C) 2 h und (D) 3 h nach der Induktion entnommen wurden. Der Pfeil markiert die Lage des Fusionsproteins. E bis F zeigen den Zustand der Proteinprobe während der Reinigung. (E) Nach Renaturierung. (F) Nach EnterokinaseMax™-Inkubation. (G) Nach RP-HPLC und Lyophilisation. (M) Protein-Standards in kDa.

Die Lösung des Fusionsproteins wurde nach erfolgter proteolytischer Spaltung mittels RP-HPLC fraktioniert (Abb. 6). Hydrumacin-1 konnte so bis zur Einzel-Peak-Reinheit gereinigt werden (Abb. 5G und 6).

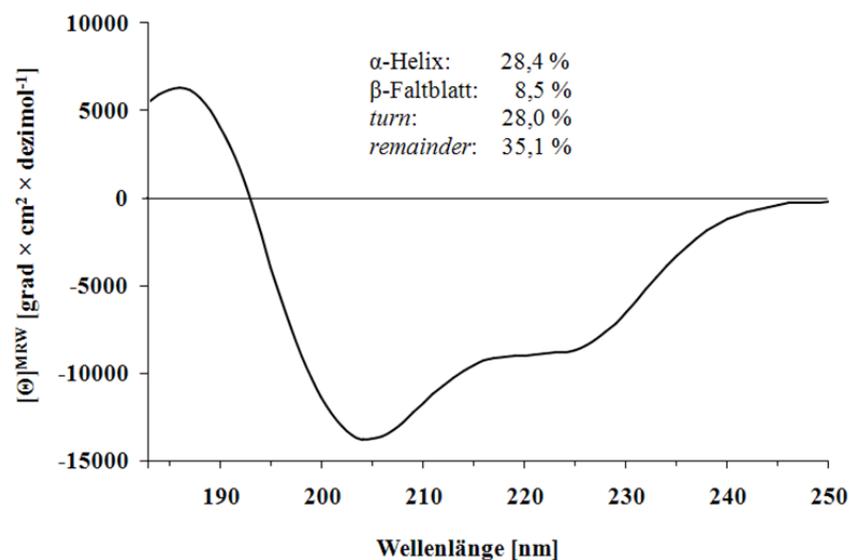


**Abbildung 6: Reinigung von Hydrumacin-1 mit der RP-HPLC.** Schwarz: Chromatogramm ohne Injektion (Basislinie). Rot: Chromatogramm der Proteinprobe nach proteolytischer Spaltung des Fusionsproteins. Blau: Acetonitrilkonzentration (v/v) am Säuleneingang. Links oben dargestellt ist das MALDI-TOF-Massenspektrum des HPLC-Peaks bei 12 min.  $m/z$  = Masse/Ladungs-Verhältnis.

Die massenspektrometrische Analyse der Fraktionen zeigte für den Peak bei 12 min eine Molekülmasse von 7009 Da (Abb. 6). Dies entspricht der Masse von Hydramacin-1, wenn dieses vier Disulfidbrücken enthält.

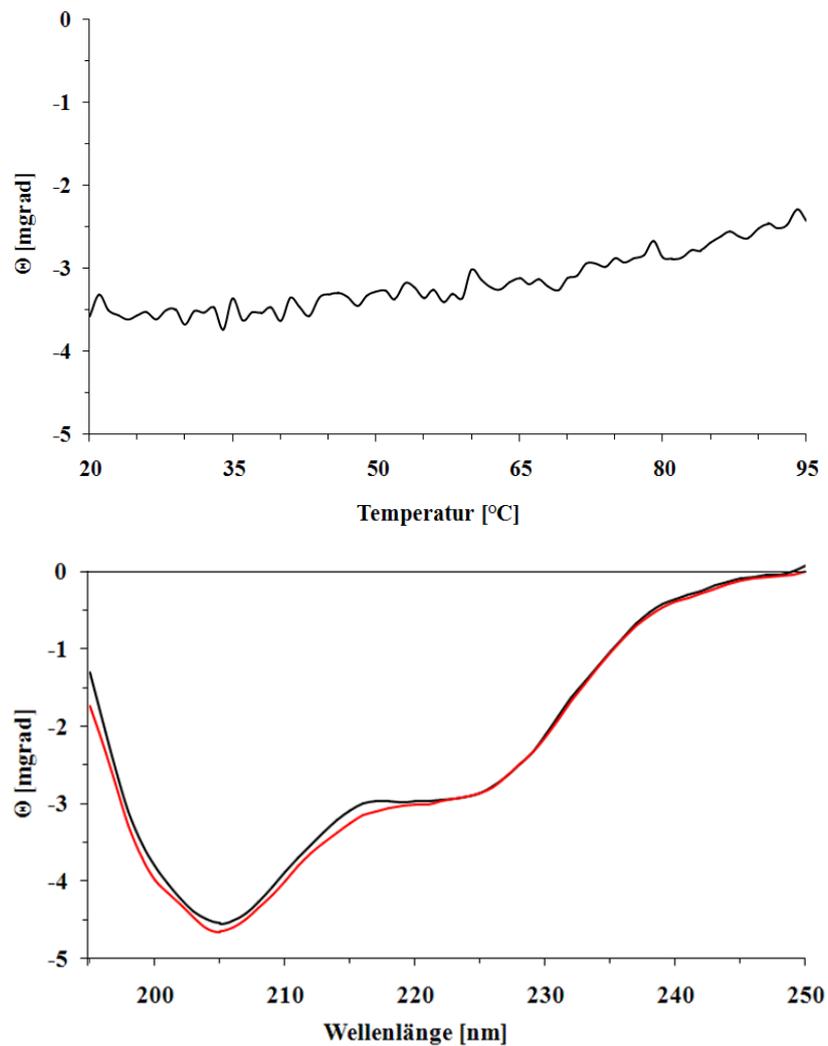
Das gereinigte rekombinant hergestellte Hydramacin-1 wurde auf seine antimikrobielle Aktivität in der Arbeitsgruppe von Prof. Rainer Podschun am Institut für Infektionsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein – Campus Kiel, untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass das Peptid Gram-negative und Gram-positive Bakterien im mikromolaren Konzentrationsbereich tötet. Das antimikrobielle Spektrum umfasst unter anderem die fakultativ humanpathogenen Spezies *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus hemolyticus* sowie einige multiresistente Stämme [29, 73].

Nach der erfolgreichen Reinigung des rekombinant hergestellten antimikrobiell aktiven Hydramacin-1 wurde als erstes seine Sekundärstruktur analysiert. Das CD-Spektrum von Hydramacin-1 und das Ergebnis der Analyse hinsichtlich der Sekundärstrukturanteile ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile erfolgte nach der Methode von Provencher [74]. Die Sekundärstruktur von Hydramacin-1 besteht zu annähernd zwei Dritteln aus bekannten Elementen ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *turn*), während sich dem verbleibenden Drittel keine bekannten Sekundärstrukturelemente (*remainder*) zuordnen lassen.



**Abbildung 7: CD-Spektrum von Hydramacin-1.** Dargestellt ist das mittlere Spektrum des Peptids aus sieben aufeinanderfolgenden Messungen in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 5,7) bei Raumtemperatur und das Ergebnis der Analyse hinsichtlich der Sekundärstrukturanteile.

Die CD-Spektroskopie wurde ebenfalls zur Untersuchung der Temperaturbeständigkeit von Hydramacin-1 verwendet (Abb. 8). Die Intensität der Elliptizität bei 222 nm zeigt mit zunehmender Temperatur eine kontinuierliche, schwache Abnahme. Jedoch lässt sich eine sprunghafte Verringerung des Signals, was die Denaturierung des Proteins indizieren würde, nicht beobachten. Ein Vergleich von CD-Spektren des Peptids vor Erhitzung und nach Abkühlung zeigt, dass diese identisch sind (Abb. 8). Die Ergebnisse belegen, dass Hydramacin-1 eine hohe Temperaturstabilität besitzt.



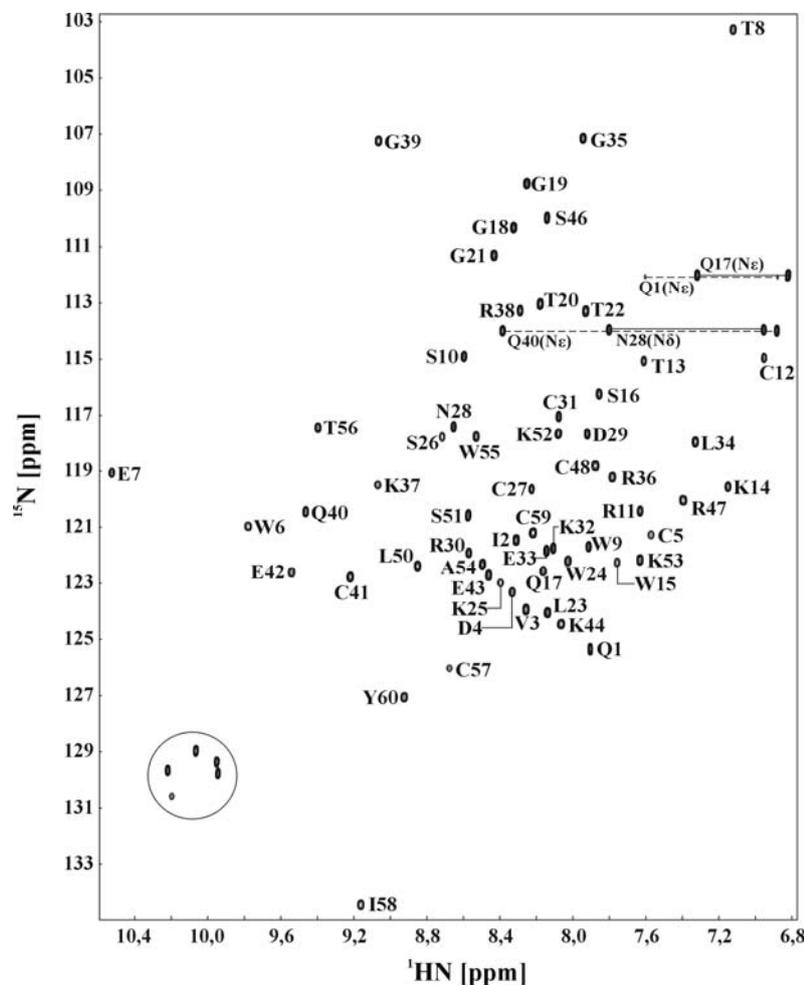
**Abbildung 8: Untersuchung der Temperaturstabilität von Hydramacin-1.**

Oben: Messung der Intensität der Elliptizität bei 222 nm in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 95 °C. Unten: Vergleich der CD-Spektren von Hydramacin-1 bei 20 °C vor Erhitzung (schwarzes Spektrum) und nach Abkühlung (rotes Spektrum). Beide Spektren wurden gemittelt aus jeweils zwei Messungen in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 5,7).

### 3.2 Tertiärstruktur von Hydramacin-1

Zur Aufklärung der Tertiärstruktur von Hydramacin-1 erfolgte zunächst eine sequenzspezifische Zuordnung mit Hilfe der folgenden Spektren: HSQC, HNCA, CBCANH, CBCA(CO)NH, (H)C(CO)NH, 3D-HNCO, HCACO, H(CCO)NH,  $^{15}\text{N}$ -editiertem TOCSY und  $^{13}\text{C}$ -editiertem TOCSY.

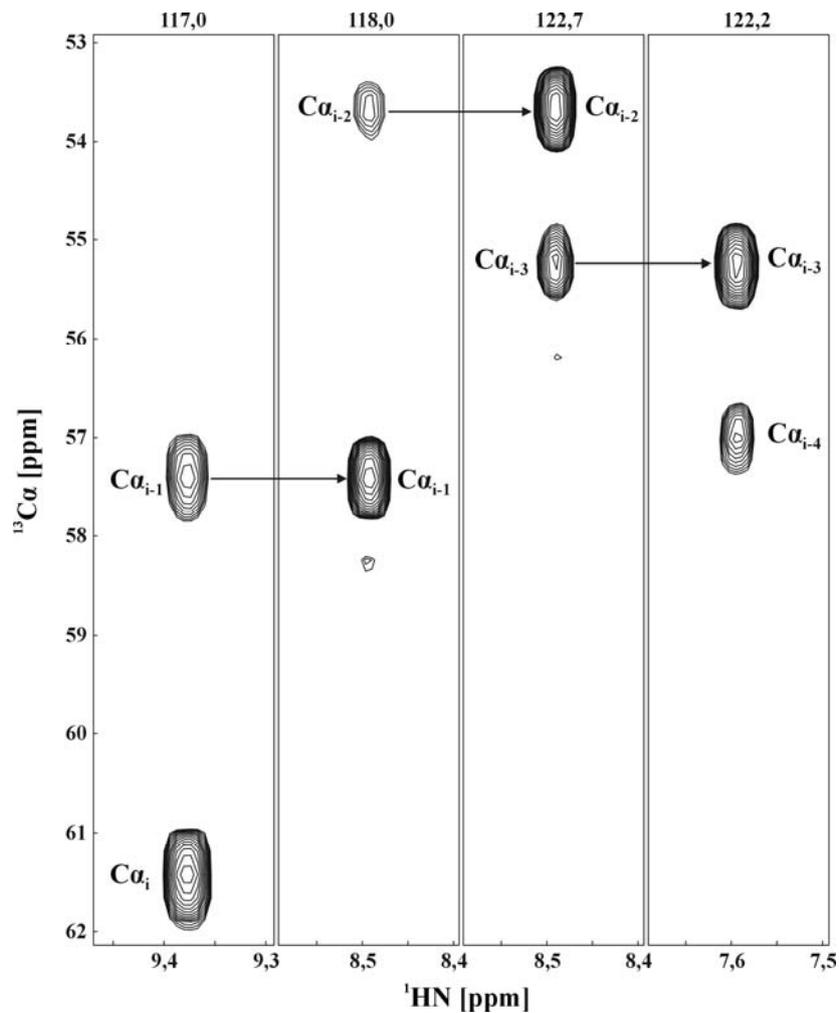
In Abbildung 9 ist das 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum vom  $^{15}\text{N}$ -markierten Hydramacin-1 dargestellt. Es zeigt das Ergebnis der sequenzspezifischen Zuordnung. In dem Spektrum sind 71 Resonanzen zu erkennen, deren Zuordnung zur entsprechenden Aminosäure mit Hilfe der dreidimensionalen Spektren erfolgte. Die Resonanzen von den Amidprotonen der Tryptophanseitenketten konnten diesen nicht eindeutig zugeordnet werden.



**Abbildung 9:** 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von Hydramacin-1. Die Resonanzen sind mit Namen (Ein-Buchstaben-Code) und sequentieller Position der jeweils zugehörigen Aminosäure beschriftet. Resonanzen innerhalb des Kreises gehören zu den Amidprotonen der Imino-Gruppen der Tryptophan-Seitenketten. Die Aminprotonenresonanzen der Seitenketten von Asparagin und Glutamin sind jeweils mit durchgängigen beziehungsweise gestrichelten Linien verbunden.

Wie bereits erwähnt, machte erst die Analyse der oben genannten Spektren die Identifizierung der im HSQC-Spektrum dargestellten Resonanzen möglich. Dennoch stellt das HSQC-Spektrum den Anfang der sequenzspezifischen Zuordnung dar, weil jede Aminosäure beziehungsweise deren stickstoffhaltige Seitenketten durch ein Resonanzsignal dargestellt wird.

Zunächst wurde im 3D-HNCA-Spektrum nach Informationen zur sequenzspezifischen Zuordnung gesucht. In diesem erfolgte die Zuordnung der chemischen Verschiebungen zweier  $C_{\alpha}$ -Atome zu jedem im HSQC-Spektrum dargestellten Frequenzwertepaar. Dabei gehört ein  $C_{\alpha}$ -Atom zur gleichen Aminosäure wie das Amidstickstoffatom auf dessen Frequenz die beiden  $C_{\alpha}$ -Atome lagen. Das andere  $C_{\alpha}$ -Atom gehört zum N-terminalen Nachbarn dieser Aminosäure. Somit werden im 3D-HNCA-Spektrum die chemischen Verschiebungen der  $C_{\alpha}$ -Atome der Aminosäuren  $i$  und  $i-1$  mit den chemischen Verschiebungen des Amidprotons und des Amidstickstoffatoms der Aminosäure  $i$  korreliert. Auf Grund dieses Zusammenhangs führten die in der Abbildung 10 dargestellten Resonanzen aus Ausschnitten des 3D-HNCA-Spektrums zur Identifikation von vier sequentiell benachbarten Aminosäuren. Die Kette beginnt bei den Resonanzen der Aminosäure mit der relativen Primärstrukturposition  $i$ , und wird in Richtung des N-Terminus fortgeführt, wobei die nachfolgenden Aminosäuren beziehungsweise die entsprechend zugehörigen Resonanzen durch  $i-1$ ,  $i-2$  usw. gekennzeichnet sind. Diese Bezeichnung gilt gleichermaßen für alle anderen in diesem Abschnitt dargestellten Spektren.

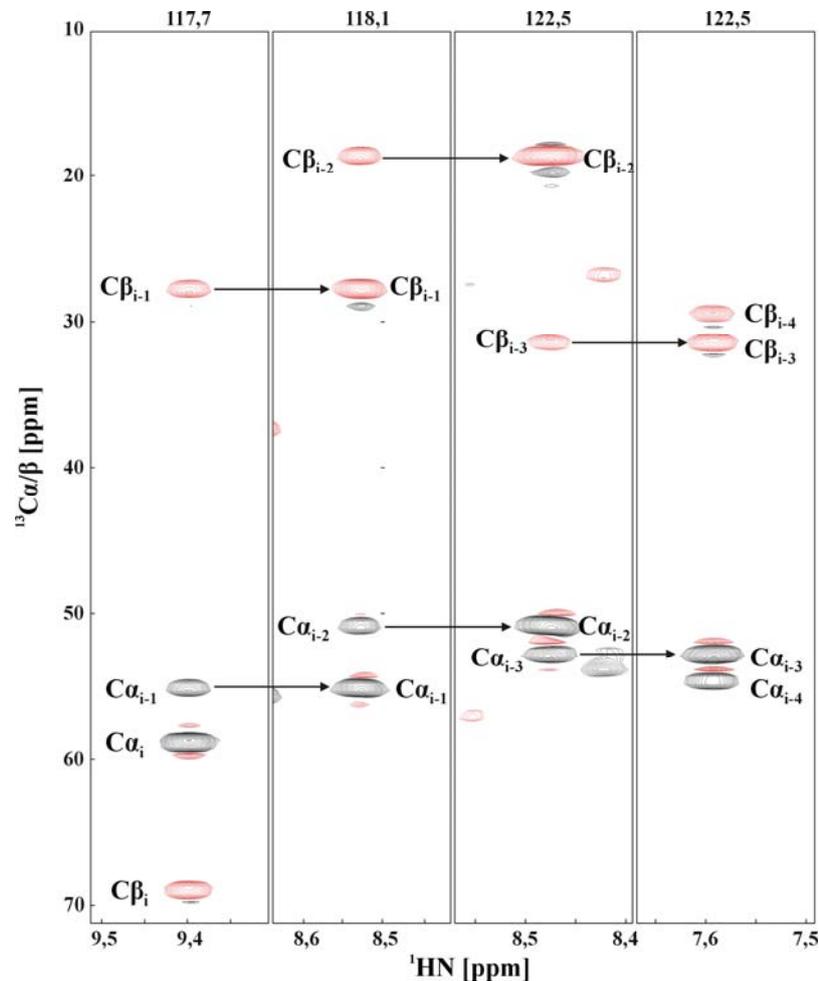


**Abbildung 10: Identifizierung sequentiell benachbarter Aminosäuren im HNCA-Spektrum.** In den vier Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des 3D-Spektrums, welcher durch die Amidstickstofffrequenz (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) definiert wird, dargestellt. Sie repräsentieren den Zusammenhang zwischen den Resonanzen von vier sequentiell benachbarten Aminosäuren.

