

# Aufklärung der Tertiärstruktur der antimikrobiellen Peptide Alvinellacin und Theromacin mit Hilfe der NMR-Spektroskopie



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

vorgelegt von  
**Madlen Mohr**

Kiel 2010

Referent:

Prof. Dr. Joachim Grötzinger

Korreferent:

Prof. Dr. Matthias Leippe

Tag der mündlichen Prüfung:

15.12.2010

Zum Druck genehmigt:

09.02.2011

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

**Für meine Familie**

# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tertiärstrukturen der antimikrobiellen Peptide (AMP) Alvinellacin und Theromacin mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgeklärt.

Alvinellacin wurde in der Arbeitsgruppe von A. Tasiemski (*Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutive, Université de Lille, Frankreich*) entdeckt. Es stellt das erste AMP dar, dessen mRNA aus dem Pompejiwurm *Alvinella pompejana* isoliert wurde.

Die Tertiärstruktur von Alvinellacin zeigt eine G-förmige Konformation, welche aus *random coil*-Strukturelementen gebildet wird. Die in der Primärstruktur vorhandenen vier Cysteine bilden zwei Disulfidbrücken.

Auf Grund der analogen Primärstruktur von Alvinellacin, Arenicin-1 und Arenicin-2 wurde ein struktureller Vergleich der Tertiärstrukturen durchgeführt. Es konnte keine Analogie in der Tertiärstruktur der drei antimikrobiellen Peptide festgestellt werden. Daraufhin wurde ein Vergleich von Tertiärstrukturen kleiner Peptide durchgeführt. Dabei konnte eine strukturelle Analogie zu einem Toxin, dem  $\omega$ -Conotoxin MVIIC, aus der Meeresschnecke *Conus magus* festgestellt werden. Das  $\omega$ -Conotoxin MVIIC wird in die Familie der Conotoxine aus der Superfamilie der Omega-Toxin-ähnlichen Proteine eingeordnet. Die Tertiärstruktur von  $\omega$ -Conotoxin MVIIC weist *random coil*-Sekundärstrukturelemente auf. Keine der drei Cysteinbrücken des  $\omega$ -Conotoxins MVIIC weist eine ähnliche Position im Molekül, wie die von Alvinellacin, auf. Die einzigen Conotoxine, welche zwei Disulfidbrücken aufweisen, sind die  $\alpha$ -Conotoxine. Diese Toxine weisen keine strukturelle Analogie zu Alvinellacin auf.

Das zweite in der vorliegenden Arbeit charakterisierte AMP, Theromacin aus *Hirudo medicinalis*, weist eine Analogie in der Primärstruktur zu einem antimikrobiellen Peptid aus *Hydra vulgaris*, Hydramacin-1, auf. Dieses gehört zur Superfamilie der Skorpion-Toxin-ähnlichen Proteine. Die Tertiärstrukturen der Mitglieder dieser Superfamilie zeigen ein Cystein-stabilisiertes  $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Faltblatt-Motiv. Dieses CS $\alpha$ / $\beta$ -Motiv konnte bei der Aufklärung der Tertiärstruktur von Theromacin ebenfalls identifiziert werden. Das CS $\alpha$ / $\beta$ -Motiv besteht aus einer  $\alpha$ -Helix, die durch zwei Disulfidbrücken mit einem Strang des antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes verbunden ist. Eine weitere Disulfidbrücke verbindet den zweiten Strang des  $\beta$ -Faltblattes mit dem N-Terminus. Bei einem Vergleich der Strukturen von repräsentativen Mitgliedern dieser

Superfamilie konnte festgestellt werden, dass die höchste Analogie zu Hydramacin-1 besteht. Beide weisen eine zweite  $\alpha$ -Helix auf, welche in der Tertiärstruktur der anderen Mitglieder dieser Superfamilie nicht vorkommt. Im Weiteren konnte festgestellt werden, dass eine Disulfidbrücke aus dem *Cystein Knot* sich in einer anderen Position befindet, als die vergleichbare Disulfidbrücke der anderen Mitglieder. Theromacin stellt somit ein weiteres Mitglied der Macin-Familie dar.

## Summary

In this work the tertiary structure of two antimicrobial peptides, alvinellacin and theromacin, was solved using NMR-spectroscopy.

Alvinellacin was first described in the group of A. Tasiemski (*Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutive, Université de Lille, Frankreich*). It is the first antimicrobial peptide, which was found in the pompeji worm *Alvinella pompejana*. The tertiary structure of alvinellacin is G-shaped and is comprised of random coil structural elements. In the primary structure alvinellacin has four cysteines which constitute two disulfide bonds.

Due to the partial identity of the primary structure of alvinellacin, arenicin-1 and arenicin-2, a structural comparison was performed. No structural analogy between these three antimicrobial peptides was observed. A comparison with the tertiary structure of other small peptides revealed a structural analogy to  $\omega$ -conotoxin MVIIC, a toxin from *Conus magus*. The  $\omega$ -conotoxin MVIIC belongs to the conotoxin family of the superfamily of omega-toxin-like peptides. The tertiary structure of  $\omega$ -conotoxin MVIIC is comprised of random coil structural elements. Furthermore, it contains three disulfide bonds. None of them exhibits a similar position in the molecule as observed in alvinellacin. The only other conotoxins which contains two disulfide bonds are the  $\alpha$ -conotoxins. They do not show either structural analogy to alvinellacin.

The antimicrobial peptide theromacin from *Hirudo medicinalis*, exhibits a partial sequence identity to an antimicrobial peptide from *Hydra vulgaris*, the hydramacin-1, which belongs to the scorpion toxin-like superfamily. The tertiary structure of the members of this superfamily consists of a cysteine stabilized  $\alpha$ -helix/ $\beta$ -sheet motif. This CS $\alpha$ / $\beta$ -motif was also identified in theromacin. It is composed of an  $\alpha$ -helix which is connected via two disulfide bridges to one strand of the  $\beta$ -sheet. Another disulfide bridge connects the second strand of the  $\beta$ -sheet with the N-terminus. A structural comparison of representative members of this superfamily with theromacin reveals the highest structural analogy to hydramacin-1. Both peptides contain a second  $\alpha$ -helix, which is not present in any other member of this superfamily. Furthermore, it could be shown that one of the disulfide bridges from the cysteine knot shows another spatial position compared to other members.

Therefore, theromacin represents a further member of the macin family.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Summary .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Antimikrobielle Peptide im Überblick .....	1
1.2 Vielgestaltigkeit von antimikrobiellen Peptiden .....	3
1.3 Alvinellacin aus <i>Alvinella pompejana</i> .....	5
1.4 Theromacin aus <i>Hirudo medicinalis</i> .....	7
1.5 Aufklärung der Tertiärstruktur von Peptiden .....	10
1.5.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie .....	11
1.6 Ziel der Arbeit .....	16
2 Material und Methoden .....	17
2.1 Proteinreinigung .....	17
2.1.1 Renaturierung des synthetischen Alvinellacins .....	17
2.1.2 Expression von rekombinantem Theromacin in Minimalmedium .....	18
2.1.3 Zellaufschluss und Waschen von Einschlusskörpern .....	19
2.1.4 Immobilisierte Metallaффinitätschromatographie (IMAC) .....	20
2.1.5 Proteinkonzentrations-Bestimmung .....	21
2.1.6 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese .....	21
2.1.6.1 Coomassie-Färbemethode .....	24
2.1.7 Renaturierung des Theromacin-Fusionsproteins .....	24
2.1.8 Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins .....	26
2.1.9 Untersuchung auf freie Sulfhydrylgruppen ( <i>Ellmans-assay</i> ) .....	26
2.1.10 Gradienten-RP-HPLC und Lyophilisation .....	26
2.2 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) .....	28
2.2.1 Probenvorbereitung .....	28
2.2.2 Durchführung der NMR-Experimente .....	28
2.2.3 Identifikation des Spinsystems von Aminosäuren und die sequenzspezifische Zuordnung .....	31
2.2.4 Zuordnung struktureller Signale .....	31
2.2.5 Strukturberechnung .....	31
3 Ergebnisse .....	33

3.1	Aufklärung der Tertiärstruktur von Alvinellacin .....	33
3.1.1	Renaturierung und Proteinreinigung .....	33
3.1.2	Die NMR-spektroskopische Aufklärung der Tertiärstruktur von Alvinellacin .....	34
3.1.3	Die Disulfidverbindungen von Alvinellacin.....	39
3.1.4	Die Tertiärstruktur von Alvinellacin.....	40
3.1.5	Vergleich der Tertiärstrukturen von Alvinellacin, Arenicin-1 und Arenicin-2 .....	44
3.1.6	Vergleich der Tertiärstruktur von Alvinellacin und Mitgliedern der Omega-Toxin-ähnlichen Proteinsuperfamilie.....	44
3.2	Aufklärung der Tertiärstruktur von Theromacin .....	46
3.2.1	Expression, Renaturierung und Proteinreinigung.....	46
3.2.2	Die NMR-spektroskopische Aufklärung der Tertiärstruktur von Theromacin .....	48
3.2.3	Die Disulfidverbindungen von Theromacin.....	68
3.2.4	Die Tertiärstruktur von Theromacin.....	69
3.2.5	Vergleich der Tertiärstruktur von Theromacin mit Vertretern der Skorpion-Toxin-ähnlichen Proteinsuperfamilie .....	76
4	Diskussion .....	79
4.1	Die Tertiärstruktur von Alvinellacin .....	79
4.1.1	Vergleich der Tertiärstrukturen von Alvinellacin mit denen der Conotoxine .....	79
4.1.2	Vergleich der Tertiärstrukturen von Alvinellacin, Arenicin-1 und Arenicin-2 .....	81
4.2	Die Tertiärstruktur von Theromacin .....	82
5	Ausblick.....	85
6	Abkürzungsverzeichnis.....	87
7	Abbildungsverzeichnis.....	89
8	Tabellenverzeichnis.....	92
9	Literaturverzeichnis .....	93
10	Lebenslauf .....	100
11	Poster .....	101
12	Danksagung.....	102
13	Erklärung .....	104



# 1 Einleitung

Im Zusammenleben von unterschiedlichen Organismen ist es wichtig, sich gegen pathogene Spezies wehren zu können. Hierbei spielt die angeborene Immunität eine entscheidende Rolle. Die erste Abwehrreaktion eines vielzelligen Organismus gegenüber einer Infektion mit pathogenen Mikroorganismen ist die Ausschüttung von sogenannten antimikrobiellen Peptiden (AMPs) (Jenssen et al., 2006). Die AMPs sind eine evolutionär alte, sehr effektive Komponente der angeborenen Immunität (Nijnik und Hancock, 2009).

## 1.1 Antimikrobielle Peptide im Überblick

Antimikrobielle Peptide sind in der Natur stark verbreitet. Sie kommen sowohl bei Mikroorganismen als auch bei vielzelligen Lebewesen im pflanzlichen oder tierischen Reich vor (Bulet et al., 2004). Als zumeist kationische Peptide werden sie als Vorläuferpeptide exprimiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert (Hancock und Stahl, 2006). Sie besitzen eine antimikrobielle Aktivität gegen Pilze, Viren und Prokaryonten (Guiliani et al., 2008). Weiterhin ist bekannt, dass einige AMPs die Entstehung von Tumoren verhindern können (Hoskin und Ramamoorthy, 2008). Antimikrobielle Peptide interagieren mit der Zellmembran der Mikroorganismen und zerstören sie (Mukherjee et al., 2008). Es ist den Mikroorganismen bislang noch nicht gelungen, eine Resistenz gegen antimikrobielle Peptide zu entwickeln. Um dies zu erreichen, müssten sie die Zusammensetzung ihrer Zellmembran grundlegend verändern (Gallo et al., 2002). Durch die vielseitigen Eigenschaften der Zellmembran wäre eine Änderung der Zusammensetzung mit dem Überleben nicht vereinbar. Somit sind AMPs sehr interessant für die therapeutische Behandlung von Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen.

Schon kurz nach der Entdeckung des Penicillins durch Sir Alexander Fleming wurden erste Penicillin-resistente Bakterienstämme bekannt (Alanis, 2005). Mittlerweile sind Bakterienstämme bekannt, die gegen mehrere Antibiotika gleichzeitig resistent sind (Rice, 2009). Aus einer Studie von Takahashi et al. (2010) geht hervor, dass circa 70 % der Bakterien mindestens gegen ein Antibiotikum

resistent sind. Dies wirft in der medizinischen Praxis große Probleme auf, welche durch therapeutische Anwendung antimikrobieller Peptide aufgehoben werden könnten.

Die ersten bakteriziden Lösungen wurden schon in den 90'er Jahren des 19. Jahrhunderts nachgewiesen (Hankin, 1892). Erst 30 Jahre später wurde ein antimikrobielles Protein, das Lysozym, aus der Tränenflüssigkeit beschrieben (Ridley, 1928). Zum heutigen Zeitpunkt sind in der APD-Datenbank (engl.: *antimicrobial peptide databank*; <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) (Wang et al., 2004) bereits 1618 antimikrobielle Peptide bekannt (Stand: 06. September 2010). Von diesen Peptiden haben 1261 eine antibakterielle, 101 eine antifungale, 485 eine antivirale und 100 eine antitumoröse Funktion.

Antimikrobielle Peptide sind meist kleine (< 100 Aminosäuren) Moleküle (Jenssen et al., 2006), die in Lösung oder durch Interaktionen mit den negativ-geladenen Bestandteilen einer bakteriellen Zellmembran eine Struktur mit einer amphiphilen Ladungsverteilung annehmen können (McPhee und Hancock, 2005). Dies ermöglicht es dem Peptid an die Membran zu binden und in den hydrophoben Kern dieser zu inserieren (Chu-Kung et al., 2010). Dabei wird meistens die bakterielle Zellmembran zerstört, was als Hauptwirkmechanismus von AMPs anerkannt ist. Mittlerweile wurden unterschiedliche Peptid-Lipid-Interaktionen entdeckt, welche zu fünf Modellen der antimikrobiellen Aktivität geführt haben (Tang und Hong, 2009; Jenssen et al., 2006; Jung et al., 2009): das *barrel-stave model*, das *carpet model*, das *aggregate model*, das *toroidal model* und das *barnacle model*.

Im *barrel-stave model* sowie im *toroidal model* wird eine Pore gebildet, durch welche die Zelle lysiert wird (Brogden, 2005; Hancock und Rozek, 2002). Eine Störung der Membranintegrität wird durch das *carpet model* und das *aggregate model* hervorgerufen (Melo et al., 2009; Zasloff, 2002). Im fünften Modell, dem *barnacle model*, kommt es zum „Verkleben“ von Bakterienzellen (Jung et al., 2009).

Die beschriebenen Wechselwirkungen zwischen AMPs und Membranen führen zu einer Störung der Membranintegrität. Infolge dessen kommt es zu einer Depolarisierung der Membran oder einem Ausströmen des Zellinhaltes. Dies führt zum Tod der Zellen.

Ein weiterer Mechanismus ist die Translokation der Peptide ins Cytosol, die nach einer Anlagerung an die Zellmembran erfolgt. Im Cytosol stören sie

überlebenswichtige zelluläre Prozesse, wie die Aktivität von Enzymen oder die Synthese von Nukleinsäuren und Proteinen (Jenssen et al., 2006).

Trotz der wenigen unterschiedlichen Wirkmechanismen, sind antimikrobielle Peptide in ihrer Struktur sehr divers.

## 1.2 Vielgestaltigkeit von antimikrobiellen Peptiden

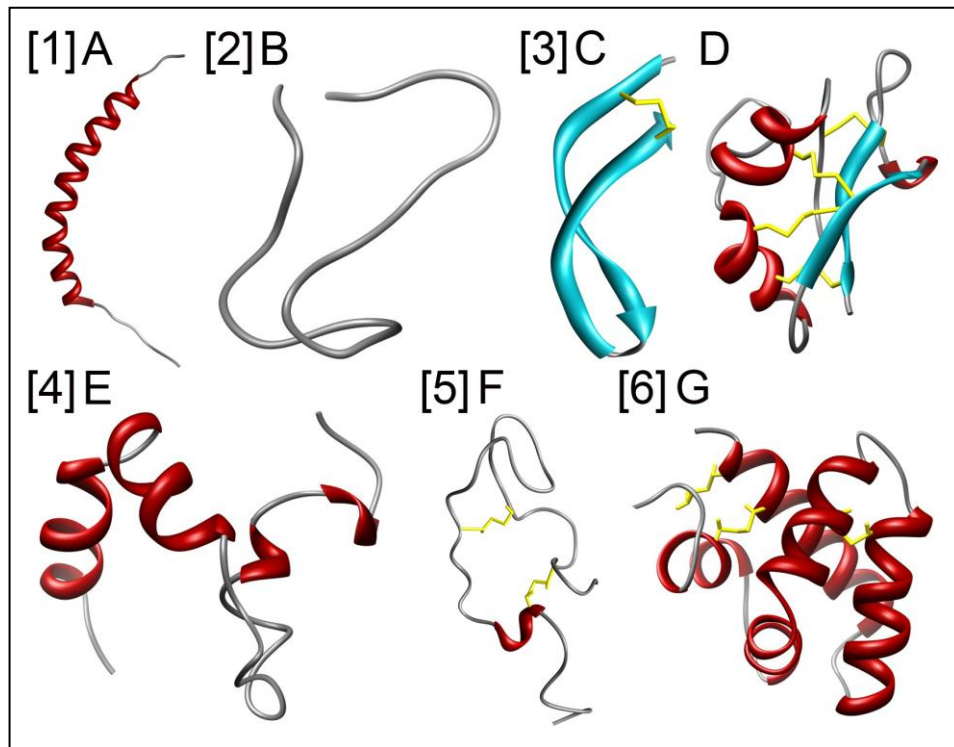
Antimikrobielle Peptide sind zumeist positiv geladene Peptide (Powers und Hancock, 2003). Nur einige wenige anionische Peptide, wie beispielsweise das humane Dermcidin (Schitteck et al., 2001) und das Theromyzin des Egels *Theromyzon tessulatum* (Tasiemski et al., 2004), wurden bisher charakterisiert.

Antimikrobielle Peptide lassen sich auf Grund ihrer Sekundärstrukturelemente in fünf Gruppen unterteilen (Diamond et al., 2009; Brodgen, 2005) (Abbildung 1-1):

1. Lineare,  $\alpha$ -helikale Peptide, ohne stabilisierende Disulfidbrücken, die bei Kontakt mit einer bakteriellen Zellmembran eine amphiphile Struktur annehmen (Diamond et al., 2009); (zum Beispiel Cecropine, Magainine, Moricin (Abbildung 1-1A), Kassinin und Melittin),
2. Lineare Peptide, mit einem großen Gehalt an einer Aminosäure, ohne Cysteine (Diamond et al., 2009), (z. B. tryptophanreiches Indolicidin, glycinreiches Microcin J25 (Abbildung 1-1B)),
3. Antimikrobielle Peptide, mit einer oder mehreren, zumeist hochkonservierten, Disulfidbrücken (Brogden, 2005), (z.B. Skorpion-Toxin-ähnliche Peptide (Abbildung 1-1D), Pflanzen-, Insekten-, Arthropoden-, Mammaliandefensine, Arenicine (Abbildung 1-1 C) oder Scarabaecine),
4. Anionische Peptide, (z.B. Dermcidin (Abbildung 1-1E) und Theromyzin),
5. Antimikrobielle Peptide, die Fragmente größerer Proteine sind (Diamond et al., 2009), (z.B. Lactoferricin (Abbildung 1-1F), Cathelicidine, Dermaseptin).

Der APD-Datenbank (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) kann man entnehmen, dass etwa die Hälfte der bekannten Peptide noch keine Strukturklassifizierung nach dieser Einordnung haben (Stand: 11.9.2010). Die Peptide der Saposin-Superfamily gehören

zu den bisher noch nicht in diese Einordnung klassifizierten Peptiden (Gruppe 6). Es sind ausschließlich  $\alpha$ -helikale Peptide. Fast alle Peptide dieser Superfamilie verfügen über sechs konservierte Cysteine, die an der Bildung von drei intramolekularen Disulfidbindungen beteiligt sind. Das antimikrobielle Peptid NK-Lysin (Fig. 1-1G) gehört zu dieser Superfamilie.



**Abb. 1-1: Übersicht über die Diversität der antimikrobiellen Peptide.** Die Strukturen von Mitgliedern jeder Gruppe sind als *Ribbon-Modell* dargestellt. Gruppe 1: A) Moricin (*Manduca sexta*, pdb-Code 2JR8); Gruppe 2: B) Microcin J25 (*Escherichia coli*, pdb-Code 1GR4); Gruppe 3: C) Arenicin-1 (*Arenicola marina*, pdb-Code 2JSB), D) Hydramacin-1 (*Hydra vulgaris*, pdb-Code 2K35); Gruppe 4: E) humanes Dermcidin (pdb-Code 2KSG); Gruppe 5 F) humanes Lactoferricin (pdb-Code 1Z6W); unter Gruppe 6 ist G) das porcine NK-Lysin (L; pdb-Code 1NKL) dargestellt. Disulfidverbindungen sind in gelb dargestellt.