Die Verknüpfung der vier Aminosäurereste konnte mit Hilfe des 3D-CBCANH-Spektrums sowie des 3D-CBCA(CO)NH-Spektrums verifiziert werden. Das 3D-CBCANH-Spektrum enthält dieselbe Information wie das 3D-HNCA-Spektrum, zusätzlich werden jedoch auch die Resonanzen der  $\text{C}_\beta$ -Atome detektiert. Somit werden im 3D-CBCANH-Spektrum die chemischen Verschiebungen der  $\text{C}_\alpha$ - und  $\text{C}_\beta$ -Atome der Aminosäuren  $i$  und  $i-1$  mit den chemischen Verschiebungen des Amidprotons und des Amidstickstoffatoms der Aminosäure  $i$  korreliert.

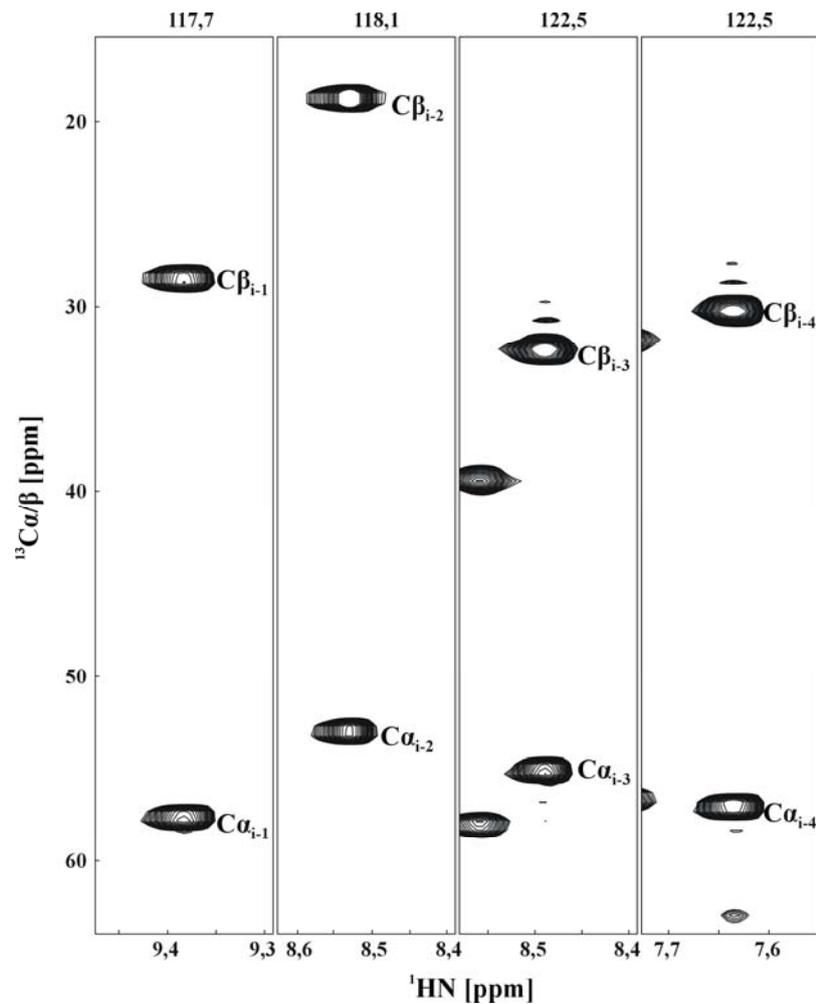
Die Resonanzen der  $\text{C}_\alpha$ -Atome zeigen im 3D-CBCANH-Spektrum, welches in Abbildung 11 dargestellt ist, den gleichen Zusammenhang, wie im 3D-HNCA-Spektrum. Zusätzlich

verifiziert der Zusammenhang zwischen den Resonanzen der  $C_{\beta}$ -Atome die sequentielle Nachbarschaft der entsprechenden vier Aminosäurereste.



**Abbildung 11: Identifizierung sequentiell benachbarter Aminosäuren im CBCANH-Spektrum.** In den vier Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des 3D-Spektrums, welcher durch die Amidstickstofffrequenz (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) definiert wird, dargestellt. Sie zeigen die Verbindung zwischen den Resonanzen von vier sequentiell benachbarten Aminosäuren.

Die Differenzierung der im 3D-CBCANH-Spektrum dargestellten Resonanzen der  $C_{\alpha}$ - und  $C_{\beta}$ -Atome von den beiden Aminosäuren  $i$  und  $i-1$  erfolgte mit Hilfe des 3D-CBCA(CO)NH-Spektrums. In diesem werden nur die chemischen Verschiebungen der  $C_{\alpha}$ - und  $C_{\beta}$ -Atome der Aminosäure  $i-1$  mit den chemischen Verschiebungen des Amidprotons und des Amidstickstoffatoms der Aminosäure  $i$  korreliert. Das 3D-CBCA(CO)NH-Spektrum ist in Auszügen in Abbildung 12 dargestellt.

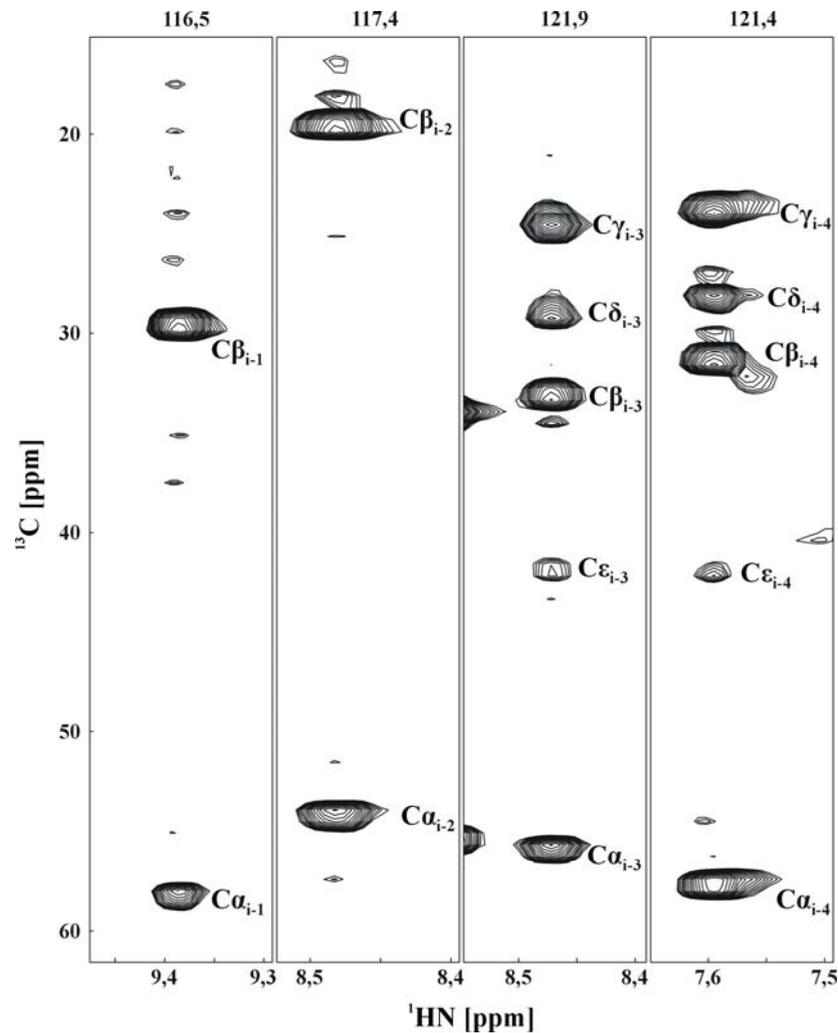


**Abbildung 12:** Darstellung der Resonanzen der  $\text{C}_\alpha$ - und  $\text{C}_\beta$ -Atome von vier sequentiell benachbarten Aminosäuren im CBCA(CO)NH-Spektrum. In den vier Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des 3D-Spektrums, welcher durch die Amidstickstofffrequenz (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) definiert wird, dargestellt.

Als nächstes wurde mit Hilfe des 3D-(H)C(CO)NH-Spektrums überprüft, wieviele Kohlenstoffatome in den Seitenketten des jeweiligen N-terminalen Nachbarn von jeder der vier sequentiell benachbarten Aminosäuren enthalten sind. Das 3D-(H)C(CO)NH-Spektrum korreliert die chemischen Verschiebungen des  $\text{C}_\alpha$ -Atoms sowie der Kohlenstoffatome der Seitenkette der Aminosäure  $i-1$  mit den chemischen Verschiebungen des Amidprotons und des Amidstickstoffs der Aminosäure  $i$ .

Das 3D-(H)C(CO)NH-Spektrum zeigte, dass in dem gesuchten Aminosäuresequenzabschnitt zwei benachbarte Aminosäuren vorkommen mussten, welche neben dem  $\text{C}_\alpha$ -Atom noch vier Kohlenstoffatome in ihren Seitenketten besitzen (Abb. 13). Dafür kamen ausschließlich die Aminosäuren Leucin, Isoleucin sowie Lysin in Betracht. Des Weiteren deuteten die weit auseinanderliegenden Resonanzen für die Aminosäure in der Position  $i-2$  darauf hin, dass es

sich bei diesen um die Resonanzen des  $C_{\alpha}$ - und  $C_{\beta}$ -Atoms der Aminosäure Alanin handeln könnte.



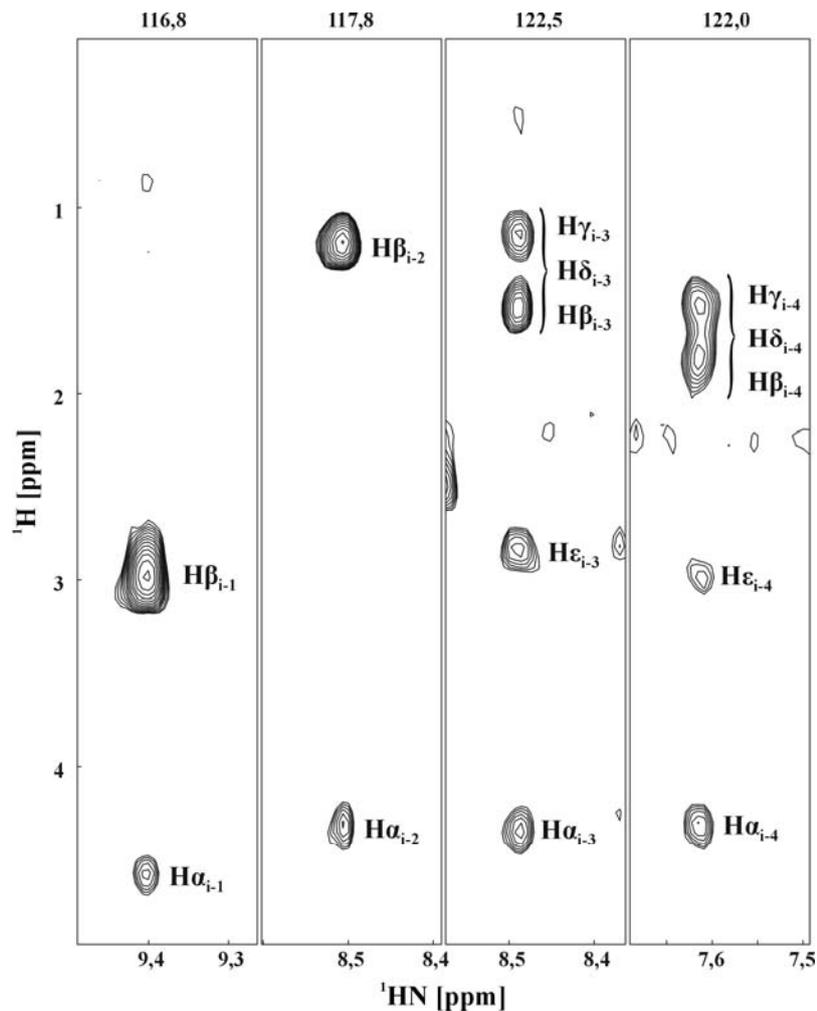
**Abbildung 13: Darstellung der Resonanzen der Kohlenstoffatome aus den Seitenketten von vier sequentiell benachbarten Aminosäuren im (H)C(CO)NH-Spektrum.** In den vier Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des 3D-Spektrums, welcher durch die Amidstickstofffrequenz (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) definiert wird, dargestellt.

Der Vergleich mit der Primärstruktur von Hydramacin-1 zeigte, dass die gesuchte Konstellation nur einmal, in Form zweier benachbarter Lysine an den Positionen 52 beziehungsweise 53, vorkam. Weiterhin enthält Hydramacin-1 insgesamt nur ein Alanin. Dieses ist direkt benachbart mit den beiden Lysinen und liegt an Position 54. Somit genügte in diesem Fall bereits die Auswertung der Informationen des 3D-(H)C(CO)NH-Spektrums, um die Aminosäuren eindeutig zu identifizieren. Es handelte sich um die Sequenz K53-A54-

W55-T56. In vielen anderen Fällen war der Informationsgehalt des 3D-(H)C(CO)NH-Spektrums jedoch nicht ausreichend. Für diese konnten weitere Informationen aus dem 3D-H(CCO)NH-Spektrum entnommen werden. Dieses Spektrum ist in Auszügen in Abbildung 14 veranschaulicht.

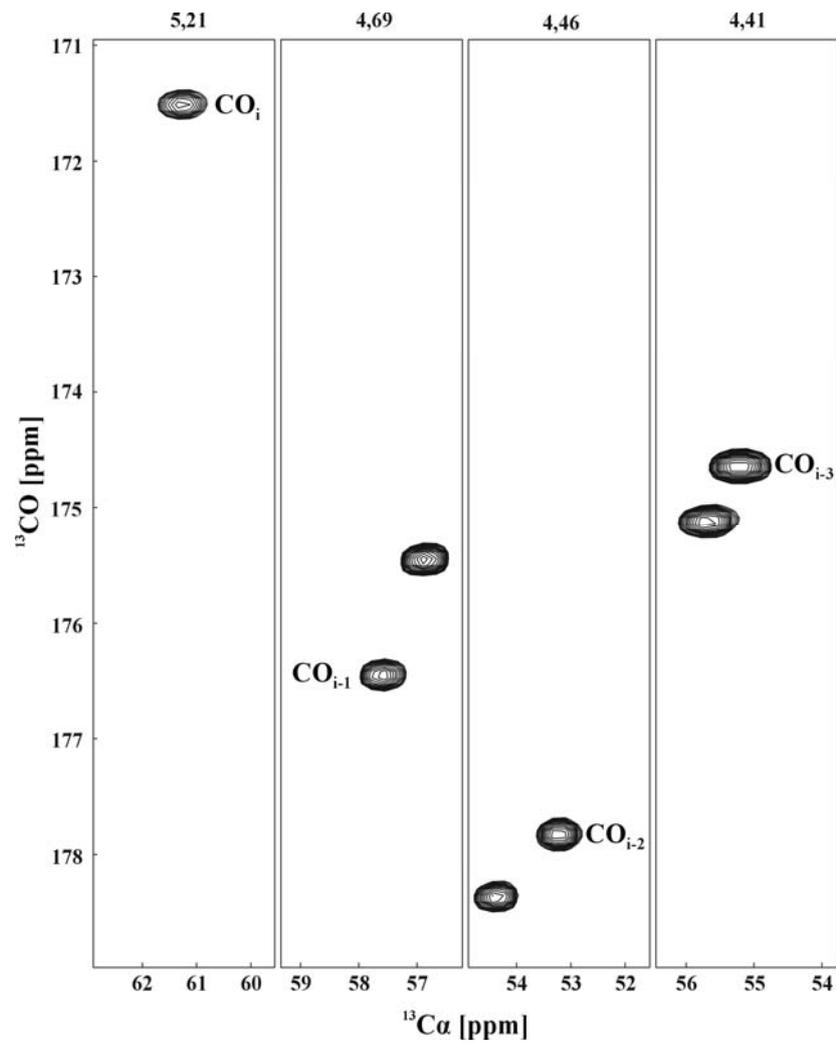
Die am 3D-(H)C(CO)NH-Spektrum erfolgte Identifizierung der vier sequentiell benachbarten Aminosäurereste konnte mit Hilfe des 3D-H(CCO)NH-Spektrums verifiziert werden. Dieses korreliert die chemischen Verschiebungen aller Wasserstoffatome der Aminosäure *i-1* mit den chemischen Verschiebungen des Amidprotons und des Amidstickstoffatoms der Aminosäure *i*. Das heißt neben der Information über die Anzahl der in den Seitenketten enthaltenen Kohlenstoffatome konnte auch die Anzahl der vorhandenen Seitenketten-Protonen bestimmt werden.

Die Anzahl der im 3D-H(CCO)NH-Spektrum beobachteten Resonanzen zeigt, dass die Aminosäuren an den Positionen *i-1* und *i-2* sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Protonen besitzen. Dies korreliert mit den erwarteten Resonanzen für die Aminosäuren Tryptophan beziehungsweise Alanin. Die Aminosäuren *i-3* und *i-4* zeigen jeweils vier Signale und somit ein Signal weniger als theoretisch für Lysin zu erwarten ist. Diese Beobachtung lässt sich durch Überlagerung der jeweiligen Signale erklären. Jedoch zeigt das Spektrum für beide Aminosäuren ein deutliches Signal bei einer chemischen Verschiebung in der Größenordnung von ca. 3 ppm, wobei es sich um die mittlere chemische Verschiebung des  $\epsilon$ -Protons handeln konnte. Die nach Auswertung des 3D-(H)C(CO)NH vorgeschlagenen alternativen Aminosäuren Leucin und Isoleucin für die Positionen *i-3* beziehungsweise *i-4*, lassen bei der chemischen Verschiebung von 3 ppm kein Signal erwarten. Dadurch wird die bisherige Identifizierung der vier Aminosäuren bestätigt. Eine eindeutige Aussage bezüglich der tatsächlichen Lage der chemischen Verschiebungen aller Seitenketten-Protonen lässt sich jedoch erst durch die Auswertung der TOCSY-Spektren treffen (siehe unten).



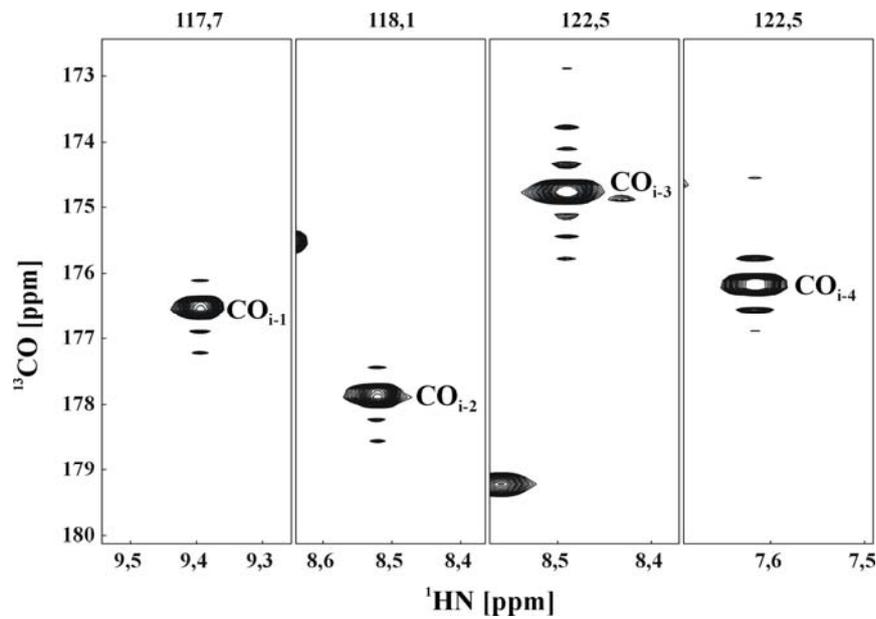
**Abbildung 14: Darstellung der Resonanzen der Protonen aus den Seitenketten von vier sequentiell benachbarten Aminosäuren im H(CCO)NH-Spektrum.** In den vier Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des 3D-Spektrums, welcher durch die Amidstickstofffrequenz (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) definiert wird, dargestellt.

Die aus dem 3D-H(CCO)NH-Spektrum gewonnene Kenntnis über die chemischen Verschiebungen der  $\alpha$ -Protonen bot zusätzlich die Möglichkeit, die bereits getätigte sequenzspezifische Zuordnung an Hand der folgenden Spektren zu verifizieren. Im 3D-HCACO-Spektrum werden die chemischen Verschiebungen des Carbonylkohlenstoffatoms, des  $C_{\alpha}$ -Atoms und des  $H_{\alpha}$ -Atoms von jeweils derselben Aminosäure miteinander korreliert. Das heißt den bereits identifizierten  $C_{\alpha}$ - und  $H_{\alpha}$ -Frequenzen der Aminosäure  $i$  konnte nun zusätzlich die Frequenz ihres Carbonylkohlenstoffs zugeordnet werden. Entsprechende Abschnitte des 3D-HCACO-Spektrums sind in der Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15: Darstellung der Resonanzen der Carbonylkohlenstoffatome von vier sequentiell benachbarten Aminosäuren im HCACO-Spektrum.** In den vier Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des 3D-Spektrums, welcher durch die  $\alpha$ -Protonenfrequenz (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) definiert wird, dargestellt.

Die identifizierte chemische Verschiebung des Carbonylkohlenstoffatoms der Aminosäure  $i-1$  wird wiederum im 3D-HNCO-Spektrum mit den chemischen Verschiebungen des Amidprotons und des Amidstickstoffs der Aminosäure  $i$  korreliert. Entsprechende Abschnitte des 3D-HNCO-Spektrums sind in Abbildung 16 gezeigt.



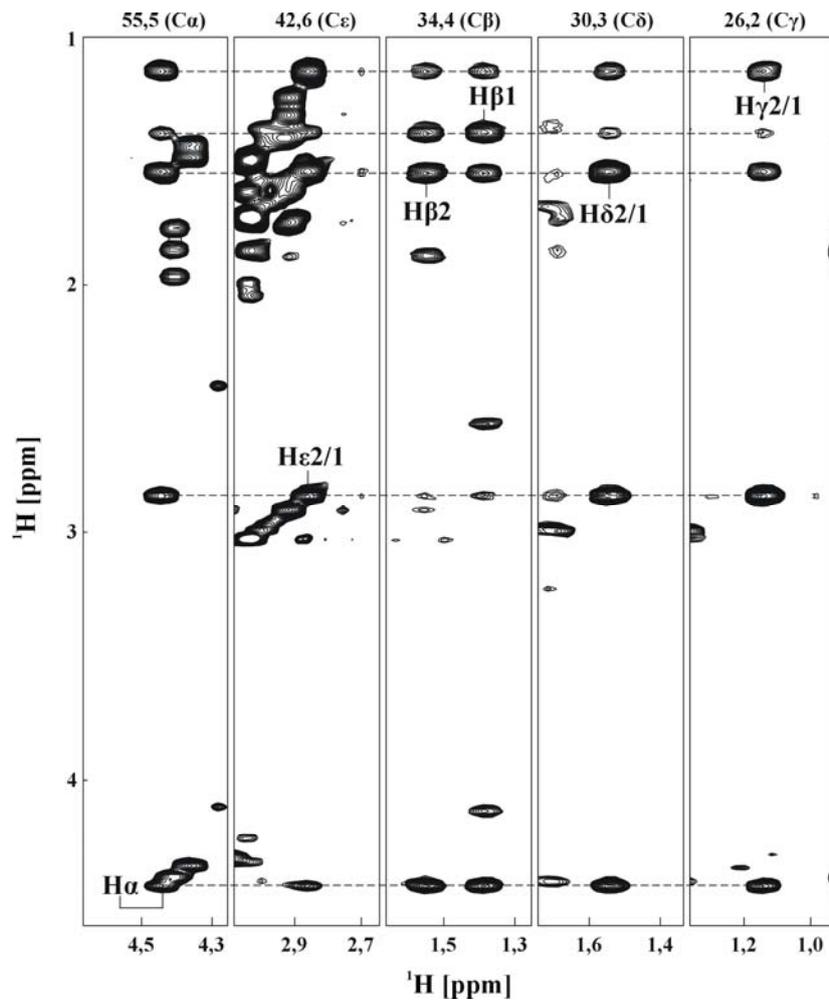
**Abbildung 16:** Darstellung der Resonanzen der Carbonylkohlenstoffatome von vier sequentiell benachbarten Aminosäuren im HNCO-Spektrum. In den vier Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des 3D-Spektrums, welcher durch die Amidstickstofffrequenz (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) definiert wird, dargestellt.

Die chemischen Verschiebungen des Amidprotons und des Amidstickstoffatoms der Aminosäure  $i$  werden ihrerseits im 3D-HNCA-Spektrum sowie im 3D-CBCANH-, im 3D-CBCA(CO)NH- und im 3D-(H)C(CO)NH-Spektrum mit einer entsprechenden  $\text{C}_\alpha$ -Frequenz von den Aminosäuren  $i$  beziehungsweise  $i-1$  korreliert. Das heißt, die im 3D-HCACO gefundenen korrelierenden chemischen Verschiebungen des  $\text{C}_\alpha$ -Atoms und des Carbonylkohlenstoffatoms der Aminosäure  $i-1$  mussten jeweils im 3D-HNCO- sowie im 3D-HNCA-Spektrum zu denselben Werten der chemischen Verschiebungen des Amidprotons und des Amidstickstoffatoms für die Aminosäure  $i$  führen. Diese Korrelation ist im Überblick in der Tabelle 4 für die Aminosäuren  $i$  und  $i-1$  dargestellt und konnte für alle 60 Aminosäuren von Hydramacin-1 verifiziert werden.

**Tabelle 4: Verifizierung der Identifikation von zwei sequentiell benachbarten Aminosäuren.** Die beiden farblich hervorgehobenen chemischen Verschiebungen von den Atomen  $^{13}\text{C}\alpha$  und  $^{13}\text{CO}$  der Aminosäure  $i-1$  (W55), welche im 3D-HCACO-Spektrum korreliert werden, führen jeweils im 3D-HNCO und im 3D-CBCA(CO)NH zu den chemischen Verschiebungen von den Atomen  $^{15}\text{N}$  und  $^1\text{HN}$  derselben Aminosäure  $i$  (T56).

	3D-HCACO	3D-HNCO	3D-CBCA(CO)NH
$^{13}\text{C}\alpha_{i-1}$	<b>57,5 ppm</b>		<b>57,5 ppm</b>
$^1\text{H}\alpha_{i-1}$	4,69 ppm		
$^{13}\text{CO}_{i-1}$	<b>176,5 ppm</b>	<b>176,5 ppm</b>	
$^{15}\text{N}_i$		<b>117,7 ppm</b>	<b>117,7 ppm</b>
$^1\text{HN}_i$		<b>9,4 ppm</b>	<b>9,4 ppm</b>

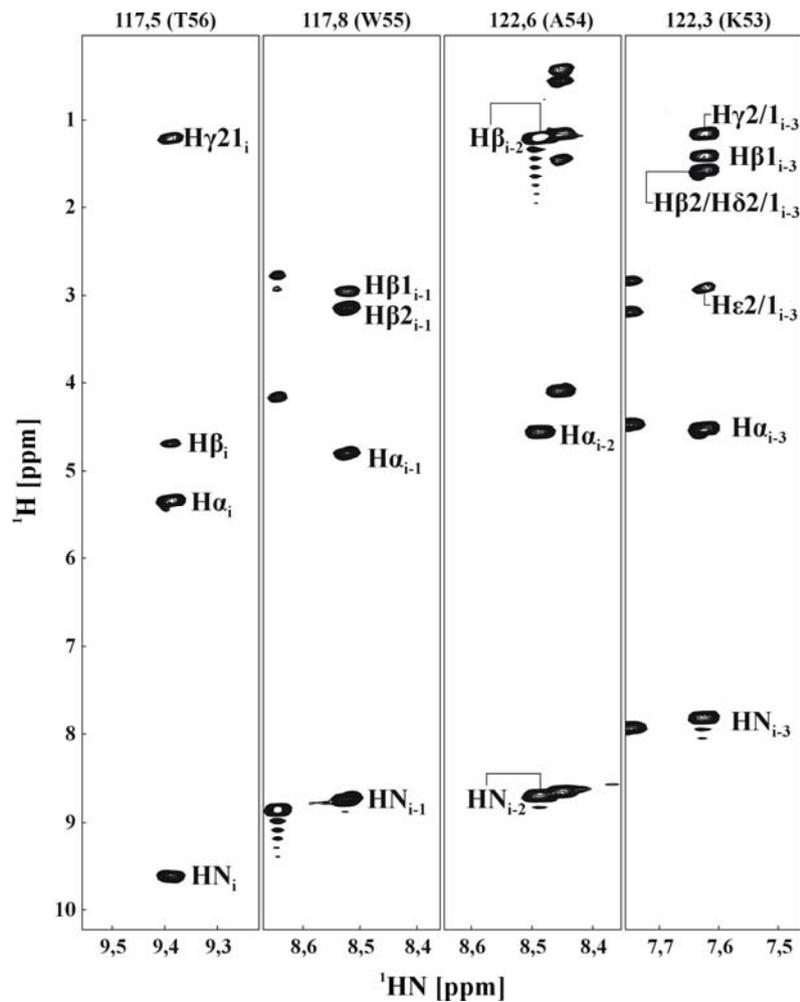
Den Abschluss der sequenzspezifischen Zuordnung bildete die Zuordnung der Resonanzen in den  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -editierten 3D-TOCSY-Spektren. Im  $^{13}\text{C}$ -editierten 3D-TOCSY-Spektrum werden die chemischen Verschiebungen aller kohlenstoffgebundenen Wasserstoffatome einer Aminosäure untereinander sowie mit den chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome dieser Aminosäure korreliert. In Abbildung 17 wird die Zuordnung ausschließlich am Beispiel der Aminosäure K53 dargestellt. Auf Grund des enormen Informationsgehaltes des  $^{13}\text{C}$ -editierten 3D-TOCSY-Spektrums und den damit benötigten Platz zur Darstellung der entsprechenden Resonanzen werden die anderen bisher präsentierten Aminosäuren (A54, W55 und T56) vernachlässigt. Die Beschriftung der jeweiligen Resonanzen in den beiden 3D-TOCSY-Spektren orientiert sich an den statistisch gemittelten Werten von beinahe 170000 chemischen Verschiebungen, welche bis zum 02. Februar 1999 in der BMRB(engl. *Biological Magnetic Resonance Data Bank*)-Datenbank hinterlegt wurden [75]. In Abbildung 17 lässt sich bei den chemischen Verschiebungen der jeweilig betrachteten Kohlenstoffatome des Lysins 53, deren Werte aus dem 3D-(H)C(CO)NH-Spektrum stammen, jeweils das gleiche Muster der chemischen Verschiebungen der im Lysin enthaltenen Protonen erkennen. Dabei zeigen die Signale eine deutliche Überlagerung der chemischen Verschiebungen des  $\text{H}\beta_2$ -Atoms und der  $\text{H}\delta_{2/1}$ -Atome. Dies konnte erst durch die Entzerrung der Signale in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension entschlüsselt werden und erklärte die im 3D-H(CCO)NH-Spektrum (Abb. 14) getätigten Beobachtungen.



**Abbildung 17:** Darstellung der Resonanzen der Protonen aus der Seitenkette der Aminosäure Lysin 53 im  $^{13}\text{C}$ -editierten TOCSY-Spektrum. In den fünf Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des 3D-Spektrums, welcher durch die Frequenzen (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) der jeweiligen Kohlenstoffatome des Lysinrestes (Bezeichnung in Klammern oberhalb der Rechtecke angegeben) definiert wird, dargestellt.

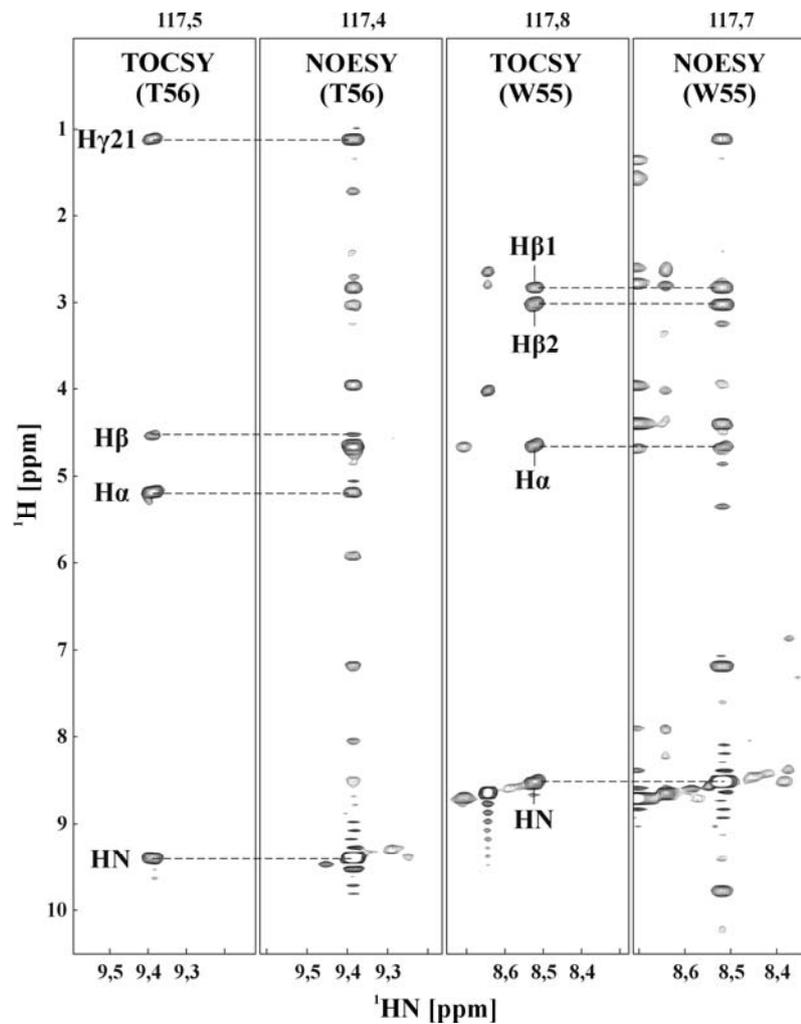
Im  $^{15}\text{N}$ -editierten 3D-TOCSY-Spektrum werden die chemischen Verschiebungen aller kohlenstoffgebundenen Wasserstoffatome einer Aminosäure mit den chemischen Verschiebungen ihres Amidprotons und ihres Amidstickstoffatoms korreliert. In der Abbildung 18, welche Abschnitte des  $^{15}\text{N}$ -editierten 3D-TOCSY-Spektrums zeigt, sind neben der Zuordnung der Resonanzen für die Aminosäure K53 auch wieder die Aminosäuren A54, W55 und T56 berücksichtigt.

Die im 3D-H(CCO)NH-Spektrum (Abb. 14) beobachteten und im  $^{13}\text{C}$ -editierten TOCSY-Spektrum (Abb. 17) entschlüsselten Überlagerungen treten ebenfalls im  $^{15}\text{N}$ -editierten TOCSY-Spektrum auf. Ihre Zuordnung erfolgte gemäß der Zuordnung im  $^{13}\text{C}$ -editierten TOCSY-Spektrum.



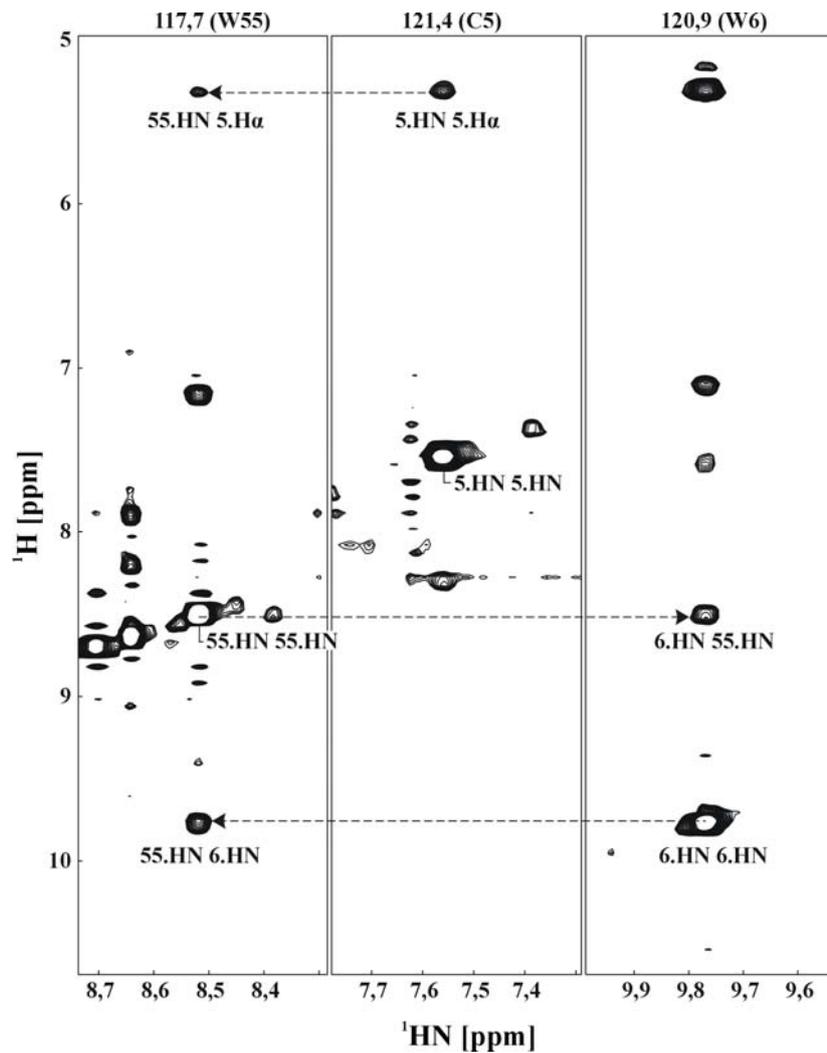
**Abbildung 18: Darstellung der Resonanzen von Protonen der Seitenketten der Aminosäuren K53, A54, W55 und T56 im  $^{15}\text{N}$ -editierten TOCSY-Spektrum.** In den vier Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des 3D-Spektrums, welcher durch die Amidstickstofffrequenz (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) der jeweiligen Aminosäure (Name und Sequenzposition in Klammern oberhalb der Rechtecke angegeben) definiert wird, dargestellt.

Die Übertragung der in den TOCSY-Spektren identifizierten Resonanzen in die  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -editierten 3D-NOESY-Spektren ermöglichte die Differenzierung zwischen intra- und interresidualen NOE-Signalen. Dies ist in Abbildung 19 beispielhaft an den  $^{15}\text{N}$ -editierten 3D-NOESY-Spektren der Aminosäuren T56 und W55 dargestellt. Auf die gleiche Art und Weise wurden die Resonanzen in den  $^{13}\text{C}$ -editierten 3D-TOCSY und 3D-NOESY-Spektren verglichen und zugeordnet (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich der beiden in Abbildung 19 dargestellten Spektrenausschnitte lässt eine große Anzahl von interresidualen Resonanzen bei beiden Aminosäuren erkennen.