Auf Grund von unterschiedlichen Strukturmerkmalen innerhalb einer Gruppe, wurde eine Unterteilung nach der Ausbildung der Tertiärstruktur vorgeschlagen (Jenssen et al., 2006). Diese erfolgt in Peptide mit  $\beta$ -Faltblättern oder  $\alpha$ -Helices, Peptide mit Schleifenstruktur, *extended peptides* und Peptide mit gemischten Strukturen.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Aurélie Tasiemski (*Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutive, Université de Lille, Frankreich*) wurden unlängst zwei AMPs, das Alvinellacin aus *Alvinella pompejana* und das Theromacin aus *Hirudo*

*medicinalis* (Tasiemski et al., 2004), gefunden. In der vorliegenden Arbeit soll die Tertiärstruktur von beiden AMPs aufgeklärt werden.

### 1.3 Alvinellacin aus *Alvinella pompejana*

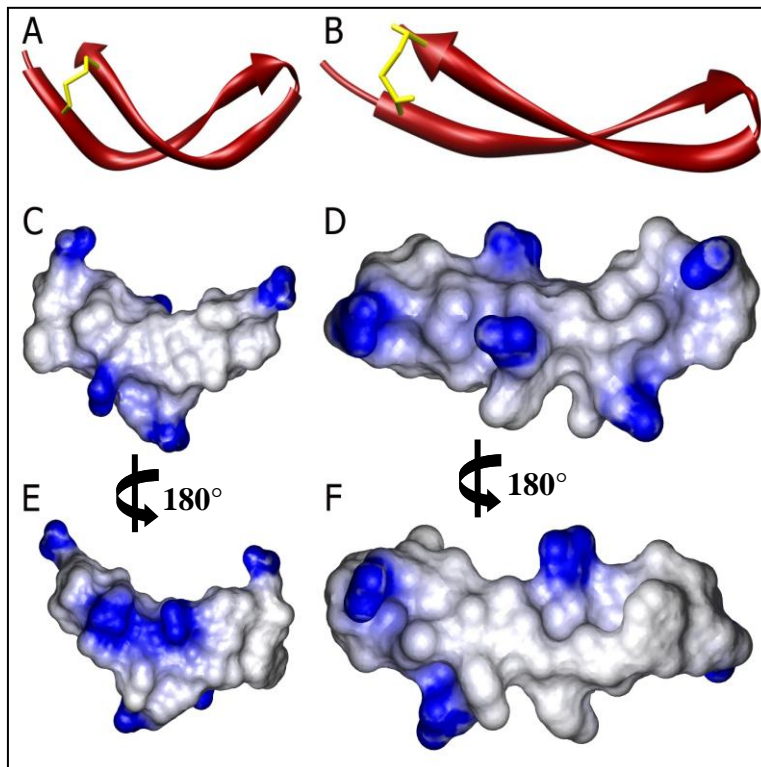
Alvinellacin ist ein 22 Aminosäurenlanges antimikrobielles Peptid (Prof. Aurélie Tasiemski, *Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutive, Université de Lille*, Frankreich). Die mRNA wurde aus dem Pompejiwurm *Alvinella pompejana*, welcher 1980 erstmals von Desbruyères und Laubier beschrieben wurde (Juniper und Martineu, 1995), isoliert. *Alvinella pompejana* gehört zur Familie der Alvinellidae innerhalb des Stammes Annelida (Rousset et al., 2003). Der Pompejiwurm kommt ausschließlich an Schwarzen Schloten der hydrothermalen Quellen vor. Um die Schwarzen Schlote herum herrscht eine Wassertemperatur von rund 80 °C. Im Weiteren ist das Wasser mit giftigem Schwefelwasserstoff angereichert. Auf Grund seines Lebensraums gehört der Pompejiwurm zu den Eukaryonten, die die höchste Thermotoleranz zeigen (Shin et al., 2009).

Der natürliche Lebensraum des Pompejiwurms sind dünne Röhren an den äußeren Wänden der Schwarzen Schlote (Abbildung 1-2) (Haddad et al., 1995). Eine Besonderheit dieser Würmer ist, dass sie dorsal symbiotische Bakterienkolonien tragen, welche den Würmern die Nährstoffe liefern (Le Bris und Gaill, 2007). In der Arbeitsgruppe von Aurélie Tasiemski (*Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutive, Université de Lille*, Frankreich) konnte ein antimikrobielles Peptid, Alvinellacin, nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe von A. Tasiemski konnte zeigen, dass Alvinellacin in epitheliale Gewebe exprimiert wird. Bei der Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität konnte Dr. Henning Fedders (Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Leippe, Institut für Zoologie, CAU Kiel) nachweisen, dass es gram-positive und -negative Bakterien mittels Porenbildung lysieren kann. Alvinellacin zeigt eine ähnlich starke antimikrobielle Aktivität wie Magainin-2 und Cecropin P1. Diese Aktivität scheint keinen Einfluss auf die symbiotische Lebensweise von *Alvinella pompejana* und den assoziierten Bakterien zu haben.



**Abb. 1-2: *Alvinella pompejana* und sein Lebensraum (modifiziert nach Le Bris und Gaill, 2007).** Links: *A. pompejana* ausserhalb der Wohnröhre mit sichtbaren weißen filamentösen Epibionten. Rechts: bewohnte Röhren bedecken eine Wand eines Schwarzen Schlot; der rote Kreis markiert einen Pompejiwurm in seiner Wohnröhre.

Weiterhin weist Alvinellacin eine starke Sequenzidentität zu Arenicin-1 und Arenicin-2 auf. Beide Peptide sind 21 Aminosäuren lang. Sie bilden ein zweisträngiges, Disulfid-stabilisiertes, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt aus. Dieses ist rechtsgängig gedreht (Abbildung 1-3 A und B), wodurch ein amphiphatisches Oberflächenpotential entsteht (Abbildung 1-3 C-F) (Ovchinnikova et al, 2007, Andrä et al., 2008). Die Peptide besitzen antimikrobielle Aktivität gegenüber Pilzen und gram-positiven sowie gram-negativen Bakterien. Ovchinnikova et al. (2007) konnten für Arenicin-2 und Andrä et al. (2008) für Arenicin-1 zeigen, dass beide Arenicinvarianten Poren-bildende Peptide sind.



**Abb. 1-3: Die Tertiärstrukturen und Oberflächenpotentiale von Arenicin-1 und Arenicin-2.** A) *Ribbon*-Darstellung von Arenicin-1, in C) und E) ist das Oberflächenpotential dargestellt. Die Orientierung der Struktur in C) entspricht der in Abbildung 1-3 A), B) *Ribbon*-Darstellung von Arenicin-2, in D) und F) ist das Oberflächenpotential dargestellt. Die Orientierung der Struktur in D) entspricht der in Abbildung 1-3 B).  $\beta$ -Faltblätter sind in rot, Disulfidbrücken in gelb angegeben, kationische Aminosäuren in blau, ungeladene Areale in weiß.

Auf Grund der sehr ähnlichen Primärstruktur zwischen Alvinellacin und den Arenicinen ist eine vergleichbare Tertiärstruktur denkbar. Daher soll in der vorliegenden Dissertation die Tertiärstruktur von Alvinellacin aufgeklärt werden.

## 1.4 Theromacin aus *Hirudo medicinalis*

Theromacin ist ein 75 Aminosäurenlanges, antimikrobielles Peptid, welches aus *Theromyzon tessulatum* isoliert wurde (Tasiemski et al., 2004). Mittlerweile ist ein Transkriptom für Theromacin auch in anderen Spezies, *Hirudo medicinalis*, sowie anderen Stämmen, Nematoda (*Heterorhabditis bacteriophora* (Bai et al., 2009)) und Molluska (*Hyriopsis cumingii* (Xu et al., 2010), *Biomphalaria glabrata* (Ittiprasert et al., 2010)) identifiziert worden.

In der vorliegenden Dissertation wurde die Theromacin-Variante aus *Hirudo medicinalis* verwendet. Der medizinische Blutegel *Hirudo medicinalis* (Abbildung 1-4) wird schon seit Jahrhunderten in der Medizin verwendet. Im Speichel des Blutegels konnten bisher Anästhetika, Gefäß-erweiternde Substanzen, Antigerinnungs- und Dispersionsmittel (Andrews, 2001) aber keine antimikrobiellen Peptide nachgewiesen werden. Durch die Entdeckung von Theromyzin und Theromacin (Tasiemski et al.,



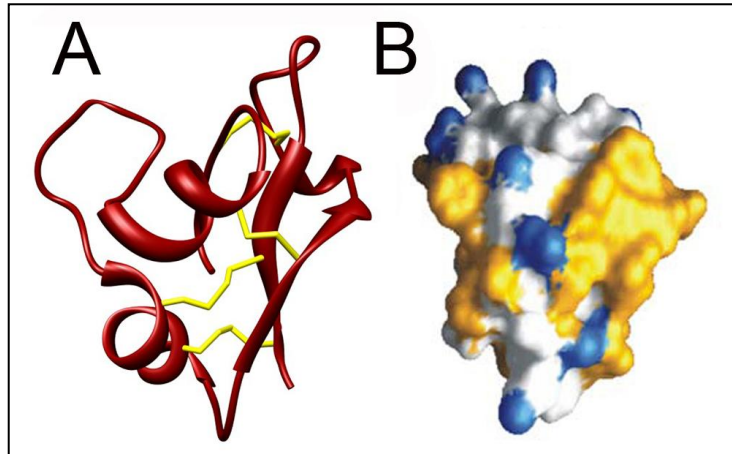
2004) wurden die ersten antimikrobiellen Peptide aus einem Egel isoliert. Schikorski et al. (2008) konnten zwei weitere antimikrobielle Peptide, Neuromacin und Hm-Lumbricin, des Blutegels charakterisieren. Hm-Lumbricin ist, wie schon für Lumbricin-1 (Cho et al., 1998) gezeigt, aktiv gegen Pilze, gram-positive und gram-negative Bakterien. Neuromacin dagegen zeigt nur eine Aktivität gegen gram-positive Bakterien. Im Weiteren konnten Schikorski et al. (2008) zeigen, dass beide Peptide eine sehr wichtige Rolle in der neuronalen Regeneration spielen.



**Abb. 1-4: *Hirudo medicinalis*, der medizinische Blutegel (modifiziert nach Jauker und Clauss, 2003).** Der Blutegel befindet sich am Stengel der Kanadischen Wasserpest (*Elodea canadensis*).

Neuromacin und Theromacin, welche beide kationische AMPs sind, zeigen eine auffällige Ähnlichkeit in der Primärstruktur zu einem antimikrobiellen Peptid aus *Hydra vulgaris*, Hydramacin-1. Hydramacin-1 besitzt antimikrobielle Aktivität gegenüber gram-positiven als auch gram-negativen Bakterien (Jung et al., 2009). Es zeigt strukturell eine zweiteilige  $\alpha$ -Helix und ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt. Beide sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden, welche dem Protein Stabilität verleihen (Abbildung 1-5 A). Hydramacin-1 zeigt eine sehr außergewöhnliche Verteilung hydrophober Aminosäuren auf der Oberfläche. Hierbei werden zwei hydrophobe Bereiche von einem Ring aus positivgeladenen Aminosäuren voneinander getrennt (Abbildung 1-5 B).