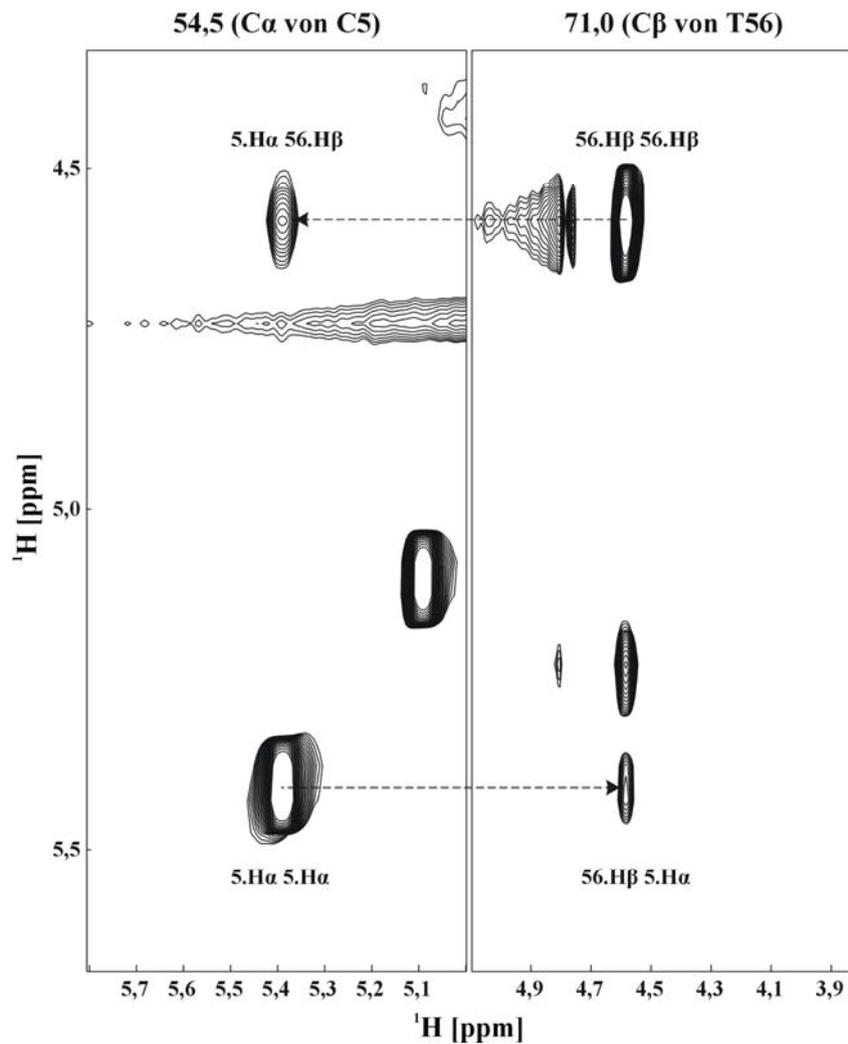
**Abbildung 19: Differenzierung von intra- und interresidualen NOE-Signalen bei den Aminosäuren T56 und W55.** In den vier Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des  $^{15}\text{N}$ -editierten 3D-TOCSY-beziehungsweise des  $^{15}\text{N}$ -editierten 3D-NOESY-Spektrums, welcher durch die Amidstickstofffrequenz (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) der jeweiligen Aminosäure (Name und Sequenzposition in Klammern innerhalb der Rechtecke angegeben) definiert wird, dargestellt.

Nach der Differenzierung der intra- und interresidualen Resonanzen erfolgte die Analyse der 3D-NOESY-Spektren nach strukturelevanten NOE-Signalen. Dabei konnten aus dem  $^{15}\text{N}$ -editierten 3D-NOESY-Spektrum ausschließlich Kontakte, welche zwischen den Protonen der Aminosäurereste und den Amidprotonen beziehungsweise zwischen den Amidprotonen untereinander vorlagen, identifiziert werden. So zeigt das Amidproton der Aminosäure W55 zwei interresiduale *long range* NOE-Signale mit dem  $\alpha$ -Proton sowie dem Amidproton der Aminosäuren C5 und W6, welche bezüglich der Primärstruktur weit vom W55 entfernt sind (Abb. 20).



**Abbildung 20: Identifizierung von interresidualen *long range* NOE-Signalen zwischen den Aminosäuren W55, C5 und W6 im  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektrum.** In den drei Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des Spektrums, welcher durch die Amidstickstofffrequenz (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) der jeweiligen Aminosäure (Name und Sequenzposition in Klammern oberhalb der Rechtecke angegeben) definiert wird, dargestellt. Entsprechende Resonanzen sind mit den Bezeichnungen der in Wechselwirkung stehenden Atome beschriftet.

Die aus dem  $^{15}\text{N}$ -editierten 3D-NOESY-Spektrum gewonnenen Informationen gaben vorrangig Aufschluss über die Konformation des Proteinerückgrats. Mit Hilfe des  $^{13}\text{C}$ -editierten 3D-NOESY-Spektrums konnten die strukturellen Informationen um die Kontakte, welche zwischen den Protonen der Aminosäurereste untereinander bestanden, erweitert werden. So zeigt das  $\alpha$ -Proton der Aminosäure C5 ein interresiduales NOE-Signal mit dem  $\beta$ -Proton der Aminosäure T56, welche bezüglich der Primärstruktur weit vom C5 entfernt ist. Dies ist in Abbildung 21 dargestellt.



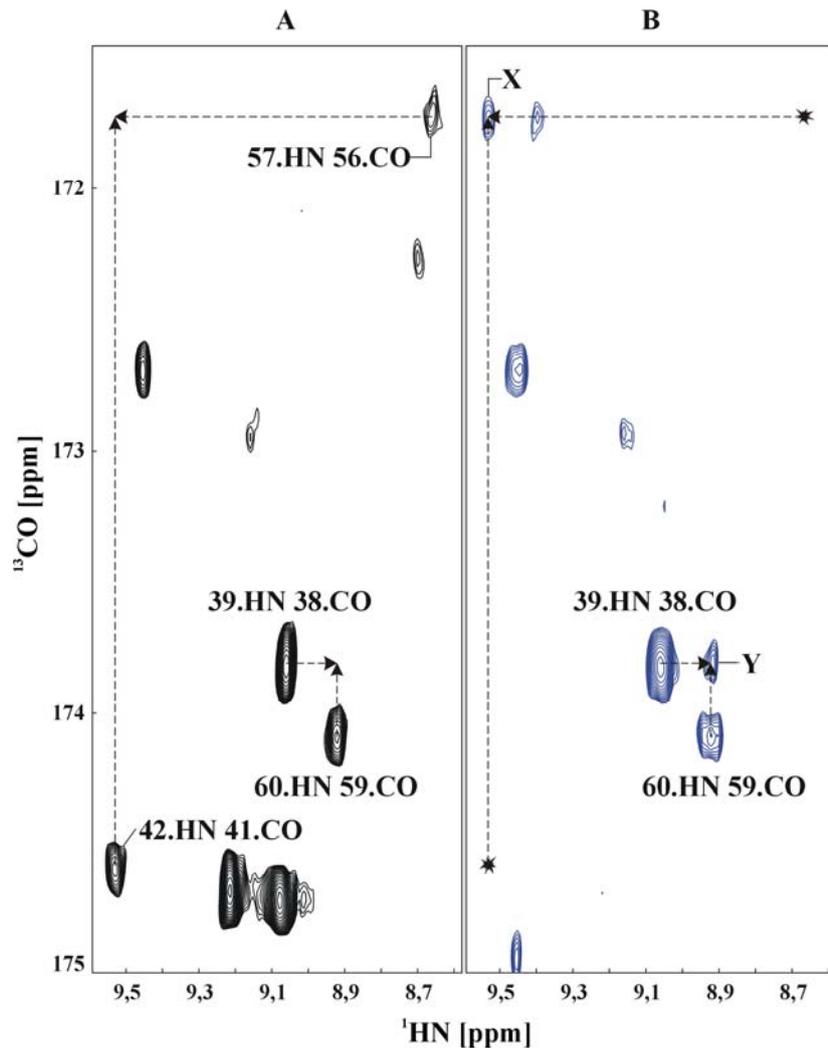
**Abbildung 21: Identifizierung eines interresidualen *long range* NOE-Signals zwischen den Aminosäuren C5 und T56 im  $^{13}\text{C}$ -editierten NOESY-Spektrum.** In den beiden Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus einem Ausschnitt des Spektrums, welcher durch die Frequenz (oberhalb der Rechtecke angegeben in ppm) des  $\alpha$ - beziehungsweise  $\beta$ -Kohlenstoffatoms (Bezeichnung in Klammern oberhalb der Rechtecke angegeben) der jeweiligen Aminosäure definiert wird, dargestellt.

Nach dem Muster, der in den beiden Abbildungen 20 und 21 dargestellten Beispiele, erfolgte die Identifikation weiterer interresidualer NOE-Signale zwischen den Atomen der anderen im Hydramacin-1 enthaltenen Aminosäuren.

Des Weiteren konnte durch Vergleich der beiden 2D-HNCO-Spektren, welche auszugsweise in der Abbildung 22 dargestellt sind, zehn Wasserstoffbrücken identifiziert werden. Die Wasserstoffbrücken führten zu einem intermolekularen Transfer von Magnetisierung. Dadurch verloren die Resonanzen der entsprechenden Atome aus den beteiligten funktionellen Gruppen, welche eine Wasserstoffbrücke ausbilden, an Intensität. Gleichzeitig

entstanden neue Resonanzen, die jeweils auf der chemischen Verschiebung des Carbonylkohlenstoffatoms der Protonenakzeptorfunktion beziehungsweise auf der chemischen Verschiebung des Amidprotons der Protonendonatorfunktion lagen.

In der Abbildung 22 ist beispielhaft die Identifizierung der von zwei Wasserstoffbrücken verursachten Resonanzen dargestellt. Im Spektrum B – aufgenommen nach verlängerter Dephasierung – lassen sich unter anderem die beiden neuen Resonanzen, bezeichnet mit *X* und *Y*, detektieren. Die Resonanz *X* lag auf der chemischen Verschiebung des Carbonylkohlenstoffatoms der Aminosäure T56 sowie auf der chemischen Verschiebung des Amidprotons der Aminosäure E42. Gleichzeitig waren die Resonanzen von 42.HN-41.CO und 57.HN-56.CO im Spektrum B nicht mehr präsent. Die mit *Y* bezeichnete Resonanz lag auf der chemischen Verschiebung des Carbonylkohlenstoffatoms der Aminosäure R38 sowie auf der chemischen Verschiebung des Amidprotons der Aminosäure Y60. Im Gegensatz zum ersten beschriebenen Fall waren die Resonanzen von 39.HN-38.CO und 60.HN-59.CO jedoch weiterhin vorhanden. In beiden Fällen zeigen die neuen Resonanzen eine zwischen den entsprechenden funktionellen Gruppen liegende Wasserstoffbrücke auf.



**Abbildung 22: Identifizierung von Wasserstoffbrücken im HNCO-Spektrum.**

In den beiden Rechtecken sind jeweils die Resonanzen aus demselben Ausschnitt der Spektren (A) vor und (B) nach dem Magnetisierungstransfer über die Wasserstoffbrücken dargestellt.

Neben den aus den NMR-Spektren für die spätere Strukturberechnung gewonnenen Randbedingungen in Form von Abstandsvorgaben wurde von Dr. Christoph Gelhaus mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie eine Analyse der Cysteinseitenkettenverknüpfungen durchgeführt.

Das Massenspektrum der nicht-reduzierten Form von Hydramacin-1 wies im Vergleich zum Spektrum der reduzierten und alkylierten Form eine Reihe von zusätzlichen Massen auf (Daten nicht gezeigt). Diese gehörten zu den Peptidfragmenten, welche über eine Disulfidbrücke verbunden waren. Ihre Masse entsprach somit der Summe der Massen von den jeweils miteinander verbundenen Fragmenten minus der Massen von zwei Wasserstoffatomen, wegen des Wasserstoff-Defizits der oxidierten Cysteine. Solche Peptide, die mutmaßlich eine intermolekulare Disulfidbrücke beinhalteten, wurden mittels Tandem-

Massenspektrometrie fragmentiert und die entsprechenden Fragmentierungsmuster mittels der Web-basierten Software *SearchXLinks* [39] analysiert. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung, dass jeweils die Cysteine an den Positionen 5 und 48 sowie an den Positionen 12 und 41 eine Disulfidbrücke ausbilden. Des Weiteren kann ausgeschlossen werden, dass die Cysteine an den Positionen 27 und 31 sowie 57 und 59 jeweils über ein Disulfidbrücke verbunden sind.

Vorläufige Strukturberechnungen, welche mit den aus den NMR-Spektren und der MALDI-TOF-Massenspektrometrie vorgegebenen Randbedingungen durchgeführt wurden, ergaben schließlich nur noch eine mögliche Verknüpfung der verbliebenen vier Cysteinreste. Einerseits bilden die Cysteine an den Positionen 27 und 57 eine Disulfidbrücke und andererseits die Cysteine an den Positionen 31 und 59.

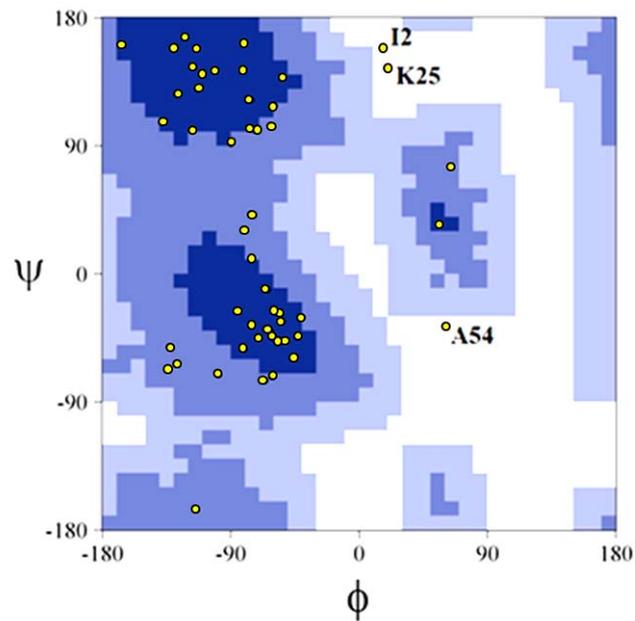
Letztendlich konnten insgesamt 1090 Atomabstände identifiziert werden, welche in der Tabelle 5 zusammengefasst sind. Auf deren Grundlage erfolgte die Berechnung von 500 Strukturen mit dem Programm CYANA [66]. Von diesen wurden 20 Strukturen, welche die vorgegebenen Randbedingungen am Besten erfüllten, ausgewählt und zur Berechnung einer mittleren Struktur von Hydramacin-1 verwendet. Die Analyse der Diederwinkelpaare des Proteinrückgrats der mittleren Struktur von Hydramacin-1 nach Ramachandran [76] ist ebenfalls in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Statistik der Strukturberechnung der 20 besten Konformere von Hydramacin-1.** Die teilweise aufgetretenen Abweichungen von den Abstandsvorgaben lagen in allen Strukturen unterhalb von 0,5 Å. Rmsd = *Root mean square deviation*.

<b><i>Abstandsvorgaben</i></b>	<b><i>Anzahl</i></b>
<b>Intraresidual (<math> i-j  = 0</math>)</b>	521
<b>Sequentiell (<math> i-j  = 1</math>)</b>	179
<b><i>medium-range</i> (<math>2 \leq  i-j  \leq 4</math>)</b>	84
<b><i>long-range</i> (<math> i-j  \geq 5</math>)</b>	262
<b>Wasserstoffbrücken</b>	20
<b>Disulfidbrücken</b>	24
<b>Insgesamt</b>	1090
<b><i>Paarweise rmsd</i></b>	
<b>Mittlere rmsd des Rückgrats</b>	1.13±0.15 Å
<b>Mittlere rmsd der schweren Atome</b>	1.90±0.18 Å
<b><i>Paarweise rmsd für die Sekundärstrukturbereiche*</i></b>	
<b>Mittlere rmsd des Rückgrats</b>	0.58± 0.12 Å
<b>Mittlere rmsd der schweren Atome</b>	1.23±0.21 Å
<b><i>Ramachandran-Diagramm für die mittlere Struktur</i></b>	
<b>Meistbegünstigte Bereiche (%)</b>	67,7 %
<b>Zusätzlich erlaubte Bereiche (%)</b>	27,5 %
<b>Allgemein erlaubte Bereiche (%)</b>	0,0 %
<b>Nicht erlaubte Bereiche (%)</b>	5,9 %

\*für die Bereiche 10-14, 27-33, 38-42 und 56-60

Die Abbildung 23 stellt die Diederwinkelpaare des Proteinrückgrats der mittleren Struktur von Hydramacin-1 im Ramachandran-Diagramm dar. Die weißen Flächen repräsentieren nicht erlaubte Bereiche und umfassen Konformationen mit hoher potentieller Energie. Drei Aminosäurereste von Hydramacin-1 (I2, K25 und A54) liegen bei der gegebenen mittleren Struktur in diesen nicht erlaubten Bereichen. Sie befinden sich jedoch alle jeweils nahe dem allgemein erlaubten Konformationsraum (hellblaue Fläche).

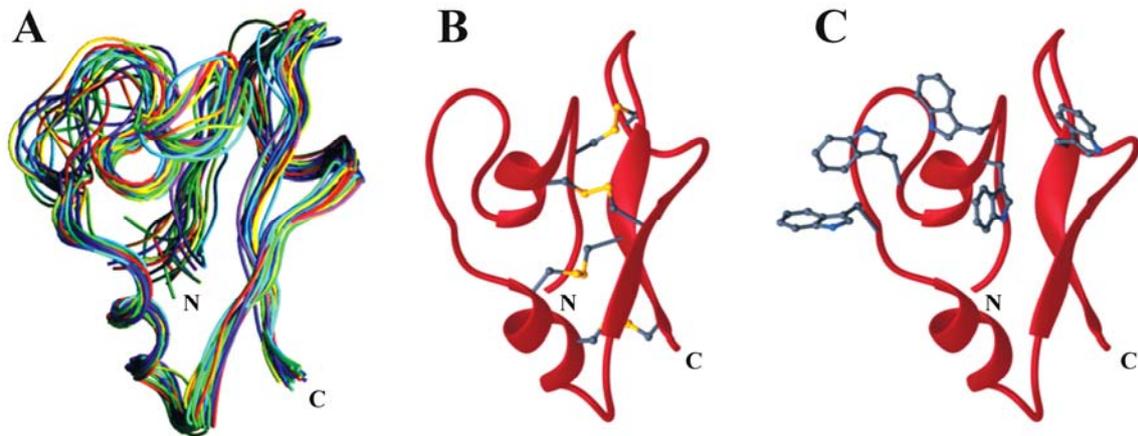


**Abbildung 23: Ramachandran-Diagramm für die mittlere Struktur von Hydramacin-1.** Die statistische Verteilung der Diederwinkelpaare des Proteinrückgrats entspricht den Angaben in Tabelle 5.

Das Ensemble der 20 besten Strukturen ist in Abbildung 24A dargestellt. Die Strukturen weichen nur in wenigen Bereichen des Moleküls, das heißt direkt am N-Terminus sowie an der N-terminal gelegenen Helix und in der Schleife zwischen den beiden Helices, voneinander ab. Dies weist auf eine größere Flexibilität des Moleküls in diesen Regionen hin.

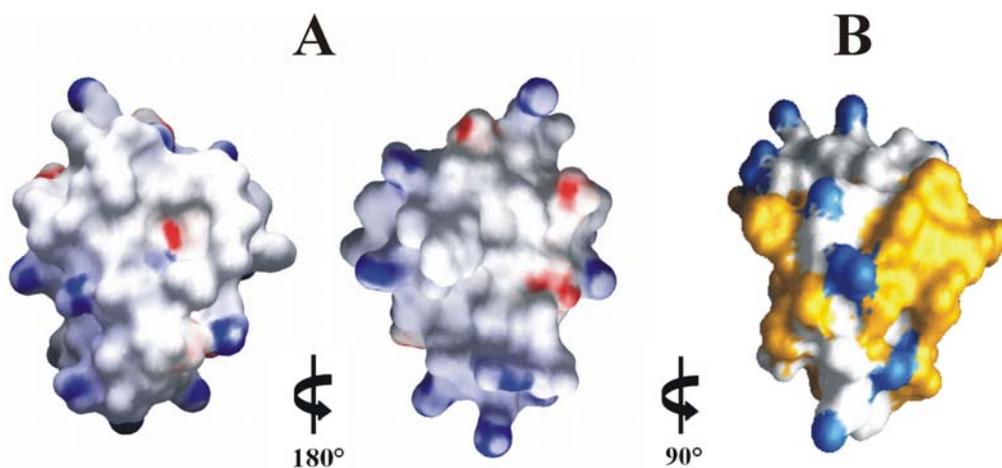
Aus den 20 besten Strukturen konnte abschließend eine mittlere Struktur von Hydramacin-1 berechnet werden, welche nachfolgend energieminiert wurde. Die mittlere Struktur ist in Abbildung 24B dargestellt. Hydramacin-1 enthält auf N-terminaler Seite zwei kleinere  $\alpha$ -Helices sowie ein C-terminal gelegenes zweisträngiges  $\beta$ -Faltblatt. In beiden Fällen werden die Sekundärstrukturelemente durch große Schleifen getrennt, wobei jene zwischen den Helices eine sehr hohe Flexibilität besitzt, was aus dem Ensemble (Abb. 24A) abgeleitet werden kann. Das Peptid wird in seinem hydrophoben Kern durch acht Cysteine, welche vier Disulfidbrücken in einer leiterförmigen Anordnung bilden, stabilisiert. Interessanterweise zeigt das Molekül eine Teilung sowohl horizontal in einen mehr und einen weniger flexiblen Bereich (Abb. 24A) als auch vertikal in einen Helix-Schleife-Helix- und einen Faltblatt-Schleife-Faltblatt-Bereich (Abb. 24B).