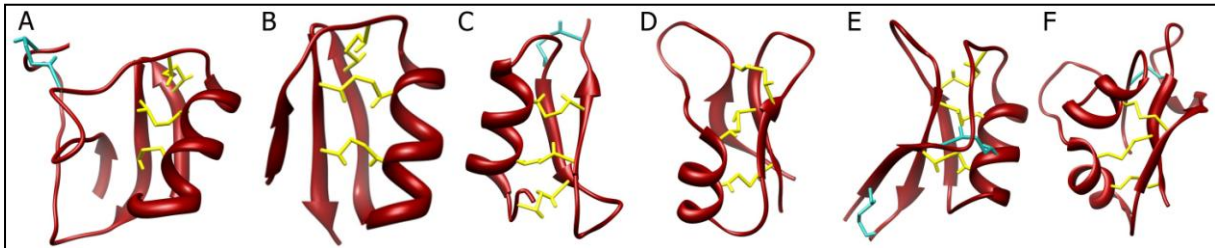


**Abb. 1-5: Die Tertiärstruktur und die molekulare Oberfläche von Hydrumacin-1.** A) *Ribbon*-Darstellung von Hydrumacin-1. Disulfidbrücken sind gelb dargestellt. B) Verteilung der hydrophoben (gelb) und kationischen (blau) Aminosäuren (modifiziert nach Jung et al., 2009). Die Orientierung ist gegenüber A) um 90° in der Horizontalen gedreht.

Jung et al. (2009) konnten Hydrumacin-1 auf Grund seiner Disulfidverbrückung (Abbildung 1-5 A) und seiner dreidimensionalen Struktur der Superfamilie der Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptide zuordnen. Nach einem Vergleich mit Mitgliedern der fünf Familien der Skorpion-Toxin-ähnlichen Proteinsuperfamilie schlugen sie für Hydrumacin-1 eine neue Familie innerhalb dieser Superfamilie vor. Die Familie der Macine beinhaltet zurzeit drei Mitglieder (Hydrumacin-1, Neuromacin und Theromacin), die auf Grund ihrer ähnlichen Primärstrukturen und konservierten Cysteinverteilung zusammengefasst wurden.

Die weiteren Familien der Superfamilie sind die *long scorpion toxins*, *short scorpion toxins*, MGD-1 Defensine (Muscheldefensine), Insektendefensine und Pflanzendefensine (Abbildung 1-6). Die Mitglieder dieser Superfamilie vereinen ein breites Funktionsspektrum. Alle Peptide sind antimikrobiell aktiv, entweder gegen Pilze oder gram-positive oder gram-negative Bakterien. Für die Skorpiontoxine ist weiterhin bekannt, dass sie unterschiedliche Ionenkanäle mit unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen durch Inhibition oder Verschiebung des Aktionspotenzials (ins Negative) steuern (Cheek et al., 2006, Jablonsky et al., 2001, Bulet et al., 1999). Trotz dieser sehr unterschiedlichen Funktionen haben die Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptide im Aufbau ihrer Tertiärstruktur die gleiche Faltungstopologie (Abbildung 1-6).

Bei allen ist eine  $\alpha$ -Helix durch zwei Disulfidbrücken mit einem  $\beta$ -Faltblattstrang verbunden. Eine dritte Disulfidbrücke verbindet den zweiten Strang des  $\beta$ -Faltblattes mit dem N-Terminus des Peptides. Dieses Motiv wurde zuerst von Kobayashi et al. (1991) entdeckt und anschließend von Cornet et al. (1995) als Cystein-stabilisiertes  $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Sheet Motiv (CS $\alpha$ / $\beta$ -Motiv) benannt.



**Abb. 1-6: Übersicht über die unterschiedlichen Familien der Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptide.**  
A) *long scorpion toxins* (Neurotoxin CsE-v5 aus *Centruroides sculpturatus*, pdb-Code: 1NH5), B) *short scorpion toxins* (OSK1-Toxin aus *Orthochirus scrobiculosus*, pdb-Code: 1SCO); C) MGD-1 Defensin (*Mytilus galloprovincialis*, pdb-Code: 1FJN); D) Insektendefensin (Heliomicin aus *Heliothis virescens*, pdb-Code 1I2U); E) Pflanzendefensin (PhD1 aus *Petunia hybrida*, pdb-Code: 1N4N); F) Macin (Hydramacin aus *Hydra vulgaris*, pdb-Code: 2K35). Konservierte Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt, zusätzliche in blau.

Auf Grund der Ähnlichkeit der Primärstruktur von Theromacin zu den Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptiden und im Besonderen zu Hydramacin soll in der vorliegenden Arbeit die Tertiärstruktur von Theromacin aufgeklärt und mit den Tertiärstrukturen von Vertretern der Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptide verglichen werden.

## 1.5 Aufklärung der Tertiärstruktur von Peptiden

Die Funktion eines Proteins ist von seiner Tertiärstruktur abhängig. Eine Ähnlichkeit in der Primärstruktur muss dabei nicht vorliegen (Pallaghy et al., 1994). Im Weiteren führt ein Vergleich unterschiedlicher Peptide dazu, dass man die Peptide auf Grund ihrer Faltung klassifizieren kann.

Neben der Röntgenstrukturanalyse ist die Kernmagnetresonanz-Spektroskopie (*Nuclear magnetic resonance*, NMR) das wichtigste Verfahren zur Strukturaufklärung von Proteinen (Stryer, 1999). Unabhängig voneinander wurden von Bloch et al. und Purcell et al. 1946 die Kernresonanz-Signale von Atomkernen entdeckt. Dies legte den Grundstein für die NMR-Spektroskopie. Zu Anwendungsmöglichkeiten in der

Proteinbiochemie kam es erst in den 60er Jahren, nachdem die Fourier-Transformation und die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie eingeführt wurden (Ernst und Anderson, 1966; Wüthrich, 1986). Durch diese Neuerungen wurde sie zu einer Standardmethode für die Bestimmung der Struktur von Proteinen mit einer Größe von bis zu 100 kDa (Fiaux et al., 2002). Zusätzlich dazu ist sie eine bewährte Methode zur Charakterisierung der Dynamik und der Wechselwirkungen von Molekülen (Simon und Sattler, 2004).

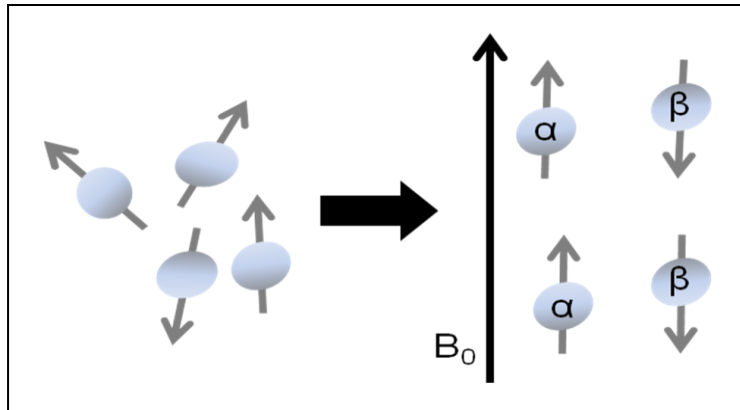
### 1.5.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Viele Atomkerne weisen einen Kernspin auf. Dieser verursacht ein magnetisches Moment ( $\mu$ ). Dabei kann das magnetische Moment mit einem äußeren Magnetfeld in Wechselwirkung treten. Durch diese Wechselwirkung entsteht eine kernmagnetische Resonanz. Sie beschreibt die Aufspaltung der Energieniveaus des Kernspins eines Atomkerns in mehrere Zustände. Atomkerne, die in der NMR-Spektroskopie angewendet werden, besitzen einen Gesamtspin von  $I = \frac{1}{2}$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) (Tabelle 1). Das gyromagnetische Verhältnis ( $\gamma$ ) beschreibt die Empfindlichkeit eines Kerns in einem NMR-Experiment. Je größer das gyromagnetische Verhältnis ist, desto größer ist die Empfindlichkeit des Atomkerns. Es ist für verschiedene Elemente charakteristisch (Tabelle 1).

**Tab. 1-1: Kernspin, natürliche Häufigkeit und gyromagnetische Verhältnisse einiger Atomkerne.**

Kernisotop	Spin	Natürliche Häufigkeit	$\gamma$ (gyromagnetisches Verhältnis) [ $10^7$ rad T $^{-1}$ s $^{-1}$ ]
$^1\text{H}$	$\frac{1}{2}$	99,98	26,7519
$^2\text{H}$	1	0,016	4,1066
$^{12}\text{C}$	0	98,9	-
$^{13}\text{C}$	$\frac{1}{2}$	1,108	6,7283
$^{14}\text{N}$	1	99,63	1,9338
$^{15}\text{N}$	$\frac{1}{2}$	0,37	-2,712

Durch Verwendung eines statischen Magnetfeldes ( $B_0$ ) werden die Kernspins entlang des äußeren Magnetfeldes entsprechend der Boltzmann-Verteilung ( $N_\alpha/N_\beta = e^{-\Delta E/kT} = e^{-\hbar\gamma B_0/kT}$ ) in paralleler  $\alpha$ - ( $\uparrow$  *spin up*) oder antiparalleler  $\beta$ - ( $\downarrow$  *spin down*) Orientierung ausgerichtet (Abbildung 1-7). Dabei ist  $k$  die Boltzmann-Konstante und  $T$  die absolute Temperatur.  $\Delta E = \hbar\gamma B_0$  beschreibt die Energiedifferenz.

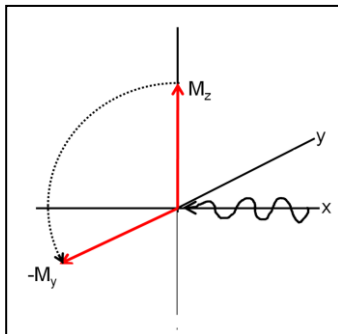


**Abb. 1-7: Ausrichtung der Atomkerne mit und ohne äußerem Magnetfeld  $B_0$ .** Durch den Einfluss eines äußeren Magnetfeldes richten sich die Atomkerne in paralleler oder antiparalleler Orientierung aus.

Da der  $\alpha$ -Zustand ein leicht niedrigeres Energieniveau als der  $\beta$ -Zustand aufweist, befinden sich mehr Orientierungen im  $\alpha$ -Zustand. In einer Präzessionsbewegung um die Richtung der Feldlinien des äußeren Magnetfeldes rotiert zusätzlich das magnetische Moment eines Atomkerns. Die Frequenz dieser Rotation, die im Bereich von Radiowellen liegt, wird als Larmor-Frequenz bezeichnet. Sie ist für jeden Kern desselben Elements eine charakteristische Größe. Durch die chemische Umgebung eines Kerns wird die Larmor-Frequenz beeinflusst. Dies geschieht durch die Elektronenwolken des betrachteten Kerns und die der Nachbaratome, welche schwache magnetische Felder erzeugen. Dabei werden die Atomkerne vom äußeren Feld abgeschirmt, was als chemische Verschiebung bezeichnet wird. Die chemische Verschiebung wird in *parts per million* (ppm) angegeben. Zwei Protonen desselben Moleküls, welche unterschiedliche Nachbaratome haben, können durch die abweichenden Larmor-Frequenzen beziehungsweise chemischen Verschiebungen unterschieden werden.

Die Gesamtmagnetisierung  $M_0$  ergibt sich aus der Addition der magnetischen Momente der einzelnen Kernspins. Diese existiert entlang des Magnetfeldes und wird als longitudinale oder z-Magnetisierung bezeichnet.

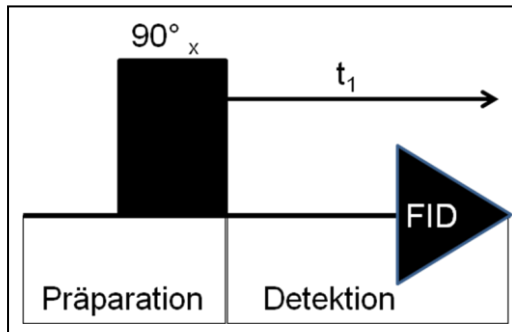
Legt man zum bereits bestehenden Magnetfeld  $B_0$  senkrecht ein weiteres Magnetfeld  $B_1$  durch Einstrahlen eines Radiofrequenzpulses (RF-Puls) an, wird eine transversale x- bzw. y-Magnetisierung erzeugt. (Abbildung 1-8).



**Abb. 1-8: Wirkung eines 90° Pulses auf die z-Magnetisierung.**

Der aus x-Richtung kommende Puls dreht die Magnetisierung um 90°. Dies erfolgt rechtsseitig um die x-Achse. Dabei entsteht die (-y)-Magnetisierung.

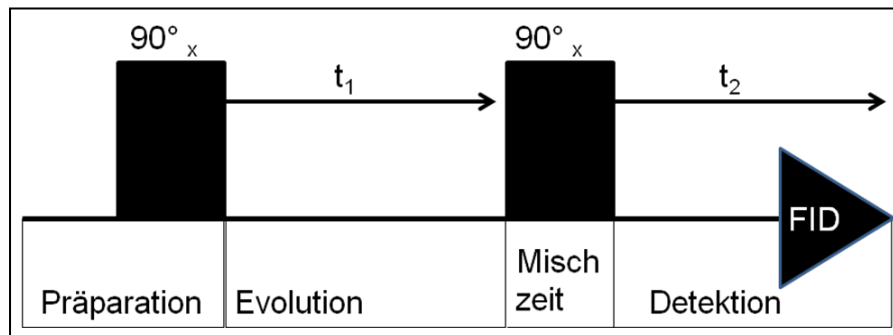
Dies geschieht, wenn die Kerne des Moleküls die Radiofrequenzen im Bereich ihrer Larmor-Frequenz absorbieren. Es führt zur Induktion einer nachweisbaren Spannung in der Empfängerspule, da die makroskopische Gesamtmagnetisierung aus dem thermodynamischen Gleichgewicht gebracht wurde. Als Relaxation wird das Streben der Gesamtmagnetisierung in den Grundzustand bezeichnet. Diese wird durch die longitudinale Relaxation  $T_1$  sowie die transversale Relaxation  $T_2$  charakterisiert. Die longitudinale Relaxation ist abhängig von der Wechselwirkung der Spins mit ihrer Umgebung. Sie wird auch als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet. Dagegen ist die transversale Relaxation abhängig von Wechselwirkungen der Spins untereinander. Sie wird als Spin-Spin-Relaxation bezeichnet. Bei kleinen Molekülen besitzen  $T_1$  und  $T_2$  etwa gleiche Werte, bei größeren verkürzt sich die  $T_2$ -Relaxation gegenüber  $T_1$ . Dies hat zur Folge, dass die Signale bei größeren Proteinen schwächer werden, da die Spins in der Empfängerspule nur kurz eine Spannung auslösen. Die Abnahme der Signalstärke wird, auf Grund der zeitlichen Abnahme der Signalamplitude, als FID (*free induction decay*, „Freier Induktionszerfall“) bezeichnet. Unter Verwendung der Fourier-Transformation wird der FID aus der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne überführt. Dabei entsteht als einfachste Form ein eindimensionales (1D) Spektrum. Das eindimensionale Spektrum setzt sich aus einem Präparations- und einem Detektionsschritt zusammen. Der Präparationsschritt beinhaltet die Anregung der magnetisch aktiven Kerne, der Detektionsschritt die Messung des FID (Abbildung 1-9).



**Abb. 1-9: Schematische Darstellung der Pulssequenz eines eindimensionalen NMR-Experimentes.** Ein 1D-Experiment besteht aus der Präparation und der Detektion. Der  $90^\circ$  Puls ist durch einen Balken dargestellt.

Ein eindimensionales NMR-Spektrum erhält man nach anschließender Fourier-Transformation. In diesem ist die Signalintensität über der chemischen Verschiebung aufgetragen. Ein 1D-Spektrum ist allerdings nur für kleine Moleküle sinnvoll, da sich bei größeren Molekülen die Signale überlagern. Eine solche Überlagerung kann durch Einbringen von anderen Kernen, welche die Eigenschaft des Kernspins besitzen, oder durch Einführung zusätzlicher spektraler Dimensionen umgangen werden.

Für ein homonukleares, zweidimensionales NMR-Experiment werden, zusätzlich zu dem Präparations- und Detektionsschritt, eine Evolutionszeit  $t_1$  und eine Mischzeit eingefügt (Abbildung 1-10).



**Abb. 1-10: Schematische Darstellung der Pulssequenz eines homonuklearen 2D-NMR-Experimentes.** Durch das Einfügen der Evolutions- und Mischzeit wird die Aufnahme von 2D-Spektren ermöglicht.

Die Spins präzedieren dabei in der Präparation in einer festen  $t_1$ -Zeit. Die Markierung der Magnetisierung mit der chemischen Verschiebung des ersten Kerns erfolgt zur gleichen Zeit. Anschließend erfolgt eine Mischzeit. Diese besteht aus unterschiedlichen Wartezeiten und Pulsen, welche von der Art der Spektren abhängig sind. Die skalare Kopplung oder die dipolare Wechselwirkung wird für den

Transfer von Magnetisierung genutzt. Bei der skalaren Kopplung erfolgt die Übertragung der Magnetisierung zwischen kovalent gebundenen Atomkernen, die maximal über drei Bindungen miteinander verbunden sind. Die dipolare Wechselwirkung beruht auf dem Nuclear-Overhauser-Effekt (NOE). Die Stärke des Nuclear-Overhauser-Effekts ist proportional zu  $1/r^6$  ( $r$  = Abstand der beteiligten Kerne). Daher wird nur bei Kernen, welche weniger als 5 Å voneinander entfernt sind, ein Magnetisierungstransfer beobachtet.

Die Magnetisierung mit der chemischen Verschiebung des zweiten Kerns wird am Ende des 2D-Experiments abgefragt. Ein 1D-Spektrum erhält man nach einer Fourier-Transformation in der  $t_2$ -Richtung. Durch das Hinzufügen verschiedener Einzelexperimente mit unterschiedlicher zeitlicher Differenz  $t_1$  und anschließender Fourier-Transformation in  $t_1$ -Richtung erhält man ein 2D-Spektrum. Die Intensitäten sind in einem 2D-Spektrum als Höhenlinien dargestellt. Auf der Diagonale des homonuklearen 2D-Spektrums liegen die Informationen eines 1D-Spektrums. Die Kreuzsignale der miteinander koppelden Kerne liegen symmetrisch zur Diagonalen. Zu den wichtigsten 2D-NMR-Spektren zählen das TOCSY- (*Total Correlation Spectroscopy*) und das NOESY- (*Nuclear-Overhauser-Effect-Spectroscopy*) Experiment.

Über skalare Kopplung wird die Magnetisierung in einem TOCSY-Experiment auf das gesamte Spinsystem einer Aminosäure verteilt. Daraus resultiert eine Wiedergabe des charakteristischen Signalmusters einer Aminosäure. Auf diese Weise wird die Identifizierung von Aminosäuren möglich.

Um strukturelle Informationen zu erlangen, ist das NOESY-Experiment von entscheidender Bedeutung. Es basiert auf der dipolaren Wechselwirkung der Kernspins. Im NOESY-Experiment sieht man zwischen allen Protonen, die weniger als fünf Ångström voneinander entfernt sind, ein Signal. Dabei werden sowohl Kontakte zwischen Kernen des Spinsystems einer Aminosäure als auch Kontakte zwischen Kernen benachbarter Aminosäuren erkennbar. Im Weiteren sind Signale von räumlich nahe beieinander liegenden Kernen sichtbar.

Treten trotz der Entzerrung der Signale eines 1D-Spektrums im 2D-Spektrum weiterhin Überlagerungen auf, wird es erforderlich, ein 3D-Experiment zu erzeugen. Dies erfolgt durch das Einfügen einer weiteren indirekten Evolutionszeit und einer Mischzeit.

Das 3D-Spektrum entsteht durch die Verknüpfung zweier 2D-Experimente oder durch das Einsetzen von weiteren magnetisch aktiven Kernen (Heterokerne). Das Stickstoffisotop  $^{15}\text{N}$  und das Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  stellen dabei die wichtigsten Heterokerne in der Proteinbiochemie dar. So erfolgt eine Vereinfachung der Aufklärung der Proteinstruktur. Durch die Markierung der Proteine mit Isotopen können viele unterschiedliche Spektren aufgenommen werden. Mit den so erhaltenen Informationen erfolgt die sequenzspezifische Zuordnung.

Für die Strukturberechnung werden die Abstände zwischen zwei räumlich nahe beieinander liegenden beziehungsweise benachbarten Kernen verwendet. Die daraus entstehenden Strukturvorschläge werden nach ihrer Zielfunktion sortiert. Anschließend kann das entstandene Ensemble aus den Strukturen mit den niedrigsten Zielfunktionen zur Ableitung der mittleren Struktur des Proteins verwendet werden.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Tertiärstruktur der antimikrobiellen Peptide Alvinellacin und Theromacin. Dies sollte mit Hilfe der mehrdimensionalen homo- sowie heteronuklearen NMR-Spektroskopie erfolgen.