Hydramacin-1, wie in Abbildung 24C dargestellt, enthält fünf Tryptophane, die alle in die Umgebung des Peptids exponiert sind. Dies war für die nachfolgende Untersuchung des Wirkmechanismus von Bedeutung (siehe unten).



**Abbildung 24: Die Tertiärstruktur von Hydramacin-1.** (A) Spaghetti-Präsentation des Ensembles der 20 besten Strukturen. (B) Darstellung der mittleren Struktur von Hydramacin-1 im Bandmodell. Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt. (C) Anordnung der fünf Tryptophane in der im Bandmodell dargestellten mittleren Struktur von Hydramacin-1. N und C bezeichnen N- und C-Terminus.

Die mittlere Struktur von Hydramacin-1 erlaubte die Ableitung seines elektrostatischen Oberflächenladungspotentials, das in Abbildung 25A veranschaulicht ist. Die Betrachtung des Oberflächenladungspotentials lässt erkennen, dass die Oberfläche von Hydramacin-1 aus zwei großflächigen, ungeladenen Arealen besteht, welche durch ein Band aus positiven Ladungen voneinander getrennt sind. Die ungeladenen Flächen enthalten zudem überwiegend hydrophobe Reste (Abb. 25B).

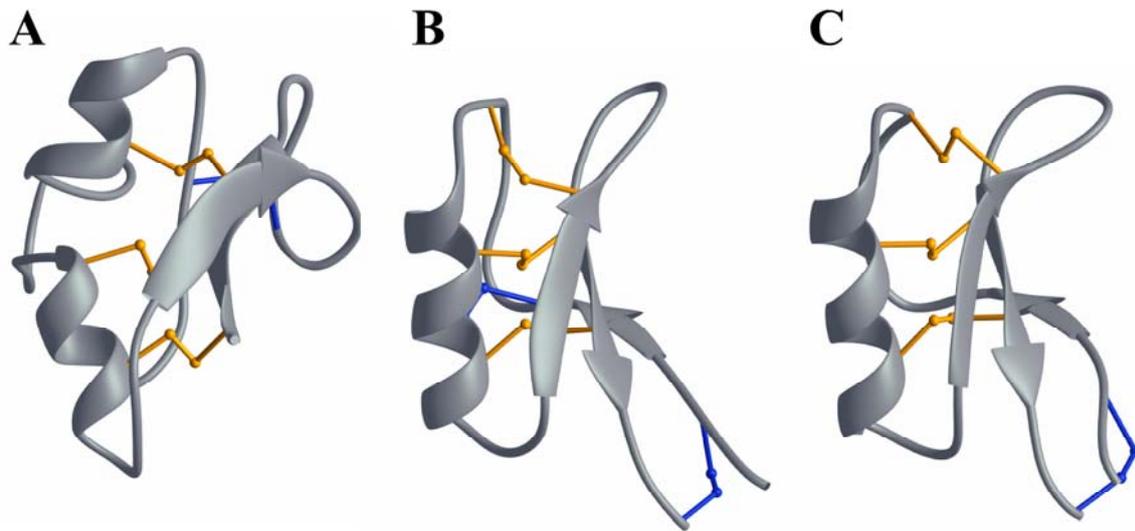


**Abbildung 25: Die molekulare Oberfläche von Hydramacin-1.** (A) Elektrostatisches Oberflächenladungspotential mit kationischen Arealen in blau und anionischen Bereichen in rot. Weiße Areale sind ungeladen. (B) Verteilung von hydrophoben (gelb) und kationischen (blau) Aminosäureresten an der Oberfläche von Hydramacin-1.

### 3.3 Vergleich der Tertiärstrukturen von Hydramacin-1 und Repräsentanten der Skorpionotoxin-ähnlichen Proteinsuperfamilie

Die mittlere Struktur von Hydramacin-1 ermöglichte es einen Vergleich mit allen im Dali-Server [77] hinterlegten Strukturen durchzuführen. Dieser Vergleich zeigte eine strukturelle Homologie zu zwei antimikrobiellen Peptiden aus Pflanzen. Es handelt sich dabei um die Defensine *Petunia hybrida defensin 1* (PhD1, pdb-Zugangscode: 1n4n) [78] und *Nicotiana glauca defensin 1* (NaD1, pdb-Zugangscode: 1mr4) [79]. Beide gehören zur Familie der Pflanzendefensine, welche die Knottin-Faltungstopologie aufweisen. Diese umfasst ein Disulfidbrücken-stabilisiertes  $\alpha/\beta$ -Motiv. Die Knottin-Faltungstopologie wird durch eine besondere Anordnung von drei Disulfidbrücken und Teilen des Proteinerückgrats charakterisiert, welche zu einem Knoten führen. Gemäß der Einordnung durch SCOP (engl. *Structural Classification of Proteins* [80]) gehört die Familie der Pflanzendefensine zur Superfamilie der Skorpionotoxin-ähnlichen Proteine in der Klasse der kleinen Proteine.

Der Vergleich der Tertiärstrukturen von Hydramacin-1 mit denen der beiden Pflanzendefensine zeigt deutlich das gemeinsame Disulfidbrücken-stabilisierte  $\alpha/\beta$ -Strukturmotiv (Abb. 26). Dieses umfasst die beiden C-terminalen  $\beta$ -Stränge, die von diesen N-terminal gelegene  $\alpha$ -Helix sowie drei Disulfidbrücken, welche zwischen den Sekundärstrukturelementen des Strukturmotivs eine leiterartige Anordnung im Kern der Moleküle vorweisen. Jedoch sind auch Strukturunterschiede zu erkennen. Hydramacin-1 besitzt eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix. Dafür ist die Helix, welche in allen drei Molekülen vorkommt, beim Hydramacin-1 um eine Windung kürzer. Auf der anderen Seite zeigen die beiden Pflanzendefensine einen zusätzlichen  $\beta$ -Strang. Ein weiterer Unterschied besteht bei den zwei großen Schleifen von Hydramacin-1. Diese sind bei den beiden Defensinen nicht vorhanden. Des Weiteren weicht die vierte Disulfidbrücke beim Hydramacin-1 deutlich von der Position der vierten beziehungsweise auch von der fünften Brücke (von PhD1) bei den Pflanzendefensinen ab.



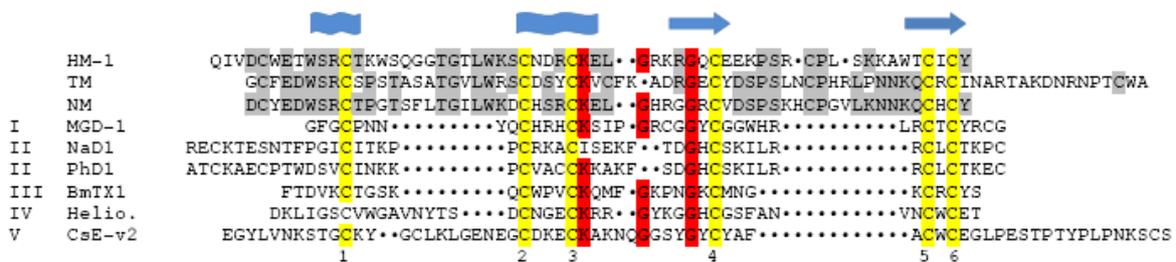
**Abbildung 26: Vergleich der Strukturen von Hydramacin-1, PhD1 und NaD1.** Bändermodelle von (A) Hydramacin-1, (B) *Petunia hybrida* Defensin 1 und (C) *Nicotiana alata* Pflanzendefensin 1. Konservierte Cysteinbrücken der Knottin-Faltungstopologie sind in gelb dargestellt, nicht konservierte Cysteinbrücken in blau.

Die Superfamilie der Skorpionotoxin-ähnlichen Proteine umfasst insgesamt fünf Familien: Die langen Skorpionotoxin-ähnlichen Proteine, die kurzen Skorpionotoxin-ähnlichen Proteine, die MGD-1 Defensin-Familie, die Insektendefensine und die bereits erwähnten Pflanzendefensine. Im Hinblick auf eine detailliertere Analyse der Disulfidbrücken wurde aus jeder dieser Familien jeweils ein repräsentatives Mitglied zu einem Strukturvergleich herangezogen. Der Vergleich zeigte, dass die sechs zum Faltungsmotiv gehörenden Cysteine von Hydramacin-1 in vier von fünf Fällen mit den entsprechenden Cysteinen der anderen Proteine identische räumliche Positionen aufweisen (Daten nicht gezeigt). Die einzige Abweichung besteht bei Heliomicin, bei dem einer der Cysteinreste gegenüber dem entsprechenden Cysteinrest im Hydramacin-1 eine abweichende räumliche Position besitzt. Ein darauffolgender ausgedehnter Vergleich der Tertiärstrukturen von Hydramacin-1 und anderen Mitgliedern der Insektendefensinfamilie ergab, dass diese Abweichung auch bei anderen, aber nicht bei allen, Mitgliedern vorhanden ist (Daten nicht gezeigt).

Auf der Grundlage der räumlichen Konservierung der Cysteine in den Tertiärstrukturen der Repräsentanten aller Familien aus der Superfamilie der Skorpionotoxin-ähnlichen Proteine, wurden diese in einem Sequenz-*alignment* einander zugeordnet (Abb. 27). Der Vergleich zeigt, dass zwischen den konservierten Cysteinen 1 und 2 sowie 4 und 5 beim Hydramacin-1 Insertionen von bis zu 13 Aminosäuren vorhanden sind beziehungsweise bei den anderen Proteinen der fünf Familien (I bis V) entsprechend große Deletionen vorliegen. Neben der Konservierung der Cysteinreste des Strukturmotivs können drei weitere konservierte

Aminosäuren beobachtet werden: Ein Lysin und zwei Glycine. Diese liegen jeweils zwischen den konservierten Cysteinen 3 und 4 aller Moleküle. Die Primärstrukturen von Hydramacin-1 und den Vertretern der fünf Proteinfamilien sind ansonsten sehr heterolog.

Hydramacin-1 besitzt hinsichtlich der Primärstruktur eine starke Homologie zu den beiden antimikrobiellen Peptiden Theromacin und Neuromacin (Abb. 27). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt, dass auch die anderen beiden Peptide die räumlich konservierten Aminosäuren besitzen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass im Gegensatz zum *alignment* mit den anderen Strukturen, welches auf Grundlage der Übereinstimmung der räumlichen Anordnung der Cysteine sowie ihrer Verknüpfung erstellt wurde, das *alignment* mit Theromacin und Neuromacin auf Grundlage ihrer Sequenzhomologie basiert.



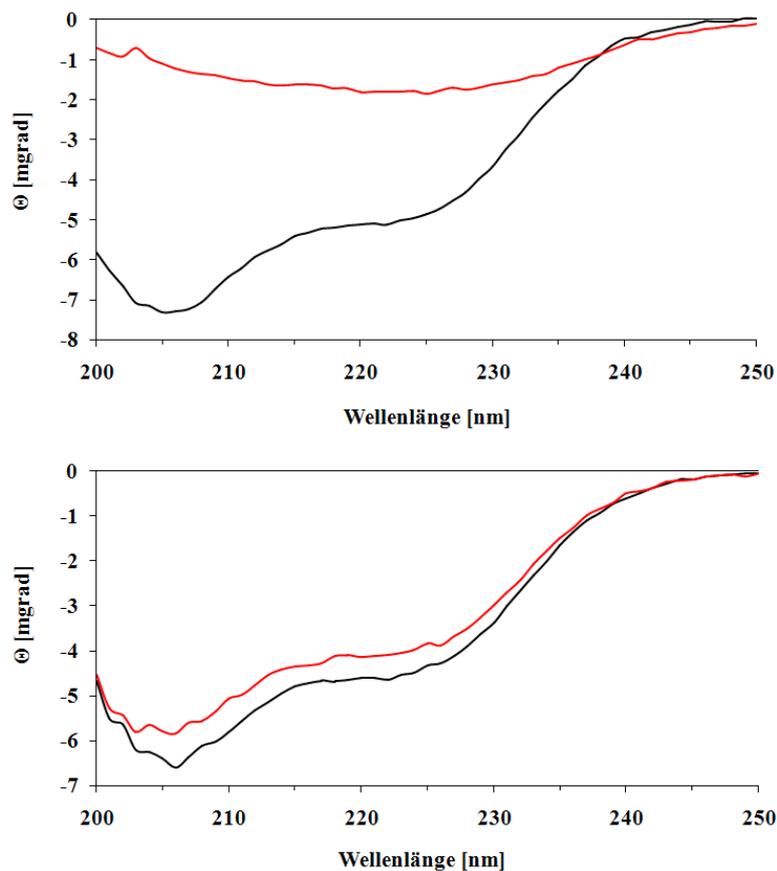
**Abbildung 27: Sequenz-alignment.** Das *alignment* von Hydramacin-1 mit Repräsentanten aus den fünf Familien (I bis V) der Superfamilie der Skorpionotoxin-ähnlichen Proteine sowie mit Theromacin und Neuromacin basiert auf der räumlichen Konservierung der Cysteinreste 1 bis 6. Wellenlinien sowie Pfeile oberhalb der Sequenzen indizieren die Positionen von  $\alpha$ -Helices beziehungsweise  $\beta$ -Faltblattstrukturen im Hydramacin-1. Cysteine, welche in der Tertiär- beziehungsweise in der Primärstruktur konserviert vorliegen, sind gelb markiert, zusätzlich konservierte Reste sind rot markiert. Konservierte Reste in den Primärstrukturen der Macin-Proteinfamilienmitglieder sind grau hinterlegt. HM-1, Hydramacin-1; TM, Theromacin [81, 82]; NM, Neuromacin [82]; I, *Mediterranean Mussel Defensin* (MGD-1) [83]; II, *Nicotiana alata* plant defensin 1 (NaD1) [79]; and *Petunia hybrida* Defensin 1 (PhD1) [78]; III, *Buthus martensi* toxin 1 (BmTX1) [84]; IV, Heliomicin [85]; V, *Centruroides sculpturatus* Ewing variant 2 toxin (CsE-v2) [86].

### 3.4 Wechselwirkung von Hydramacin-1 mit Modellmembranen

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurde die Wechselwirkung von Hydramacin-1 mit den verschiedenartig zusammengesetzten Modellmembranen von Liposomen untersucht. Mit dieser Methode sollte gezeigt werden, ob die Interaktion zwischen Peptid und Membran zu einer Konformationsänderung des Hydramacin-1 führen würde. In der Abbildung 28 sind stellvertretend die Spektren von zwei der insgesamt sieben untersuchten Liposomentypen dargestellt.

Der Vergleich der CD-Spektren vor und nach der Inkubation zeigte bei allen negativ geladenen Liposomen deutliche Veränderungen im gemessenen CD-Signal. Dabei konnte in den entsprechenden Spektren eine unterschiedlich starke Abnahme der Intensität des jeweiligen Signals beobachtet werden. Die stärkste Abnahme erfolgte bei der Untersuchung mit PG-Liposomen (Abb. 28).

Der Effekt der Intensitätsabnahme war die Folge einer Präzipitation von Peptid und Liposomen. Die Präzipitate führten zu einer Trübung der entsprechenden Peptid-Liposomen-Gemische, welche deutlich mit bloßem Auge erkennbar waren. Diese Trübung blieb bei den Untersuchungen mit den zwitterionischen Liposomen aus, ebenso wie eine signifikante Intensitätsabnahme im CD-Spektrum. Die Abbildung 28 zeigt die CD-Spektren von Hydramacin-1 in Gegenwart und Abwesenheit von PC-Liposomen als Stellvertreter für Liposomen mit zwitterionischer Oberflächenladung.



**Abbildung 28: Untersuchung der Konformation von Hydramacin-1 in Gegenwart von Modellmembranen.** Oben: Spektrum von Hydramacin-1 ohne PG-Liposomen (schwarz) und mit PG-Liposomen (rot). Unten: Spektrum von Hydramacin-1 ohne PC-Liposomen (schwarz) und mit PC-Liposomen (rot).

Der Einfluss der Präzipitate stellt einen unberechenbaren Einfluss auf die CD-Spektren dar, so dass diese hinsichtlich des Konformationszustandes des Peptids nicht aussagekräftig sind. Es lässt sich somit nicht sagen, ob die beobachteten Abweichungen zwischen den CD-Spektren vor und nach Inkubation infolge von Konformationsänderungen zustande kommen. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass ausschließlich die Interaktion mit negativ geladenen Liposomen zu einer Präzipitation führte. Dabei war die beobachtete Abnahme des CD-Signals jeweils stärker im sauren pH-Bereich beziehungsweise schwächer im neutralen pH-Bereich (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation von Hydramacin-1 mit zwitterionischen Liposomen ergab hingegen keine signifikanten Abweichungen bei den CD-Spektren.

Die Exposition der fünf intramolekularen Tryptophane zum umgebenden Lösungsmittel (Abb. 24C) bietet die Möglichkeit zu untersuchen, ob Hydramacin-1 bei der Interaktion mit Modellmembranen in diese eintaucht. Tryptophane lassen sich zur Fluoreszenz anregen, wobei die Wellenlänge, bei der das Maximum der Fluoreszenzemission erscheint, von der chemischen Umgebung der Tryptophane abhängig ist. Wenn einer oder mehrere der Tryptophanreste beim Eintauchen von Hydramacin-1 in die Modellmembran beteiligt sind, kommt es zu einer Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums in Richtung kleiner werdender Wellenlängen, wegen des Wechsels von einer hydrophilen zu einer hydrophoben chemischen Umgebung. Der Effekt der Präzipitation hat auf die Auswertung des Fluoreszenzsignals der intramolekularen Tryptophane keine Auswirkung, weil die möglicherweise auftretende Streuung des Fluoreszenzlichts lediglich zu einer Intensitätsabnahme führen könnte, nicht jedoch die Verschiebung der Wellenlänge des Emissionsmaximums bewirkt.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopie sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Ausschließlich die Inkubation von Hydramacin-1 mit negativ geladenen Liposomen führte zu einer Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums von unterschiedlich starkem Ausmaß. Die stärkste Verschiebung kann für die Interaktion des Peptids mit PG-Liposomen beobachtet werden. Sie beträgt 9,5 nm im sauren pH-Bereich. Darauf folgen die Verschiebungen, welche durch Asolectin-, PS- und PI-Liposomen vermittelt wurden. Sie liegen, ebenfalls für den sauren pH-Bereich, in der Größenordnung von 7,0 nm und 5,0 nm. Die Interaktion von Hydramacin-1 mit den zwitterionischen PC-, PE und Sphingomyelin-Liposomen führte zu keiner Verschiebung der Wellenlänge des Fluoreszenzemissionsmaximums.

Die Ergebnisse der Experimente, welche bei einem neutralen pH-Wert durchgeführt wurden, zeigen ein ähnliches Ergebnis (Tabelle 6). Dabei lässt sich ebenfalls nur bei der Interaktion

mit den negativ geladenen PG-, Asolectin-, PS- und PI-Liposomen eine Verschiebung beobachten. Auch hier zeigt die Interaktion mit PG-Liposomen die stärkste Verschiebung, gefolgt von den anderen drei Liposomentypen. Insgesamt ist das Ausmaß der Verschiebungen jedoch um den Faktor 1,6 bis 5 geringer als bei einem sauren pH-Wert.

**Tabelle 6: Wechselwirkung von Hydramacin-1 mit Modellmembranen.** Gezeigt sind die detektierten Wellenlängen des Fluoreszenzemissionsmaximums der Tryptophanreste des Peptids in Abwesenheit (Basiswert) und in Anwesenheit von Liposomen bei pH 5,7 und pH 7,4. Die Werte in Klammern entsprechen den Differenzen zu den Werten der Wellenlängen der jeweiligen Basiswerte. Die Einheit aller Werte ist nm.