Dazu musste zuerst ein Renaturierungsprotokoll für das synthetische Alvinellacin etabliert werden. Das nicht Isotopen-markierte Peptid wurde zur Aufnahme zweidimensionaler homonuklearer NMR-Spektren verwendet, mit welchen die Tertiärstruktur aufgeklärt werden sollte.

Für das rekombinant hergestellte Theromacin wurde ein Protokoll zur Reinigung etabliert. Mit diesem Protokoll sollte anschließend einfach- $^{15}\text{N}$ - sowie doppelt- $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -markiertes Peptid hergestellt werden. Die unterschiedlich markierten Varianten wurden für die NMR-Spektroskopie verwendet.

Die Tertiärstrukturen der beiden antimikrobiellen Peptide Theromacin und Alvinellacin sollten nach ihrer Aufklärung mit den Tertiärstrukturen anderer AMPs verglichen werden, um die beiden AMPs strukturell einordnen zu können.



## 2 Material und Methoden

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

### 2.1 Proteinreinigung

#### 2.1.1 Renaturierung des synthetischen Alvinellacins

Alvinellacin wurde als synthetisches, lyophilisiertes Peptid bei der Firma Biosyntan, Berlin, gekauft. Das in 1 ml 10 mM Salzsäure aufgenommene Peptid konnte mittels Dialyse in einem Phosphatpuffer mit Redoxsystem (PBS, pH 7,4, 2 mM reduziertes Glutathion, 0,2 mM oxidierte Glutathion) renaturiert werden. Die Dialyse erfolgte in einer *Slide-A-Lyzer* Dialysekammer (Pierce, IL, USA) mit einem molekularen Ausschluss (*molecular-weight cut off*: MWCO) von 2000 Da. Das Puffervolumen betrug dabei das 200-fache des Probenvolumens. Nach einer sechsständigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein Pufferwechsel, um die Dialyse über Nacht weiterführen zu können.

### 2.1.2 Expression von rekombinantem Theromacin in Minimalmedium

Das Gen für das Theromacin-Fusionsprotein (Abbildung 2-1) wurde von Dr. Sascha Jung in den pET-32 Vektor kloniert und anschließend in den BL21-Expressionsstamm transformiert. Dr. Sascha Jung erstellte ebenfalls das Expressions- und Renaturierungsprotokoll.



**Abb. 2-1: Schematische Darstellung des Theromacin-Fusionsproteins.** Das Fusionsprotein enthält einen Thioredoxin-tag (Trx-tag), einen Histidin-tag (6 x His-tag), einen Rest (R) der *multiple cloning site* des Vektors und das Theromacin. Diese liegt mit seinem N-Terminus direkt an einer Schnittstelle (ECS) für die Endoprotease EnterokinaseMax<sup>TM</sup> an R fusioniert vor.

Die Expression des Fusionsproteins wurde in 2 x M9-Minimalmedium durchgeführt, um das rekombinante Theromacin mit <sup>15</sup>N- beziehungsweise <sup>13</sup>C-Isotopen zu markieren (Tabelle 2-1). Nachdem die transformierten Zellen in 4 ml 2 x M9-Minimalmedium inokuliert wurden, konnten sie für 24 Stunden bei 37 °C und 180 rpm (Umdrehung pro Minute) inkubiert werden. Nach Überführen der Kultur in 400 ml frisches Medium, erfolgte eine weitere Inkubation für 24 Stunden. Von dieser Übernachtskultur wurden 70 ml in 1 L <sup>15</sup>N- beziehungsweise <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C-haltiges Minimalmedium inokuliert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer optischen Dichte von 0,6 durch Zugabe von 1 ml 1 mM IPTG-Lösung. Nach der Induktion wurden die Bakterien für weitere fünf Stunden inkubiert. Die Sedimentation der Bakterien erfolgte bei 10826 g für 15 Minuten (Sorvall-Zentrifuge RC-5B, Rotor GS-3, USA). Anschließend wurden die Bakteriensedimente eingefroren.

**Tab. 2-1: Zusammensetzung des 2 x M9-Minimalmediums mit Vitaminen.**

Chemikalie	Menge für 1 Liter
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ( $\geq 99,5$ %, p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)	15 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $\geq 99,5$ %, Fluka)	6 g
$\text{NaCl}$ ( $\geq 99,5$ %, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG)	4 g
ad 1 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	
Autoklavieren, anschließend Zugabe von:	
$\text{MgSO}_4$ (wasserfrei, $\geq 98$ % (KT), Fluka)	0,2407 g
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $\geq 98$ atom %, Campro Scientific)	0,82 g
D- $^{13}\text{C}$ -Glucose (wenn doppelt markiert) ( $\geq 99$ atom %, Campro Scientific)	1,86 g
D- $^{12}\text{C}$ -Glucose (wenn einfach markiert) ( $\geq 99,5$ %, Ph.Eur., Carl Roth GmbH & Co. KG)	1,98 g
Biotin (0,1 mg/ml) ( $\geq 98,5$ % für die Biochemie, Ph.Eur., Carl Roth GmbH & Co. KG)	15 ml
Thiamin (1 mg/ml)	1,5 ml
Carbenicillin Dinatriumsalz ( $\geq 90$ % für die Biochemie, Carl Roth GmbH & Co. KG)	100 $\mu\text{g/ml}$

### 2.1.3 Zellaufschluss und Waschen von Einschlusskörpern

Das Fusionsprotein wurde von den Bakterien in nicht-löslicher, denaturierter Form synthetisiert. Dies führte zur Bildung von Einschlusskörpern, welche isoliert werden mussten. Zur Isolierung der Einschlusskörper wurde das Bakterienpellet in 35 ml 1xPBS resuspendiert und anschließend 3x1 min bei 40 % mit einer TT13-Sonotrode (Sonopuls GM 2200, UV 2200, TT13, Bandelin electronic, Berlin) auf Eis sonifiziert. Die Sedimentation erfolgte für 30 min bei 47850 g (Sorvall-Zentrifuge RC-5B, Rotos SS-34, USA). Das Sediment wurde in PBS/0,2 % Tween-20 resuspendiert, für eine Minute bei 40 % mit der TT13-Sonotrode auf Eis sonifiziert und anschließend für 30 min bei 47850 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal mit PBS/0,2 % Tween-20 und anschließend dreimal mit PBS durchgeführt. Die Resuspension der gewaschenen Einschlusskörper erfolgte in 6 M Guanidin-Hydrochlorid, 50 mM Tris,

pH 8,0. Anschließend wurde die Suspension über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rolltisch (*roller mixer* SRT1 stuart<sup>®</sup>, Bibby Sterilin Ltd, UK) inkubiert.

#### 2.1.4 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC)

Um die löslichen von den nicht-löslichen Bestandteilen zu trennen, wurde die über Nacht inkubierte Theromacin-Proteinlösung für 30 min bei 47850 g (Sorvall-Zentrifuge RC-5B, Rotor SS-34, USA) zentrifugiert.

Da das Fusionsprotein einen Hexa-Histidin-*tag* enthielt, konnte es mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie von anderen löslichen Bestandteilen getrennt werden. Dazu wurde der Überstand auf eine mit Waschpuffer (Tabelle 2-2) equilibrierte Ni<sup>2+</sup>-Agarose-Matrix gegeben. Anschließend erfolgte ein einstündiger Inkubationsschritt bei Raumtemperatur auf einem Rolltisch (*roller mixer* SRT1 stuart<sup>®</sup>, Bibby Sterilin Ltd, UK). Die Ni<sup>2+</sup>-Agarose mit dem gebundenen Protein wurde für zwei Minuten bei 870 g sedimentiert. Der Überstand, welcher ungebundene Proteine enthielt, wurde verworfen. Im Folgenden wurde die Agarose fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Dabei wurden unspezifisch gebundene Peptide entfernt. Um das Protein von der Agarose zu eluieren, wurde diese mit Elutionspuffer (Tabelle 2-2) inkubiert.

**Tab. 2-2: Zusammensetzung des Wasch- und Elutionspuffers.**

Chemikalie	Waschpuffer	Elutionspuffer
GuHCl (Guanidinium-Hydrochlorid) (≥ 99,7 %, p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)	6 M	6 M
Tris (Ultra Qualität, PUFFERAN <sup>®</sup> , ≥ 99,9 %, Carl Roth GmbH & Co. KG);	50 mM	50 mM
Imidazol (≥ 99 %, p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)	-	250 mM
mit Salzsäure (rauchend, Rotipuran <sup>®</sup> , 37 %, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG) auf pH 8,0 einstellen		

Die Inkubation erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 870 g wurde der Überstand abgenommen. Die Elution wurde solange wiederholt, bis im Überstand kein Protein mehr detektierbar war.

Die Kontrolle der Waschschr tte und Elutionsschr tte erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese als auch mit einer photometrischen Proteinbestimmung.

### 2.1.5 Proteinkonzentrations-Bestimmung

Die Absorption der Proteinl sung wurde bei 280 nm im NanoDrop Spectrophotometer (ND-1000, PEQLAB Biotechnologie GmbH) gemessen. Als Referenzwert diente der jeweils verwendete Puffer. Die Bestimmung der Proteinkonzentration aus der Absorption erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes. Der spezifische Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  wurde mit der Software Proteincalculator (*Proteincalculator v3.3.*) errechnet. F r das Fusionsprotein betrug der spezifische Extinktionskoeffizient  $1,3525 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  und f r das rekombinante Theromacin  $2,3931 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . F r das Fusionsprotein errechnete die Software Proteincalculator eine molekulare Proteinmasse von 25341,8 Da und f r das rekombinante Theromacin eine molekulare Masse von 8444,6 Da. F r Alvinellacin betrug der spezifische Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$   $2,7676 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  und die molekulare Masse 2605,1 Da.

### 2.1.6 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) wurde mit dem Mini-Protean<sup>®</sup> 3 Elektrophorese-System der Firma BioRad (CA, USA) durchgef hrt. Nach dem Vermischen der aufzutrennenden Peptidproben mit zweifach konzentriertem Laemmli-Puffer (Tab 2-3) erfolgte eine f nfmin tliche Denaturierung der Proteine bei 95 °C.