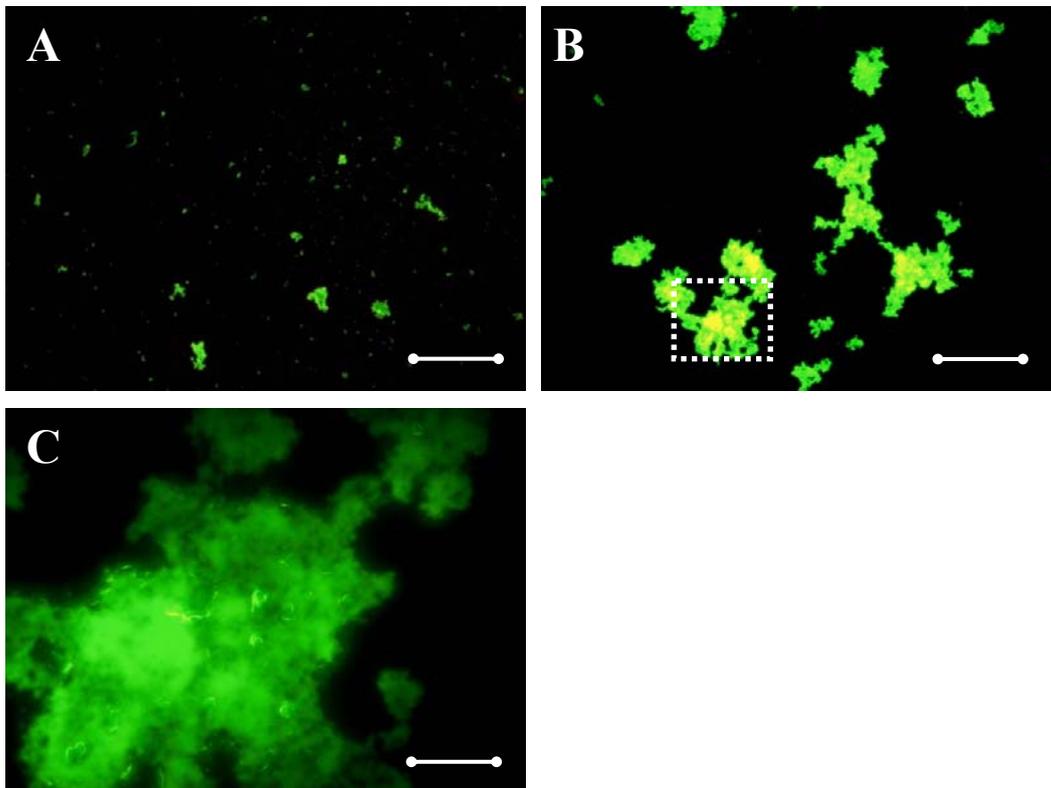
	<i>pH 5,7</i>	<i>pH 7,4</i>
<b>Basiswert</b>	345,5	343,5
<b><i>Liposomen mit negativer Oberflächenladung</i></b>		
<b>Phosphatidylglycerin (PG)</b>	336,0 (-9,5)	337,5 (-6,0)
<b>Asolectin</b>	338,5 (-7,0)	340,0 (-3,5)
<b>Phosphatidylserin (PS)</b>	340,5 (-5,0)	342,5 (-1,0)
<b>Phosphatidylinositol (PI)</b>	340,5 (-5,0)	342,5 (-1,0)
<b><i>Liposomen mit zwitterionischer Oberflächenladung</i></b>		
<b>Sphingomyelin</b>	346,0 (+0,5)	344,5 (+1,0)
<b>Phosphatidylcholin (PC)</b>	345,0 (-0,5)	345,0 (+1,5)
<b>Phosphatidylethanolamin (PE)</b>	345,5 (0,0)	343,5 (0,0)

Unabhängig von der Intensität der Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums konnte, wie bereits bei der CD-Spektroskopie, bei jedem der Fluoreszenz-Experimente mit den negativ geladenen Liposomen eine deutliche Trübung des entsprechenden Peptid-Liposomen-Gemisches beobachtet werden.

Das Phänomen der Präzipitation sollte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der Morphologie der Präzipitate sowie der Zeitabhängigkeit ihrer Formierung untersucht werden. Dazu erfolgte eine erneute Inkubation von Hydramacin-1 mit Asolectin-Liposomen, welche den Fluoreszenzfarbstoff Calcein einschlossen. Die hohe Konzentration des Fluorophors führte dazu, dass dieser in den Ausgangsliposomen infolge eines Fluoreszenzauslöschungseffektes nicht zur Fluoreszenz angeregt werden konnte. Daher ergaben die Liposomen, welche nicht mit Hydramacin-1 behandelt worden sind, unter dem Fluoreszenzmikroskop ein schwarzes Bild (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie sind in Abbildung 29 dargestellt. Bereits fünf Minuten nach Inkubation mit Hydramacin-1 lassen sich fluoreszierende Präzipitate beobachten (Abb. 29A). Ihre Größe nimmt innerhalb weiterer 25 Minuten um ein vielfaches zu (Abb. 29B). Die Präzipitate zeigen einerseits eine scharfe Abgrenzung des

Fluoreszenzsignals zur Umgebung (Abb. 29C). Andererseits ist die Intensität des Signals innerhalb der Präzipitate deutlich heterogen.

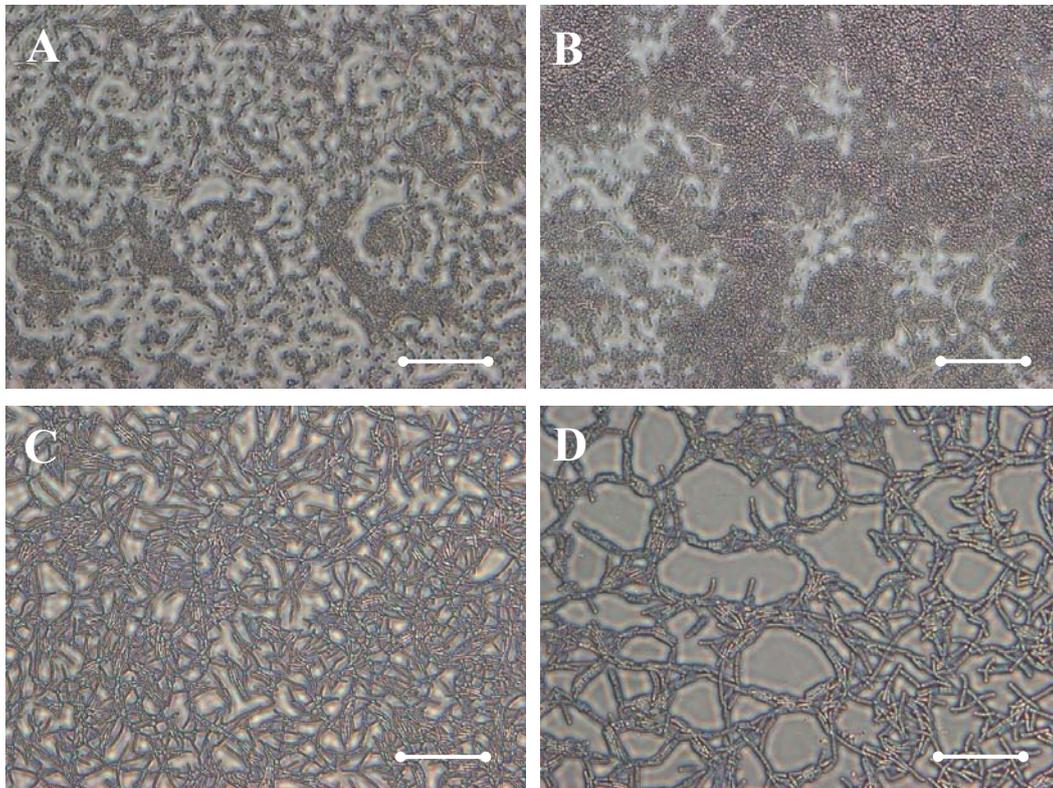


**Abbildung 29: Untersuchung der Präzipitation von Liposomen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie.** (A) Nach 5 min Inkubation des Liposom-Hydramacin-1-Gemisches; Balken = 200  $\mu\text{m}$ . (B) Nach 30 min Inkubation des Liposom-Hydramacin-1-Gemisches; Balken = 200  $\mu\text{m}$ . (C) Vergrößerung des eingerahmten Bereiches in B; Balken = 30  $\mu\text{m}$ .

### 3.5 Wechselwirkung von Hydramacin-1 mit Bakterien

Im Anschluss an die Untersuchung der Wechselwirkung von Hydramacin-1 mit Modellmembranen stand die Untersuchung seines Effektes auf komplexer aufgebaute Bakterienmembranen beziehungsweise -zellwände im Mittelpunkt. In Abbildung 30 sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Hydramacin-1 behandelten Bakterien dargestellt. Sowohl bei den behandelten Gram-negativen (Abb. 30B) als auch Gram-positiven Bakterien (Abb. 30D) lassen sich bereits nach fünf Minuten Inkubation mit Hydramacin-1 deutliche Veränderungen bezüglich deren Verteilung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollbakterien (Abb. 30A und 30C) erkennen. In beiden Fällen kam es zu einer Aggregation der Zellen. Bei Proben, welche zu späteren Zeitpunkten genommen wurden, erfolgte die gleiche Beobachtung (Daten nicht gezeigt).

Als Negativkontrolle wurden Zellen des Gram-positiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* verwendet. Sie zeigten bei Aktivitätsversuchen keinerlei Sensitivität gegenüber Hydramacin-1 [29], und auch in der lichtmikroskopischen Betrachtung konnte keine Aggregation der Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

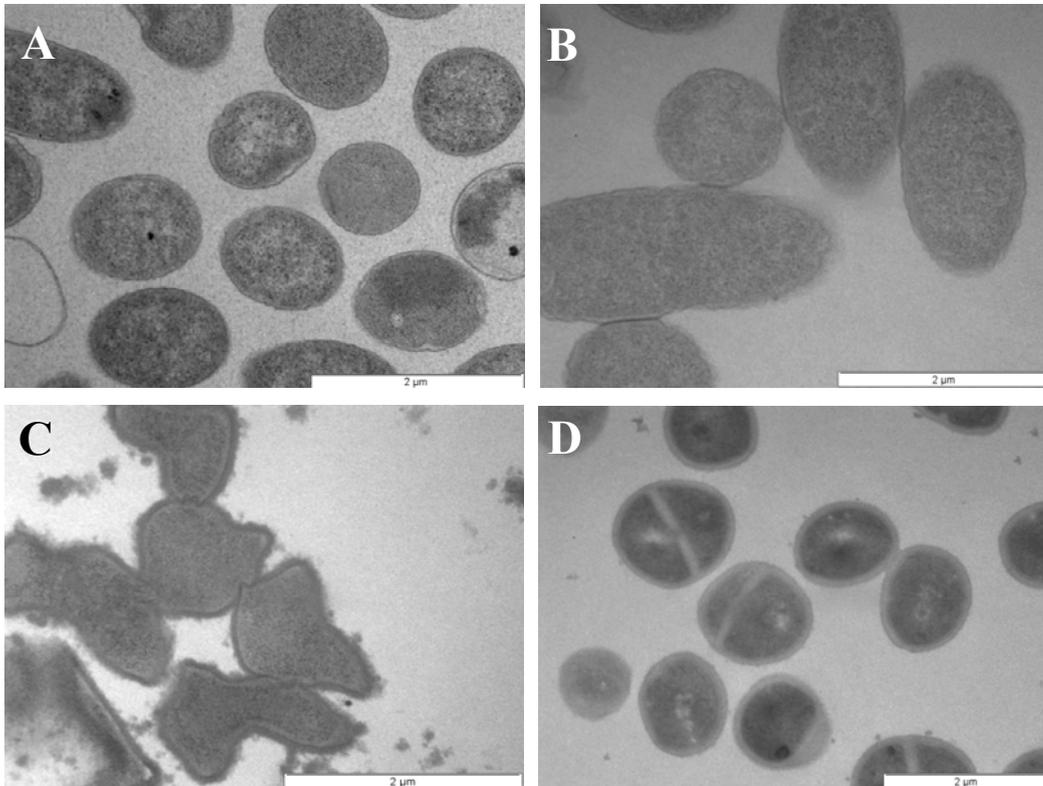


**Abbildung 30: Untersuchung der Aggregation von Bakterien.** Gram-negative Bakterien (A) ohne und (B) mit Hydramacin-1 nach fünfminütiger Inkubation. Gram-positive Bakterien (C) ohne und (D) mit Hydramacin-1 nach fünfminütiger Inkubation. Balken = 50 µm.

Den Abschluss der Experimente stellten Untersuchungen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie dar. Sie sollten einen detaillierteren Blick auf die Zellaggregate erlauben, welche bei der Lichtmikroskopie beobachtet wurden.

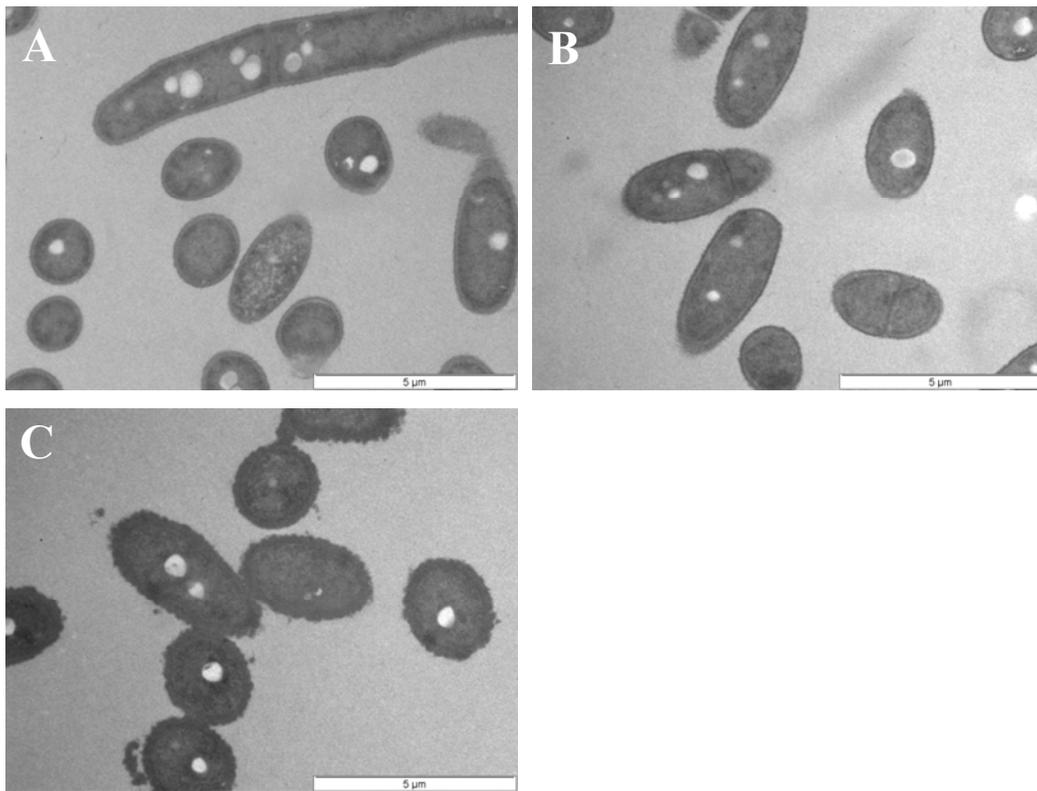
Abbildung 31 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Bakterien der Gattungen *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*, vor und nach Inkubation mit Hydramacin-1. Die Aufnahmen zeigen, dass Gram-negative *Escherichia coli* Bakterien bei einer Konzentration von 5 µM Hydramacin-1 untereinander elektronendichte Kontaktstellen ausbilden (Abb. 31B). Unbehandelte *Escherichia coli* Zellen (Abb. 31A) sowie behandelte Zellen des Gram-positiven Kontrollbakteriums *Staphylococcus aureus* (Abb. 31D) weisen diese Kontaktstellen nicht auf. Die Behandlung der Bakterien mit einer über 100fach höheren Peptidkonzentration von 560 µM führte bei den Gram-negativen Bakterien einerseits zu einem Verlust der

Morphologie sowie zu einer Quellung und partiellen Ablösung der Membran (Abb. 31C). Andererseits konnte die Ausbildung von fingerartigen Ausstülpungen der Zellmembranen, mit denen sich die Zellen gegenseitig zu penetrieren scheinen, beobachtet werden.



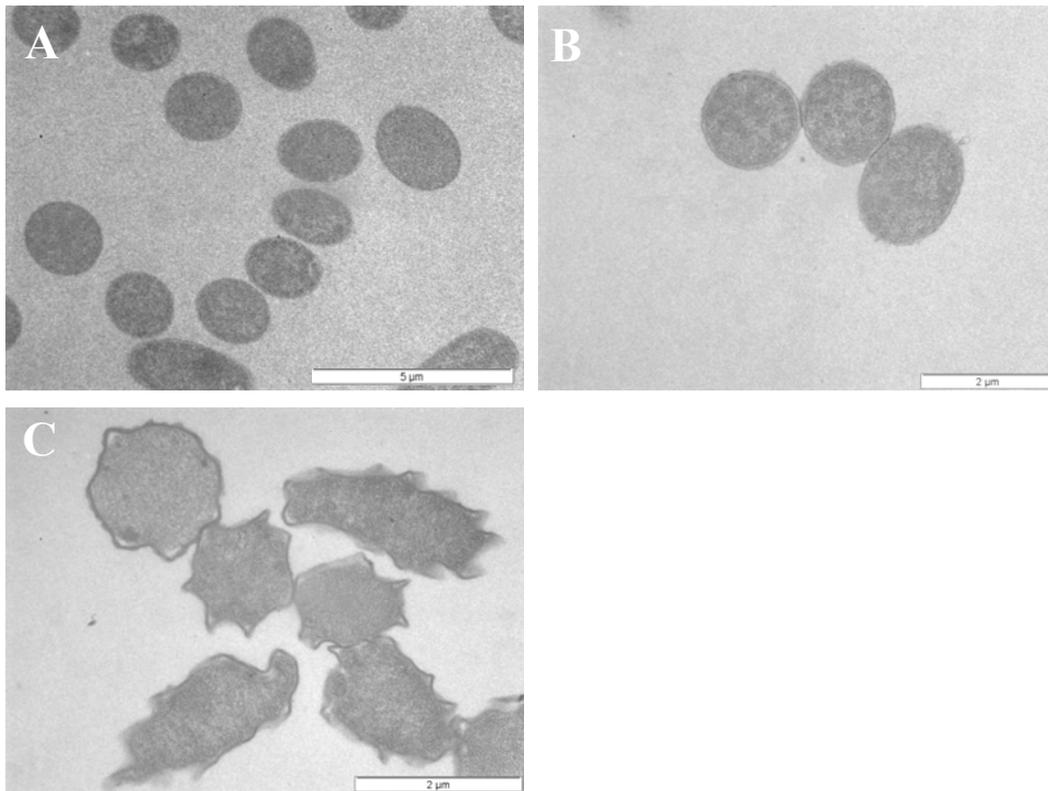
**Abbildung 31: Untersuchung der Aggregation von Bakterien in der stationären Wachstumsphase mit Hilfe der Elektronenmikroskopie.** (A) Kontrolle: Mit Natriumphosphatpuffer behandelte *Escherichia coli* Bakterien. (B) *Escherichia coli* Bakterien mit 5 µM Hydramacin-1 inkubiert. (C) *Escherichia coli* Bakterien mit 560 µM Hydramacin-1 inkubiert. (D) *Staphylococcus aureus* mit 5 µM Hydramacin-1 inkubiert.

In Abbildung 32 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gram-positiven Bakterien der Gattung *Bacillus megaterium*, vor und nach Inkubation mit Hydramacin-1, dargestellt. Interessanterweise lassen sich die bei *Escherichia coli* beobachteten Kontaktstellen bei *Bacillus megaterium* für die Konzentration von 5 µM Peptid nicht beobachten (Abb. 32B). Die Zell-Zell-Kontakte sind bei *Bacillus megaterium* erst bei der hohen Konzentration von 560 µM Hydramacin-1 zu erkennen (Abb. 32C). Sie weisen jedoch, anders als die Kontaktstellen zwischen den *Escherichia coli* Bakterien, keine erhöhte Elektronendichte auf. Andererseits zeigen die *Bacillus megaterium* Bakterien bei der hohen Peptidkonzentration eine deutliche Quellung sowie eine partielle Auflösung der Membran, welche auch bei *Escherichia coli* beobachtet wurde. Die Zellform der *Bacillus megaterium* Bakterien scheint hingegen unverändert.



**Abbildung 32: Untersuchung der Aggregation von Bakterien in der stationären Wachstumsphase mit Hilfe der Elektronenmikroskopie.** (A) Kontrolle: Mit Natriumphosphatpuffer behandelte *Bacillus megaterium* Bakterien. (B) *Bacillus megaterium* Bakterien mit 5 µM Hydramacin-1 inkubiert. (C) *Bacillus megaterium* Bakterien mit 560 µM Hydramacin-1 inkubiert.

Sowohl die Lichtmikroskopie- als auch die Elektronenmikroskopie-Experimente wurden mit Bakterien aus der stationären Phase durchgeführt. Diese können sich in der Membranbeschaffenheit gegenüber Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase unterscheiden [87], was zu einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber AMPs [88] beziehungsweise in diesem Fall gegenüber Hydramacin-1 führen könnte. Deshalb wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie auch Gram-negative *Escherichia coli* Bakterien, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, untersucht. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, welche die Auswirkungen des Peptids auf die Zellen zeigen, sind in Abbildung 33 veranschaulicht. Bei einer geringen Konzentration von 5 µM bildeten sich Kontaktstellen mit hoher Elektronendichte zwischen den Zellen (Abb. 33B), vergleichbar zu den Beobachtungen mit den Bakterien aus der stationären Phase. Bei höheren Peptidkonzentrationen von 100 µM Hydramacin-1 kam es ebenfalls zu signifikanten Veränderungen der Zellmorphologie (Abb. 33C).



**Abbildung 33: Untersuchung der Aggregation von Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase mit Hilfe der Elektronenmikroskopie.** (A) Kontrolle: Mit Natriumphosphatpuffer behandelte *Escherichia coli* Bakterien. (B) *Escherichia coli* Bakterien mit 5 µM Hydramacin-1 inkubiert. (C) *Escherichia coli* Bakterien mit 100 µM Hydramacin-1 inkubiert.

## 4 Diskussion

Das Disulfidbrücken-stabilisierte  $\alpha/\beta$ -Motiv des Hydramacin-1 bedingt seine Einordnung in die Superfamilie der Skorpiontoxin-ähnlichen Proteine. Auf Grund der eindeutigen Strukturunterschiede, welche Hydramacin-1 zu den Vertretern der dort bereits vorhandenen fünf Familien besitzt, kann es als erster Vertreter einer neuen Familie innerhalb der Superfamilie der Skorpiontoxin-ähnlichen Proteine angesehen werden. Diese wird nachfolgend als *Macin*-Familie bezeichnet.

Zu der neuen Familie der Macine gehören auf Grund der Sekundärstrukturvorhersagen (Abb. 34) mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die beiden AMPs, Theromacin und Neuromacin, aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* [81, 82]. Ein Vergleich der Sekundärstrukturvorhersage [89] mit der tatsächlich gefundenen Sekundärstruktur des Hydramacin-1 weist für dessen C-terminale Molekülhälfte eine hohe Übereinstimmung auf, was die Verlässlichkeit der Vorhersagemethode belegt. Die Vorhersage für Neuromacin ist mit der für Hydramacin-1 nahezu identisch, und auch für Theromacin wurde eine sehr ähnliche Sekundärstrukturvorhersage erhalten. Andererseits zeigen die drei Peptide im N-terminalen Bereich, bei dem die Vorhersage für Hydramacin-1 mit der tatsächlich vorliegenden Verteilung der Sekundärstrukturelemente nicht übereinstimmt, eine starke Homologie hinsichtlich der Primärstruktur. Letztere ist ausschlaggebend für die Konformation eines Proteins [31]. Dies, sowie die zusätzlichen weitreichenden Primärstrukturhomologien, insbesondere die Konservierung von acht Cysteinresten (Abb. 34), welche einen wesentlichen Teil des Disulfidbrücken-stabilisierten  $\alpha/\beta$ -Motivs des Hydramacin-1 darstellen, legen deshalb nahe, dass auch Neuromacin und Theromacin dieselbe Struktur wie Hydramacin-1 besitzen und somit der Macin-Familie zuzuordnen sind.



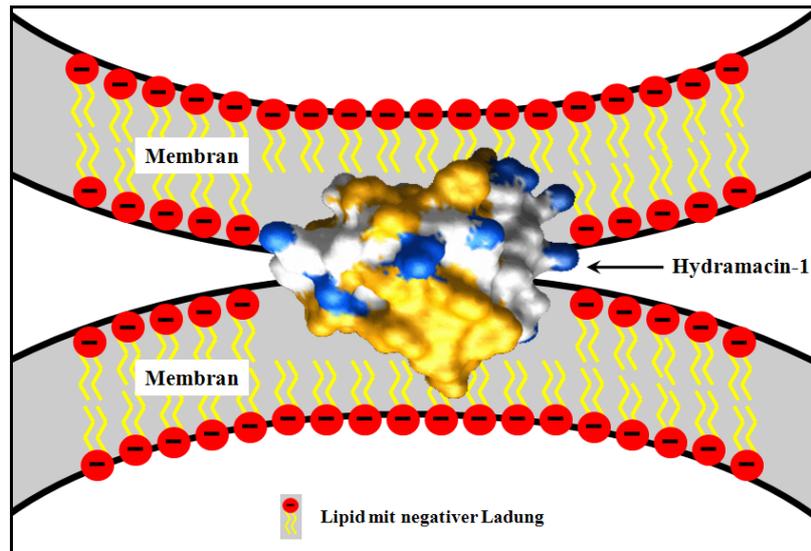
Aminosäurereste besitzen [90]. Zudem weisen die Proteine, welche das Disulfidbrückenstabilisierte  $\alpha/\beta$ -Strukturmotiv beinhalten, insgesamt stark voneinander abweichende Funktionen auf: Sie wirken sowohl als Toxine oder als antimikrobielle Substanzen, aber auch als Liganden für Geschmacksrezeptoren [90]. Innerhalb der Superfamilie der Skorpionotoxin-ähnlichen Proteine variieren die jeweiligen Funktionen sowie ebenfalls die Wirkungsspektren: Z.B. wirkt NaD1 antifungal und insektizid, MGD-1 wirkt hauptsächlich gegen Gram-positive Bakterien und Hydramacin-1 wirkt hauptsächlich gegen Gram-negative Bakterien [73, 79, 83]. Es lassen sich jedoch keine gemeinsamen, einander überschneidenden Funktionen erkennen, wie sie hinsichtlich konservierter Aminosäurereste erwartet werden könnten. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die Konservierung der entsprechenden drei Aminosäurereste mit der Funktion beziehungsweise der Struktur der Proteine in Zusammenhang steht. Die Klärung der Bedeutsamkeit der drei konservierten Aminosäurereste sollte ebenfalls Gegenstand nachfolgender Untersuchungen sein, bei denen Hydramacin-1 in den entsprechenden Positionen mutiert wird.

Die Analyse des molekularen antimikrobiellen Wirkmechanismus von Hydramacin-1 war bereits Gegenstand vorangehender Untersuchungen. Diese zeigten eindeutig die Fähigkeit von Hydramacin-1 Bakterienmembranen zu permeabilisieren [73]. Das Peptid bildet bei den zur Permeabilisierung notwendigen Konzentrationen jedoch keine Poren [73]. Das schließt die beiden oben skizzierten Wirkmechanismen, nämlich das *toroidal pore model* sowie das *barrel-stave model* [16], welche die Bildung von Poren beschreiben, aus. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen des Weiteren eine Präzipitation von mit Hydramacin-1 behandelten Liposomen beziehungsweise Bakterien. Dieses Phänomen wird in den beiden verbleibenden oben skizzierten Mechanismen, *aggregate model* und *carpet model* [16], nicht beschrieben, wodurch auch sie als mögliche Wirkmechanismen ausscheiden. Der antibakterielle Wirkmechanismus von Hydramacin-1 weicht somit eindeutig von den vier bisher beschriebenen Wirkmechanismen ab. Jedoch wurde der Effekt der Präzipitation von Bakterien beziehungsweise von in Suspension vorliegenden Partikeln mit negativer Oberflächenladung bereits für das kationische Polypeptid Flo, aus dem Meerrettichbaum *Moringa oleifera*, beschrieben, welches ebenfalls antibakterielle Aktivität besitzt [91].

Nachfolgende Untersuchungen an Flo, welche die Identifikation der für die bakterizide Aktivität und der für die Präzipitation verantwortlichen Molekülbereiche des Peptids zum Ziel hatten, zeigten, dass der für die Präzipitation verantwortliche Molekülteil positiv-geladen sowie reich an Glutamin sein musste [92]. Dieser Bereich formt zudem eine  $\alpha$ -Helix. Aus

ihren Ergebnissen formulierten die Autoren den folgenden Zwei-Stufen-Mechanismus: Die positiven Ladungen dienen zunächst zur Bindung und Neutralisierung der negativen Oberflächenladungen der zu sedimentierenden Partikel/Bakterien [92]. Der glutaminreiche Teil führt hingegen zur einer Peptid-Peptid-Wechselwirkung, die letztlich die Vernetzung und damit die Sedimentation der peptidgebundenen Partikel/Bakterien bewirkt [92]. Ein korrespondierender Bereich konnte in der Struktur von Hydramacin-1 nicht identifiziert werden. Offensichtlich muss Hydramacin-1 die Präzipitation von Bakterien durch einen anderen Mechanismus bewirken als dem des ebenfalls zur Aggregation von Bakterien fähigen Flo-Peptids.

Das Vermögen von Hydramacin-1 in die Membran von Liposomen einzutauchen zeigt, dass die Interaktion des Peptids mit einer möglichen Zielmembran Rezeptor-unabhängig verlaufen kann. Für die Wechselwirkung scheint eine negative Oberflächennettoladung zu genügen. Die Analyse der elektrostatischen Oberflächenladungsverteilung zeigte zudem eine auffällige Verteilung von hydrophoben beziehungsweise von positiv geladenen Aminosäureresten an der Moleküloberfläche von Hydramacin-1. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich das nachfolgend beschriebene Modell vorschlagen, welches im weiteren Text als *barnacle*(Klette)-Modell bezeichnet wird und schematisch in Abbildung 35 dargestellt ist: Hydramacin-1 taucht mit seinen hydrophoben Molekülbereichen jeweils in die äußeren Schichten der Membranen zweier Liposomen oder Bakterien ein. Die negativen Ladungen der Membranphospholipide werden dabei durch das Band aus positiven Ladungen, welches das Peptid umgibt, neutralisiert. Dies führt zu einer Stabilisierung des Peptid-Zwei-Membran-Komplexes. Durch die fortschreitende Vernetzung der Membranen einzelner Liposomen beziehungsweise Bakterien bilden diese stetig wachsende Aggregate. Ob die Wechselwirkung zuerst durch elektrostatische Attraktion oder zuerst durch hydrophobe Interaktionen entsteht, lässt sich anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht klären.



**Abbildung 35: Schematische Darstellung des *barnacle*-Modells zur Erklärung des Aggregationseffekts auf Bakterienzellen und Liposomen durch Hydramacin-1.** Dargestellt sind zwei Membranen mit negativen Oberflächenladungen, die durch Hydramacin-1 zusammengehalten werden. Hydrophobe Oberflächenbereiche von Hydramacin-1 sind gelb dargestellt, wohingegen positiv geladene Bereiche der Moleküloberfläche blau dargestellt sind.

Infolge der erzwungenen räumlichen Nähe der beiden Membranen sind nun auch Fusionsvorgänge zwischen ihnen denkbar. Den Vorgang einer Fusion zeigen die Ergebnisse für die Untersuchung der Präzipitation von Calcein-haltigen Asolectin-Liposomen. Die Fluoreszenz kann nur zustande kommen, wenn die Konzentration des Fluorophors gesenkt und damit der Selbstausschöpfungseffekt kompensiert wird. Es gibt zwei Möglichkeiten der Konzentrationsenkung: Erstens, der Fluoreszenzfarbstoff wird in die Umgebung entlassen oder zweitens, der Fluoreszenzfarbstoff wird in den Liposomen verdünnt. Im ersten Fall kommt es zu einer homogenen flächigen Verteilung des Fluoreszenzsignals, was nicht beobachtet wurde. Die zweite Möglichkeit der Verdünnung scheint die erhaltenen Ergebnisse zu erklären. Die Verdünnung entsteht dabei durch einen Prozess vergleichbar mit dem einer *leaky fusion* [93]. Dabei führt die Hydramacin-1-vermittelte Fusion der Liposomen zu einer vorübergehenden Durchlässigkeit ihrer Membranen. Dies ermöglicht den Einstrom des umgebenden Lösungsmittels und damit die Aufhebung der Fluoreszenzauslöschung. Dass es sich bei den Präzipitaten um mizellare Aggregate handelt, kann ausgeschlossen werden, da Carboxyfluorescein hydrophil ist und deshalb mit Mizellen nicht in Wechselwirkung tritt. Die beobachteten fluoreszierenden Aggregate würden sich in diesem Fall nicht bilden, weil das Carboxyfluorescein nicht in die Mizellen integriert werden kann.

Im Gegensatz zu den untersuchten Liposomen konnte bei den Bakterien eine Fusion anhand der Elektronenmikroskopieaufnahmen nicht beobachtet werden. Auf den entsprechenden Bildern (Abb. 31 und 32) weisen die Zellen distinkte Abgrenzungen zueinander auf. Eventuell war der Untersuchungszeitraum zu kurz um Fusionsvorgänge beobachten zu können, welche infolge der größeren Komplexität der Bakterienmembranen beziehungsweise –zellwände kinetisch kontrolliert sein könnten. Unter Umständen ist eine Zellfusion zur Ausbildung der bakteriziden Aktivität nicht erforderlich und die Fusion der Liposomen ein Artefakt ihrer homogenen Membranbeschaffenheit.

Das *barnacle*-Modell erklärt das Phänomen der Aggregation von Bakterien sowie die Fusion von Liposomen in Gegenwart von Hydramacin-1. Die darüber hinausgehenden morphologischen Veränderungen bei den behandelten Bakterien lassen sich jedoch nur partiell erklären. So macht die Vorstellung der Insertion von Hydramacin-1 in die Bakterienmembran deren Quellung nachvollziehbar. Die Veränderung der Zellgestalt bei den Gram-negativen Bakterien (Abb. 31C und 33C) beziehungsweise ihr Ausbleiben bei den Gram-positiven Bakterien (Abb. 32C) entziehen sich jedoch einer Erklärung durch dieses Modell. Sie könnten auf Sekundäreffekte, zum Beispiel durch Stimulation oder Inhibition der De-/Polymerisation von Cytoskelettfilamenten [94], zurückzuführen sein. Das *barnacle*-Modell selbst kann in keinen direkten molekularen Zusammenhang mit der bakteriziden Aktivität von Hydramacin-1 gebracht werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig um diesen Punkt zu klären.

Die hohe bakterizide Aktivität von Hydramacin-1 [29, 73] stellte einen maßgeblichen Grund für das große Interesse an der Aufklärung seiner Tertiärstruktur dar. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legen nahe, dass Hydramacin-1 neben seiner aktiven Rolle als Bakterizid eine passive Rolle als Vermittler bei der epithelialen Abwehr von *Hydra* besitzt. Letzteres steht im Zusammenhang mit der durch Hydramacin-1 bedingten Präzipitation von Bakterien. Diese führt zu einer Einschränkung ihrer Motilität sowie zu einer räumlichen Konzentrierung der Bakterien. Dadurch schafft Hydramacin-1 ein fokussiertes Angriffsfeld für weitere antimikrobielle Wirkstoffe. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen somit die biologische Implikation von Hydramacin-1 in die endodermale epitheliale Abwehr von *Hydra*.

## 5 Ausblick

Das antimikrobielle Wirkspektrum von Hydramacin-1 umfasst mehrere fakultativ humanpathogene Spezies, darunter *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca*, *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica* [73]. Diese werden bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen von weniger als 1  $\mu\text{M}$  getötet. Von besonderer Bedeutung ist dabei, dass Hydramacin-1 bakterizide Wirkung gegenüber verschiedenen multiresistenten Stämmen zeigt, wenn auch erst bei höheren Konzentrationen. Diese Ergebnisse machen das Peptid attraktiv als Vorlage zur Suche und Entwicklung einer neuen Klasse von Antibiotika, welche die herkömmlichen Antibiotika ergänzt. Das in dieser Arbeit etablierte Protokoll zur rekombinanten Expression und Aufreinigung von Hydramacin-1 stellt diesbezüglich die Möglichkeit einer preiswerten biotechnologischen Produktion in Aussicht.

In Anbetracht der knappen globalen Trinkwasservorkommen sollte, abweichend von seiner Einsatzmöglichkeit in der Medizin, hinsichtlich seines Präzipitationseffekts der Einsatz von Hydramacin-1 als Klärmittel überprüft werden. Ähnlich dem kationischen Polypeptid Flo aus dem Meerrettichbaum *Moringa oleifera*, könnte es somit zur primären Wasseraufbereitung genutzt werden [91].

Zukünftige Experimente sollten sich vor allem darauf konzentrieren, das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Modell zur Erklärung der Aggregation von Bakterien zu verifizieren sowie dessen Bedeutung für die bakterizide Wirkung von Hydramacin-1 zu beleuchten. Neben der Untersuchung von Hydramacin-1-Mutanten, könnte die Aufklärung der Tertiärstrukturen sowie die Untersuchung der molekularen Wirkmechanismen der beiden AMPs Neuromacin und Theromacin in diesem Zusammenhang einen wesentlichen Beitrag leisten.

## Abkürzungen

AMP(s)	Antimikrobielle(s) Peptid(e)
ATCC	<i>American-type culture collection</i>
BmTX1	<i>Buthus martensi</i> toxin 1
CD	Circular dichroismus
CsE-v2	<i>Centruroides sculpturatus</i> Ewing variant 2 toxin
CYANA	<i>Combined-assignment and dynamics algorithm for NMR applications</i>
dest.	destilliert
<i>FID</i>	<i>Free-induction decay</i>
HM-1	Hydramacin-1
HSQC	<i>Heteronuclear-single quantum coherence</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight</i>
MGD-1	<i>Mediterranean Mussel Defensin-1</i>
MRW	<i>Mean-residue weight</i>
NaD1	<i>Nicotiana glauca</i> defensin 1
NM	Neuromacin
NMR	<i>Nuclear-magnetic resonance</i>
NOE(s)	<i>Nuclear-Overhauser effect(s)</i>
NOESY	<i>Nuclear-Overhauser and exchange spectroscopy</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PC	L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin
PCR	<i>Polymerase-chain reaction</i>
pdb	<i>Protein-data base</i>
PE	L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamin
PG	L- $\alpha$ -Phosphatidyl-DL-glycerin
PhD1	<i>Petunia hybrida</i> defensin 1
PI	L- $\alpha$ -Phosphatidylinositol
PS	L- $\alpha$ -Phosphatidylserin
rmsd	<i>Root-mean square deviation</i>
RP-HPLC	<i>Reversed-phase high performance liquid chromatography</i>

---

SCOP	<i>Structural classification of proteins</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TFA	<i>Trifluoric acid</i>
TM	Theromacin
TOCSY	<i>Total-correlation spectroscopy</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute

## Literaturverzeichnis

1. Wennergren, G. und H. Lagercrantz, "*One sometimes finds what one is not looking for*" (*Sir Alexander Fleming*): *the most important medical discovery of the 20th century*. Acta Paediatr, 2007. **96**(1):141-4.
2. Alanis, A.J., *Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?* Arch Med Res, 2005. **36**(6):697-705.
3. Croft, A.C., A.V. D'Antoni, und S.L. Terzulli, *Update on the antibacterial resistance crisis*. Med Sci Monit, 2007. **13**(6):RA103-18.
4. Marshall, S.H. und G. Arenas, *Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology*. Electronic Journal of Biotechnology [online], 2003. **6**(3):271-84.
5. Hancock, R.E. und A. Rozek, *Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **206**(2):143-9.
6. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. **415**(6870):389-95.
7. Gallo, R.L., M. Murakami, T. Ohtake, et al., *Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(6):823-31.
8. Ganz, T. und R.I. Lehrer, *Antimicrobial peptides of vertebrates*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(1):41-4.
9. Bals, R., *Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection*. Respir Res, 2000. **1**(3):141-50.
10. Gallo, R.L. und V. Nizet, *Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease*. Curr Allergy Asthma Rep, 2003. **3**(5):402-9.
11. Hultmark, D., H. Steiner, T. Rasmuson, et al., *Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia**. Eur J Biochem, 1980. **106**(1):7-16.
12. Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, et al., *Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity*. Nature, 1981. **292**(5820):246-8.
13. Wang, Z. und G. Wang, *APD: the Antimicrobial Peptide Database*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue):D590-2.
14. Kamysz, W., M. Okroj, und J. Lukasiak, *Novel properties of antimicrobial peptides*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(2):461-9.
15. Zanetti, M., R. Gennaro, und D. Romeo, *Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain*. FEBS Lett, 1995. **374**(1):1-5.