**Tab. 2-3: Zusammensetzung des zweifachen Laemmli-Probenpuffers.**

Chemikalie	Menge für 10 ml
Glycerin ( $\geq 99,9\%$ , Molecular Biology Grade, Calbiochem®)	2 ml
10 % (w/v) SDS (ultra pure $\geq 99\%$ , f. d. Elektrophorese, Carl Roth GmbH & Co.KG)	4 ml
2-Mercaptoethanol ( $\geq 99\%$ (GC), Fluka)	1 ml
Bromphenolblau (wasserlöslich, Indikator, Reag.Ph.Eur., Riedel-de Haën)	0,002 mg
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Ultra Qualität, Pufferan®, $\geq 99,9\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG); Salzsäure rauchend (Rotipuran®, 37 %, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG)	2,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	0,5 ml

Die Proben wurden in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert und bei 200 V in einfach konzentriertem Laemmli-Laufpuffer (Tabelle 2-4) elektrophoretisch getrennt.

**Tab. 2-4: Zusammensetzung des zehnfach konzentrierten Laemmli-Laufpuffers.**

Chemikalie	Menge für 1 Liter
Tris (Ultra Qualität, Pufferan®, $\geq 99,9\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG)	30,3 g
Glycin ( $\geq 99,9\%$ , p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)	144 g
10 % SDS (Ultra pure $\geq 99\%$ , f. d. Elektrophorese, Carl Roth GmbH & Co. KG)	10 g

Die bakterienhaltigen Proben aus den Expressionskulturen wurden für zehn Minuten bei 20817 g zentrifugiert (5417R, Eppendorf AG, Hamburg) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Sediment in 8 M Harnstoff-Lösung (Riedel-de Haën) resuspendiert und mit 2-fach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer versetzt. Es erfolgte eine fünfminütige Denaturierung der Proteine bei 95 °C. Die Proben wurden ein weiteres Mal für zwei Minuten zentrifugiert, für eine Minute bei 95 °C erhitzt und der Überstand auf das Gel aufgetragen (Tabelle 2-5).

**Tab. 2-5: Zusammensetzung von SDS-PAGE-Proteingelen.**

	Sammelgel 7,5 %	Trenngel 15 %	Trenngel 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) SDS (ultra pure ≥ 99 %, f. d. Elektrophorese, Carl Roth GmbH & Co. KG)	50 µl	120 µl	120 µl
10 % (w/v) APS (≥ 98 % (RT), Fluka)	50 µl	120 µl	120 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (research grade, SERVA Electrophoresis GmbH)	5 µl	6 µl	6 µl
ddH <sub>2</sub> O	2,45 ml	2,75 ml	1,55 ml

Tris: Ultra Qualität, Pufferan®, ≥ 99,9 %, Carl Roth GmbH & Co.KG; Salzsäure rauchend: Rotipuran®, 37 %, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG

Die Verifizierung der Proteinmolekulargewichte erfolgte mittels Protein-Standards (#SM0431, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; *Mark12™ Unstained Standard*, Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

### 2.1.6.1 Coomassie-Färbemethode

Die SDS-PAGE-Gele wurden nach der Gelelektrophorese für eine Stunde in Coomassie-Färbelösung gefärbt (Tabelle 2-6). Anschließend erfolgte eine Überführung in die Entfärbelösung (Tabelle 2-6), in der die Gele bei Raumtemperatur geschwenkt wurden, bis die gewünschte Entfärbung eintrat.

**Tab. 2-6: Zusammensetzung der Coomassie-Lösungen.**

	Färbelösung	Entfärbelösung
Methanol (Rotipuran <sup>®</sup> , ≥ 99,9 %, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG)	250 ml	100 ml
Essigsäure (Rotipuran <sup>®</sup> , ≥ 99,9 %, p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG)	100 ml	100 ml
Brilliant Blau G 250 (Carl Roth GmbH & Co. KG)	0,1 %	-
ad 1 L H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		

Die Detektionsgrenze dieser Färbemethode liegt bei 200 bis 400 ng pro 0,5 cm Bandengröße (De Moreno *et al.*, 1985).

### 2.1.7 Renaturierung des Theromacin-Fusionsproteins

Der erste Schritt der Renaturierung des Fusionsproteins war die Einstellung der Proteinkonzentration auf 0,3 mg/ml. Unter zur Hilfenahme einer peristaltischen Pumpe (LKB-Pump P-1, Pharmacia, Schweden) wurde die Lösung unter starkem Rühren in die Renaturierungslösung I (Tabelle 2-8) getropft.



**Tab. 2-7: Zusammensetzung der Renaturierungslösung I.**

Chemikalie	Konzentration
L-Glutathion reduziert ( $\geq 98$ % für die Biochemie, Carl Roth GmbH & Co. KG)	4 mM
Glutathion oxidiert ( $\geq 98$ %, für die Biochemie, Carl Roth GmbH & Co. KG)	0,4 mM
Reinstwasser	
auf pH ~ 9 mit 5 M NaOH einstellen ( $\geq 99$ %, p.a., ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG)	

Hierbei maß das Volumen der Renaturierungslösung I das Fünffache der verdünnten Proteinlösung. Die Konzentration des denaturierenden Guanidin-Hydrochlorids betrug nach dem Mischen der beiden Lösungen 1 Mol pro Liter. Der pH-Wert dieser Lösung wurde auf pH 8,5 eingestellt. Anschließend erfolgten eine Überschichtung der Lösung mit Stickstoff und eine Inkubation von 72 Stunden unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur. Im Folgenden wurde die Probe bei 5000 g für 15 Minuten zentrifugiert.

Mittels Vivaspın20-Konzentratoren (Vivascience AG, Hannover) wurde das Ausgangsvolumen der Lösung auf ein Zehntel reduziert und anschließend gegen einen 200fachen Volumenüberschuss der Renaturierungslösung II (Tabelle 2-9) dialysiert (ZelluTrans, MWCO: 4000-6000 Da, Carl Roth GmbH & Co. KG). Die Dialyse erfolgte unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur.

**Tab. 2-8: Zusammensetzung der Renaturierungslösung II.**

Chemikalie	Konzentration
TRIS (Ultra Qualität, Pufferan <sup>®</sup> , $\geq 99,9$ %, Carl Roth GmbH & Co. KG)	50 mM
auf pH 8 mit rauchender Salzsäure (Rotipuran <sup>®</sup> , 37 %, p.a., ACS. ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG) einstellen	

Nach sieben Stunden erfolgte ein Pufferaustausch und die Dialyse wurde in frischem Renaturierungspuffer II über Nacht fortgesetzt.

### 2.1.8 Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins

Die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins mittels EnterokinaseMax<sup>TM</sup> (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) erfolgte im Renaturierungspuffer II (Tabelle 2-9). Für die Spaltung von 300 µg Fusionsprotein wurden 0,2 U der EnterokinaseMax<sup>TM</sup> verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

### 2.1.9 Untersuchung auf freie Sulfhydrylgruppen (*Ellman-assay*)

Das rekombinante Theromacin besitzt zehn und Alvinellacin vier Cysteine. Um zu überprüfen, ob alle Cysteine bei der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt sind, wurde der Ellmanstest durchgeführt (Ellman, 1959). Dabei reagiert das Ellmansreagenz, 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzosäure (DNTB), mit den freien, reduzierten Sulfhydrylgruppen eines Proteins. Sind freie Sulfhydrylgruppen vorhanden, wird ein gelber Farbstoff gebildet. Die Veränderung der Lösung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm analysiert werden.

Die eingesetzten Proben von Theromacin und Alvinellacin hatten eine Konzentration von 0,7 mM. Zur Orientierung diente eine  $\beta$ -Mercaptoethanol-Standardreihe mit einer Konzentration von 0,01 bis 1 mM. Im Folgenden wurden 50 µl der DNTB-Lösung (50 mM Natriumacetat, 2 mM DNTB in Wasser) und 100 µl Ellmanspuffer (1 M Tris, pH 8) mit 840 µl destilliertem Wasser in einer Halbmikroküvette vermischt. Nach Zugabe von 10 µl Proteinprobe wurde die Absorption bei 412 nm gemessen.

### 2.1.10 Gradienten-RP-HPLC und Lyophilisation

Alvinellacin und Theromacin wurden mit Hilfe der Gradienten-RP-HPLC (880-PU, Jasco GmbH Deutschland, Groß-Umstadt) gereinigt. Die Equilibrierung der präparativen C18-Säule (VP250/10, Macherey-Nagel, Düren) erfolgte mit 25 % (v/v) des Laufmittels II beziehungsweise 75 % (v/v) des Laufmittels I (Tabelle 2-10).

**Tab. 2-9: Zusammensetzung der Laufmittel I und II.**

Chemikalie	Laufmittel I	Laufmittel II
Acetonitril/0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) (Rotisol <sup>®</sup> , LC-MS Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG)	20 ml	950 ml
<i>ad 1 Liter 0,1 % TFA (v/v) (Rotisol<sup>®</sup>, LC-MS Grade, Carl Roth GmbH &amp; Co. KG)</i>		

Im Anschluss an die Säulen-Equilibration erfolgte die Auftragung und Trennung des Probengemisches. Bei der Auftrennung wurde der Laufmittel II-Anteil kontinuierlich für Alvinellacin um 2 % (v/v) pro Minute und für Theromacin um 0,43 % (v/v) pro Minute erhöht. Dabei erfolgte eine Erhöhung der Konzentration an Acetonitril in der mobilen Phase. Das RP-HPLC-Protokoll für die Reinigung von Alvinellacin ist in Tabelle 2-11 und das für die Reinigung von Theromacin in Tabelle 2-12 dargestellt.

**Tab. 2-10: RP-HPLC-Protokoll für die Reinigung von Alvinellacin.**

Zeit	Laufmittel I	Laufmittel II
0 min	100 %	0 %
2 min	88 %	12 %
31 min	25 %	75 %
34 min	0 %	100 %
44 min	100 %	0 %

**Tab. 2-11: RP-HPLC-Protokoll für die Reinigung von Theromacin.**

Zeit	Laufmittel I	Laufmittel II
0 min	100 %	0 %
2 min	75 %	25 %
23 min	66 %	34 %
26 min	0 %	100 %
31 min	100 %	0 %

Die eluierten Peptide wurden im UV-Bereich bei 280 nm (875-UV, Jasco GmbH Deutschland, Groß-Umstadt) detektiert. Die Peptide wurden anschließend lyophilisiert (Alpha 2-4 LSC, Christ, Osterode). Die Molekülmassen wurden von Dr.

Christoph Gelhaus (Zoologisches Institut, Prof. Dr. M. Leippe, CAU zu Kiel) mittels MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight*)-Massenspektrometrie (Proteomics Analyzer 4700 (MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer), Applied Biosystems, Framingham, USA) analysiert. Als Matrix diente  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure, welche in 60 % (v/v) Acetonitril/ 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure gelöst war.

## 2.2 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

### 2.2.1 Probenvorbereitung

Das lyophilisierte Alvinellacin wurde für die NMR-spektroskopischen Experimente in 1 % deuterierte Essigsäure mit 10 % (v/v) D<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Konzentration der Peptidprobe entsprach 2 mM.