16. Jenssen, H., P. Hamill, und R.E. Hancock, *Peptide antimicrobial agents*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(3):491-511.
17. Powers, J.P. und R.E. Hancock, *The relationship between peptide structure and antibacterial activity*. Peptides, 2003. **24**(11):1681-91.
18. Hoffmeister-Ullerich, S.A., *Hydra--ancient model with modern outfit*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(23):3012-6.
19. Augustin, R., *Persönliche Mitteilung*.
20. Schaller, H.C., I. Hermans-Borgmeyer, und S.A. Hoffmeister, *Neuronal control of development in hydra*. Int J Dev Biol, 1996. **40**(1):339-44.
21. Holstein, T. und P. Emschermann, *Cnidaria: Hydrozoa/Kamptozoa*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart•Jena•New York, 1995.
22. Fraune, S. und T.C. Bosch, *Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan Hydra*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32):13146-51.
23. Rahat, M. und C. Dimentman, *Cultivation of bacteria-free Hydra viridis: missing budding factor in nonsymbiotic hydra*. Science, 1982. **216**(4541):67-8.
24. McFall-Ngai, M., *Adaptive immunity: care for the community*. Nature, 2007. **445**(7124):153.
25. Bosch, T.C.G. und C.N. David, *Immunocompetence in Hydra. Epithelial cells recognize self-nonselself and react against it*. J Exp Zool, 1986. **238**(2):225-34.
26. Kasahara, S. und T.C. Bosch, *Enhanced antibacterial activity in Hydra polyps lacking nerve cells*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(2):79-85.
27. Miller, D.J., G. Hemmrich, E.E. Ball, et al., *The innate immune repertoire in cnidaria--ancestral complexity and stochastic gene loss*. Genome Biol, 2007. **8**(4):R59.
28. Arancibia, S.A., C.J. Beltran, I.M. Aguirre, et al., *Toll-like receptors are key participants in innate immune responses*. Biol Res, 2007. **40**(2):97-112.
29. Bosch, T.C.G., R. Augustin, F. Anton-Erxleben, et al., *Uncovering Ancestral Innate Immunity: the Simple Metazoan Hydra Uses Epithelial Cells for Host Defense*. (Zur Publikation eingereicht.)
30. Bosch, T.C.G., *Persönliche Mitteilung*.
31. Anfinsen, C.B., *The formation and stabilization of protein structure*. Biochem J, 1972. **128**(4):737-49.
32. Lottspeich, F. und J.W. Engels, *Bioanalytik*. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, 2006. **2. Aufl.**:405-41.
33. Gill, S.C. und P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem, 1989. **182**(2):319-26.

34. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259):680-5.
35. Chen, G.C. und J.T. Yang, *Two-point calibration of circular dichrometer with d-10-camphorsulfonic acid*. Anal Lett 1977. **10**:1195–1207.
36. Schägger, H. und G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem, 1987. **166**(2):368-79.
37. Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, et al., *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, 1988. **9**(6):255-62.
38. Schmidt, H., C. Gelhaus, M. Nebendahl, et al., *2D-DIGE analyses of enriched secretory lysosomes reveal heterogeneous profiles of functionally relevant proteins in leukemic and activated human NK cells*. Proteomics, in press, 2008.
39. Wefing, S., V. Schnaible, und D. Hoffmann, *SearchXLinks*. <http://www.searchxlinks.de/>, center of advanced european studies and research (caesar), Bonn, Germany, 2001.
40. Bodenhausen, G. und D. Ruben, *Natural Abundance Nitrogen-15 NMR by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy*. Chem Phys Lett, 1980. **69**:185-9.
41. Piotto, M., V. Saudek, und V. Sklenar, *Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions*. J Biomol NMR, 1992. **2**(6):661-5.
42. Sklenár, V., M. Piotto, R. Leppik, et al., *Gradienttailored water suppression for 1H-15N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity*. J Magn Reson Ser A, 1993. **102**:241-5.
43. Grzesiek, S. und A. Bax, *Improved 3D Triple-Resonance NMR Techniques Applied to a 31-kDa Protein*. J Magn Reson, 1992. **96**(2):432-40.
44. Schleucher, J., M. Sattler, und C. Griesinger, *Coherence Selection via Gradients without Signal Attenuation: Application to 3D HNCO*. Angew Chem Int Ed, 1993. **32**:1489-91.
45. Kay, L.E., G.Y. Xu, und T. Yamazaki, *Enhanced-sensitivity triple-resonance spectroscopy with minimal H2O saturation*. J Magn Reson Ser A 1994. **109**:129-33.
46. Grzesiek, S. und A. Bax, *An Efficient Experiment For Sequential Backbone Assignment of Medium-Sized Isotopically Enriched Proteins*. J Magn Reson, 1992. **99**(1):201-7.
47. Grzesiek, S. und A. Bax, *Amino-Acid Type Determination in the Sequential Assignment Procedure of Uniformly C-13/N-15-Enriched Proteins*. J Biomol NMR, 1993. **3**(2):185-204.
48. Muhandiram, D.R. und L.E. Kay, *Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity*. J Magn Reson Ser B 1994. **103**:203-16.

49. Montelione, G.T., B.A. Lyons, S.D. Emerson, et al., *An efficient triple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotopically enriched proteins.* J Amer Chem Soc, 1992. **114**:10974 -5.
50. Grzesiek, S., J. Anglister, und A. Bax, *Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in C-13/N-15-Enriched Proteins By Isotropic Mixing of C-13 Magnetization.* J Magn Reson Ser B 1993. **101**(1):114-9.
51. Lyons, B.A. und G.T. Montelione, *An HCCNH triple-resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for correlating backbone amide and side-chain aliphatic resonances in isotopically enriched proteins.* J Magn Reson Ser B, 1993. **101**:206-9.
52. Logan, T.M., E.T. Olejniczak, R.X. Xu, et al., *A general method for assigning NMR spectra of denatured proteins using 3D HC(CO)NH-TOCSY triple resonance experiments.* J Biomol NMR 1993. **3**:225-31.
53. Clowes, R.T., W. Boucher, C.H. Hardman, et al., *A 4D HCC(CO)NNH experiment for the correlation of aliphatic sidechain and backbone resonances in 13C/15N-labelled proteins.* J Biomol NMR, 1993. **3**:349-54.
54. Carlomagno, T., M. Maurer, M. Sattler, et al., *PLUSH TACS Y: Homonuclear planar TACS Y with two-band selective shaped pulses applied to C-alpha,C' transfer and C-beta,C-aromatic correlations.* J Biomol NMR 1996 **8**(2):161-70.
55. Kay, L.E., M. Ikura, R. Tschudin, et al., *Three-Dimensional Triple-Resonance NMR Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins.* J Magn Reson, 1990. **89**:496-514.
56. Palmer, A.G., J. Cavanagh, P.E. Wright, et al., *Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy.* J Magn Reson, 1991. **93**:151-70.
57. Kay, L.E., P. Keifer, und T. Saarinen, *Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity.* J Am Chem Soc, 1992. **114**:10663-5.
58. Schleucher, J., M. Schwendinger, M. Sattler, et al., *A General Enhancement Scheme in Heteronuclear Multidimensional NMR Employing Pulsed Field Gradients.* J Biomol NMR, 1994. **4**:301-6.
59. Kay, L.E., G.Y. Xu, A.U. Singer, et al., *A Gradient-Enhanced HCCH-TOCSY Experiment for Recording Side-Chain 1H and 13C Correlations in H2O Samples of Proteins.* J Magn Reson Ser B, 1993. **101**:333-7.
60. Zhang, O., L.E. Kay, J.P. Olivier, et al., *Backbone 1H and 15N resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of drk in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques.* J Biomol NMR, 1994. **4**:845-58.
61. Davis, A.L., J. Keeler, E.D. Laue, et al., *Experiments for Recording Pure-Absorption Heteronuclear Correlation Spectra Using Pulsed Field Gradients.* J Magn Reson, 1992. **98**:207-16.

62. Cordier, F. und S. Grzesiek, *Direct Observation of Hydrogen Bonds in Proteins by Interresidue <sup>3</sup>hJNC' Scalar Couplings*. J Am Chem Soc, 1999. **121**:1601–2.
63. Delaglio, F., S. Grzesiek, G.W. Vuister, et al., *NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes*. J Biomol NMR, 1995. **6**(3):277-93.
64. Johnson, B.A., *Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules*. Methods Mol Biol, 2004. **278**:313-52.
65. Dingley, A.J., I. Lorenzen, und J. Grötzinger, *NMR analysis of viral protein structures*. Methods Mol Biol, 2008. **451**:441-62.
66. Güntert, P., *Automated NMR structure calculation with CYANA*. Methods Mol Biol, 2004. **278**:353-78.
67. Vriend, G., *WHAT IF: a molecular modeling and drug design program*. J Mol Graph, 1990. **8**(1):52-6, 29.
68. van Gunsteren, W.F., S.R. Billeter, A.A. Eising, et al., *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*. vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich, 1996:1-1042.
69. Carson, M., *Ribbons 2.0*. J. Appl. Crystallogr., 1991. **24**:946-950.
70. Nicholls, A., K.A. Sharp, und B. Honig, *Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons*. Proteins, 1991. **11**(4):281-96.
71. Pick, U., *Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures*. Arch Biochem Biophys, 1981. **212**(1):186-94.
72. Sahly, H., S. Schubert, J. Harder, et al., *Burkholderia is highly resistant to human Beta-defensin 3*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(5):1739-41.
73. Jung, S., A.J. Dingley, M. Stanisak, et al., *Hydramacin-1: Structure and antibacterial activity of a protein from the basal metazoan Hydra*. (Zur Publikation eingereicht.)
74. Provencher, S.W. und J. Glöckner, *Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism*. Biochemistry, 1981. **20**(1):33-7.
75. Software, *NMRView5.2.2 - Internes Benutzerhandbuch*. One Moon Scientific, Inc. Westfield, NJ, USA, 1994-2004.
76. Ramachandran, G.N. und V. Sasisekharan, *Conformation of polypeptides and proteins*. Adv Protein Chem, 1968. **23**:283-438.
77. Holm, L. und C. Sander, *Mapping the protein universe*. Science, 1996. **273**(5275):595-603.
78. Janssen, B.J., H.J. Schirra, F.T. Lay, et al., *Structure of Petunia hybrida defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds*. Biochemistry, 2003. **42**(27):8214-22.

79. Lay, F.T., H.J. Schirra, M.J. Scanlon, et al., *The three-dimensional solution structure of NaDI, a new floral defensin from Nicotiana glauca and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP*. J Mol Biol, 2003. **325**(1):175-88.
80. Murzin, A.G., S.E. Brenner, T. Hubbard, et al., *SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures*. J Mol Biol, 1995. **247**(4):536-40.
81. Tasiemski, A., F. Vandenbulcke, G. Mitta, et al., *Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum**. J Biol Chem, 2004. **279**(30):30973-82.
82. Schikorski, D., V. Cuvillier-Hot, M. Leippe, et al., *Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia*. J Immunol, 2008. **181**(2):1083-95.
83. Yang, Y.S., G. Mitta, A. Chavanieu, et al., *Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel defensin (MGD-1)*. Biochemistry, 2000. **39**(47):14436-47.
84. Blanc, E., R. Romi-Lebrun, O. Bornet, et al., *Solution structure of two new toxins from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch blockers of potassium channels*. Biochemistry, 1998. **37**(36):12412-8.
85. Lamberty, M., A. Caille, C. Landon, et al., *Solution structures of the antifungal heliomycin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities*. Biochemistry, 2001. **40**(40):11995-2003.
86. Cook, W.J., A. Zell, D.D. Watt, et al., *Structure of variant 2 scorpion toxin from *Centruroides sculpturatus* Ewing*. Protein Sci, 2002. **11**(3):479-86.
87. Yano, Y., A. Nakayama, K. Ishihara, et al., *Adaptive Changes in Membrane Lipids of Barophilic Bacteria in Response to Changes in Growth Pressure*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(2):479-485.
88. Dennison, S.R., L.H. Morton, F. Harris, et al., *The impact of membrane lipid composition on antimicrobial function of an alpha-helical peptide*. Chem Phys Lipids, 2008. **151**(2):92-102.
89. Rost, B., G. Yachdav, und J. Liu, *The PredictProtein server*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue):W321-6.
90. Martin, L. und C. Vita, *Engineering novel bioactive mini-proteins from small size natural and de novo designed scaffolds*. Curr Protein Pept Sci, 2000. **1**(4):403-30.
91. Suarez, M., J.M. Entenza, C. Doerries, et al., *Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities*. Biotechnol Bioeng, 2003. **81**(1):13-20.
92. Suarez, M., M. Haenni, S. Canarelli, et al., *Structure-function characterization and optimization of a plant-derived antibacterial peptide*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(9):3847-57.

- 
93. Shangguan, T., D. Alford, und J. Bentz, *Influenza-virus-liposome lipid mixing is leaky and largely insensitive to the material properties of the target membrane*. *Biochemistry*, 1996. **35**(15):4956-65.
  94. Errington, J., *Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(3):175-8.

---

## Lebenslauf

<i>Name</i>	Sascha Jung
<i>Geburtsdatum</i>	23. März 1980
<i>Geburtsort</i>	Berlin
<i>Staatsangehörigkeit</i>	Deutsch

### *Bildungsweg*

<i>Seit 18. Februar 2005</i>	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit Zielsetzung Promotion
<i>17. Februar 2005</i>	Erhalt des akademischen Grades Diplom-Ingenieur
<i>Oktober 1999 bis Februar 2005</i>	Studium der medizinischen Biotechnologie an der Technischen Universität Berlin
<i>21. Juni 1999</i>	Allgemeine Hochschulreife
<i>1992 – 1999</i>	John-Lennon-Gymnasium / Berlin
<i>1986 – 1992</i>	4. Grundschule / Berlin

## Publikationen und Poster

### Teile dieser Arbeit wurden zur Publikation eingereicht:

**Jung, S.**, A.J. Dingley, R. Augustin, F. Anton-Erxleben, M. Stanisak, C. Gelhaus, T. Gutschmann, M.U. Hammer, R. Podschun, M. Leippe, T.C.G. Bosch, J. Grötzinger. *Hydramacin-1: Structure and antibacterial activity of a protein from the basal metazoan Hydra*. (in revision)

Bosch TCG, R. Augustin, F. Anton-Erxleben, S. Fraune, G. Hemmrich, H. Zill, P. Rosenstiel, G. Jacobs, S. Schreiber, M. Leippe, M. Stanisak, J. Grötzinger, **S. Jung**, R. Podschun, J. Bartels, J. Harder, J. Schröder. *Uncovering the evolutionary history of innate immunity: the simple metazoan Hydra uses epithelial cells for host defence*. (Zur Publikation eingereicht.)

### Weitere Publikationen:

**Jung, S.**, A. Patzelt, N. Otberg, G. Thiede, W. Sterry, J. Lademann. *Strategy of topical vaccination with nanoparticles*. (Zur Publikation eingereicht.)

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

**Jung, S.**, et al., *Innovative liposomes as a transfollicular drug delivery system: penetration into porcine hair follicles*. *J Invest Dermatol*, 2006. **126**(8):1728-32.

### Poster:

**Jung. S.**, A.J. Dingley, M. Stanisak, C. Gelhaus, R. Augustin, F. Anton-Erxleben, T.C.G. Bosch, M. Leippe, J. Grötzinger *A Highly Active Antibacterial Peptide From The Basal Metazoan Hydra: Structure & Mode Of Action*.  
2<sup>nd</sup> International Conference on Molecular Perspectives on Protein-Protein Interactions, Dubrovnik, June 27-July 1, 2008

**Jung, S.**, A.J. Dingley, M. Stanisak, C. Gelhaus, J. Harder, R. Podschun, T.C.G. Bosch, M. Leippe, J. Grötzinger. *Hydramacin-1: A Highly Active Antibacterial Peptide From The Ancient Metazoan Hydra*.  
International Workshop "Hydra and the development of animal form", Evangelische Akademie Tutzing, Germany, September 17-20, 2007

Bruhn, O., P. Regenhard, M. Michalek, S. Paul, C. Gelhaus, **S. Jung**, G. Thaller, R. Podschun, M. Leippe, J. Grötzinger, and E. Kalm. *A novel  $\alpha$ -defensin of the horse: gene transcription, recombinant expression and characterisation of the structure and function*.  
8<sup>th</sup> International Veterinary Immunology Symposium, Ouro Preto, Brazil, August 15-19, 2007.

## Danksagung

Es war eine inspirierende und lehrreiche Zeit, die ich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit erlebte. Dafür möchte ich im Nachfolgenden meinen Dank an diejenigen richten, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger, welcher mir die Möglichkeit gab mit diesem hochinteressanten Thema eine Promotion anzustreben. Ich möchte mich bei ihm für das entgegengebrachte Vertrauen, die inspirierende Beratung sowie die aktive Betreuung bedanken. Nicht zuletzt bedanke ich mich bei ihm für das zügige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein vorangestellter Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John, welcher mich am Institut für Biochemie aufnahm und an meinen Doktorvater vermittelte.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas C. G. Bosch für die Übernahme des Korreferats sowie zahlreiche Diskussionen und auch für die Einführung in die *Hydra community* in Tutzing (Bayern).

Herrn Dr. Andrew J. Dingley danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und seine unschätzbare Hilfe als *native speaker*.

Herrn Dr. René Augustin, Frau Dr. Friedericke Anton-Erxleben und Frau Antje Thomas möchte ich für ihren großartigen Einsatz bei allem rund um die Elektronenmikroskopie danken. Diese Versuche leisteten einen fruchtbaren Beitrag zur Formulierung des *barnacle*-Modells.

Bei Herrn Prof. Dr. Matthias Leippe bedanke ich mich für seine konstruktive Kritik, die höchstmotivierend wirkte.

Herrn Dr. Christoph Gelhaus danke ich insbesondere für seinen unermüdlichen Einsatz bei der Massenspektrometrie, nicht nur im Bezug auf das Hydramacin-1-Projekt, sowie für seinen essentiellen Beitrag zur Klärung der Disulfidverbrückung im Hydramacin-1.

---

Bei Herrn Prof. Rainer Podschun und Frau Silvia Voss bedanke ich mich für die Überprüfung der Aktivität der vielen verschiedenen Hydramacin-1-Chargen, die ich hergestellt habe.

Bei Herrn PD Dr. Jürgen Harder möchte ich mich vor allem für die Generierung des Expressionsvektors bedanken.

Herrn Matthias Michalek gilt mein besonderer Dank für die Herstellung von vielen, vielen hochqualitativen Liposomentypen, welche ich mit Hydramacin-1 zerstört habe. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für die umfassenden allfachlichen Diskussionen sowie zahlreiche Erklärungen diverser historischer Begebenheiten im Mittelaltertum bedanken. Nicht zuletzt danke ich ihm für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein Dank geht des Weiteren an Frau Dr. Inken Lorenzen für ihre fleißigen Erklärungen bezüglich der Auswertung der NMR-Spektren sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Dr. Justyna Myśliwy danke ich für ihren engagierten Einsatz bei meiner Einarbeitung am Institut für Biochemie. Des Weiteren möchte ich mich bei ihr für die fachlichen Diskussionen bedanken.

Nicht zu vernachlässigen ist der Einsatz von Frau Sonja Hollmer, Frau Janina Schröder, Frau Britta Hansen und Frau Patrycja Kozak. Bei Ihnen bedanke ich mich für ihren direkten und indirekten Einsatz bei der Herstellung von Hydramacin-1.

Natürlich danke ich auch meiner Familie für ihre Unterstützung, insbesondere meiner Frau Romy und meinem Bruder Stefan für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Sascha Jung, die vorliegende Dissertation, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen Doktorvater, selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Auch wurde die Dissertation bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt.

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

Kiel,.....

Sascha Jung

Referent/~~in~~: Herr Prof. Joachim Grötzingher.....

Korreferent/~~in~~: Herr Prof. Thomas C.G. Bosch.....

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 2008 .....

Zum Druck genehmigt: Kiel, .....

Der Dekan