Für Theromacin wurden zwei unterschiedliche Proben hergestellt: <sup>15</sup>N- markiertes und <sup>15</sup>N-<sup>13</sup>C-markiertes Theromacin. Beide Proben wurden in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) mit 7 % (v/v) D<sub>2</sub>O/93 % (v/v) H<sub>2</sub>O (99,96 atom % D, Isotec Inc., USA) gelöst und anschließend in ein Shigemi-Röhrchen (Shigemi Co., LTD, Tokio, Japan) überführt.

### 2.2.2 Durchführung der NMR-Experimente

Zur Aufklärung der Tertiärstruktur von Alvinellacin wurden ein 2D-<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC- (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) Experiment sowie homonukleare 2D-TOCSY- (*Total Correlation Spectroscopy*) und homonukleare 2D-NOESY- (*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*) Experimente bei unterschiedlichen Mischzeiten durchgeführt. Die Experimente wurden an einem Bruker Avance III 800 MHz Spektrometer von Dr. Oliver Hecht (School of Chemical Science & Pharmacy Stores, University of East Anglia, Norwich, Großbritannien) durchgeführt. Die

unterschiedlichen NMR-Experimente mit ihren Mischzeiten und komplexen Datenpunkten sind in Tabelle 2-13 dargestellt.

**Tab. 2-12: Durchgeführte NMR-Experimente für Alvinellacin.**

Experiment	Mischzeiten (ms)	Spektrale Breite (Hz)			Komplexe Punkte der Datenmatrix (Kern)		
		F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>
2D- <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC <sup>1</sup>	-	12820	2581	-	2048 ( <sup>1</sup> H)	128 ( <sup>1</sup> H)	-
2D-TOCSY <sup>2</sup>	60, 100, 120	12820	12820	-	2048	256	-
2D-NOESY <sup>3</sup>	80, 100, 120, 150, 180, 200	12820	12820	-	2048	256	-

<sup>1</sup> Bodenhausen und Ruben, 1980; Piotto *et al.*, 1992; Sklenár *et al.*, 1993; <sup>2</sup> Braunschweiler und Ernst, 1983; <sup>3</sup> Noggel und Schirmer, 1971; Neuhaus und Williamson, 1989

Die NMR-Experimente für die Aufklärung der Tertiärstruktur von Theromacin wurden von Dr. Frank Sönnichsen (Institut für Organische Chemie, CAU zu Kiel) auf einem Bruker Avance 600 MHz, ausgestattet mit einer aktiv abgeschirmten *Z-gradient triple resonance cryoprobe*, durchgeführt. Die unterschiedlichen NMR-Experimente mit ihren Mischzeiten und komplexen Datenpunkten sind in Tabelle 2-14 dargestellt.

Tab. 2-13: Durchgeführte NMR-Experimente für Theromacin.

Experiment	Mischzeit (ms)	Komplexe Punkte der Datenmatrix (Kern)			Spektrale Breite (Hz)		
		t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>
2D- <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC <sup>1</sup>	-	980 ( <sup>1</sup> H)	513 ( <sup>1</sup> H)	-	2704	2350	-
2D-TOCSY <sup>2</sup>	60	2048 ( <sup>1</sup> H)	1024 ( <sup>1</sup> H)	-	7211	6000	-
2D-NOESY <sup>3</sup>	200	2048 ( <sup>1</sup> H)	1024 ( <sup>1</sup> H)	-	7211	7211	-
3D- <sup>15</sup> N-TOCSY <sup>4</sup>	-	513 ( <sup>1</sup> H)	257 ( <sup>1</sup> H)	33 ( <sup>15</sup> N)	2866	7211	2050
3D- <sup>15</sup> N-NOESY <sup>5</sup>	-	513 ( <sup>1</sup> H)	129 ( <sup>1</sup> H)	33 ( <sup>15</sup> N)	2866	2400	7199
HNCA <sup>6</sup>	-	513 ( <sup>1</sup> H)	33 ( <sup>15</sup> N)	65 ( <sup>13</sup> C)	2866	2000	3621
HN(CO)CA <sup>7</sup>	-	513 ( <sup>1</sup> H)	33 ( <sup>15</sup> N)	65 ( <sup>13</sup> C)	2866	2000	3621
HNCO <sup>8</sup>	-	513 ( <sup>1</sup> H)	33 ( <sup>15</sup> N)	65 ( <sup>13</sup> C)	2866	2000	1509
HN(CA)CO <sup>9</sup>	-	513 ( <sup>1</sup> H)	33 ( <sup>15</sup> N)	65 ( <sup>13</sup> C)	2866	2000	1509
(H)C(CO)NH <sup>10</sup>	-	513 ( <sup>1</sup> H)	33 ( <sup>15</sup> N)	65 ( <sup>13</sup> C)	2866	2000	9813
CBCANH <sup>11</sup>	-	513 ( <sup>1</sup> H)	33 ( <sup>15</sup> N)	65 ( <sup>13</sup> C)	2866	2000	11325
CBCA(CO)NH <sup>12</sup>	-	513 ( <sup>1</sup> H)	33 ( <sup>15</sup> N)	65 ( <sup>13</sup> C)	2866	2000	11325
<sup>13</sup> C-TOCSY <sup>13</sup>	-	1025 ( <sup>1</sup> H)	65 ( <sup>1</sup> H)	33 ( <sup>13</sup> C)	7211	3900	3018
<sup>13</sup> C-NOESY <sup>14</sup>	-	513 ( <sup>1</sup> H)	129 ( <sup>1</sup> H)	33 ( <sup>13</sup> C)	7211	7199	3018
2D- <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC bei 290 K	-	768 ( <sup>1</sup> H)	1024 ( <sup>1</sup> H)	-	2704	2000	-
2D- <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC bei 300 K	-	768 ( <sup>1</sup> H)	1024 ( <sup>1</sup> H)	-	2704	2000	-
2D- <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC bei 310 K	-	768 ( <sup>1</sup> H)	1024 ( <sup>1</sup> H)	-	2704	2000	-
2D- <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC bei 320 K	-	768 ( <sup>1</sup> H)	1024 ( <sup>1</sup> H)	-	2704	2000	-

<sup>1</sup> Bodenhausen und Ruben, 1980; Piotto *et al.*, 1992; Sklenár *et al.*, 1993; <sup>2</sup> Braunschweiler und Ernst, 1983; <sup>3</sup> Noggel und Schirmer, 1971; Neuhaus und Williamson, 1989; <sup>4</sup> Palmer *et al.*, 1991; Kay *et al.*, 1992; Schleucher *et al.*, 1994; <sup>5</sup> Palmer *et al.*, 1991; Kay *et al.*, 1992; Schleucher *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994; <sup>6</sup> Grzesiek und Bax, 1992; Schleucher *et al.*, 1993; Kay *et al.*, 1994; <sup>7</sup> Bax und Ikura, 1991; Brutscher *et al.*, 1995; <sup>8</sup> Cordier und Grzesiek, 1999; <sup>9</sup> Clubb *et al.*, 1992; <sup>10</sup> Montelione *et al.*, 1992; Grzesiek *et al.*, 1993; Lyons und Montelione, 1993; Logan *et al.*, 1993; Clowers *et al.*, 1993; Carlomagno *et al.*, 1996; <sup>11</sup> Grzesiek und Bax, 1992; <sup>12</sup> Grzesiek und Bax, 1993; Muhandiram und Kay, 1994; <sup>13</sup> Kay *et al.*, 1993; <sup>14</sup> Palmer *et al.*, 1991; Kay *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1992.

Die Prozessierung der *FIDs* erfolgte mit dem Programm NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1993). Anschließend wurden die erhaltenen Spektren mit dem Programm NMRView (Johnson, 2004) ausgewertet.

### **2.2.3 Identifikation des Spinsystems von Aminosäuren und die sequenzspezifische Zuordnung**

Die Zuordnung intraresidualer Resonanzen der Spinsysteme jeder Aminosäure von Alvinellacin erfolgte mit Hilfe des 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC- und des homonuklearen 2D-TOCSY-Spektrums. Die sequenzspezifische Zuordnung wurde mit dem zweidimensionalen, homonuklearen NOESY-Spektrum durchgeführt.

Für die Zuordnung von intraresidualen Resonanzen der Spinsysteme jeder Aminosäure wurden für Theromacin die folgenden Spektren verwendet: 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum, homonukleares 2D-TOCSY-Spektrum,  $^{15}\text{N}$ - sowie  $^{13}\text{C}$ -editierte TOCSY-Spektren, HNCA-, CBCANH-, CBCA(CO)NH-, (H)C(CO)NH-, HN(CA)CO-, HN(CO)CA-, HNCO-Spektrum. Die sequenzspezifische Zuordnung erfolgte mit dem zweidimensionalen, homonuklearen NOESY-Spektrum, dem  $^{15}\text{N}$ - sowie dem  $^{13}\text{C}$ -NOESY-Spektrum.

### **2.2.4 Zuordnung struktureller Signale**

Interresiduale Resonanzen, welche bedingt durch die räumliche Struktur von Alvinellacin beziehungsweise Theromacin entstanden sind, wurden in den jeweiligen homonuklearen 2D-NOESY-Spektren zugeordnet. Für Theromacin konnten zusätzlich noch das  $^{15}\text{N}$ - sowie das  $^{13}\text{C}$ -editierte NOESY-Spektrum verwendet werden.

### **2.2.5 Strukturberechnung**

Aus den NOE-Signalen, welche in den NOESY-Spektren identifiziert werden konnten, wurden mit dem Programm NMRView (Johnson, 2004) die Atomabstände berechnet.

Für Alvinellacin erfolgte die Kalibrierung der Abstände so, dass die unterste beziehungsweise oberste Abstandsbegrenzung als 1,8 Å und 5,0 Å definiert wurde. Zur Definition der Disulfidbrücken wurden 12 Abstände in die Berechnungen 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).

Bei der Kalibrierung der Abstände für Theromacin wurde die mittlere Intensität aller NOE-Signale auf einen Abstand von 2,5 Å festgelegt. Dabei wurde eine Toleranz vom 0,125fachen des entsprechenden Abstandes zum Quadrat berücksichtigt. Als unterste beziehungsweise oberste Abstandsbegrenzungen konnten 1,8 Å und 5,0 Å definiert werden. Die Signalintensitäten für die Methylgruppen wurden halbiert. Zur Definition der Disulfidbrücken wurden 30 Abstände in die Berechnung integriert. Für die Wasserstoffbrücken wurden 14 Abstandsbegrenzungen bei den Strukturberechnungen berücksichtigt. Abstände von 1,8 – 2,4 Å stellten Begrenzungen zwischen dem Wasserstoff- und Sauerstoffatom und Abstände von 2,8 – 3,4 Å Begrenzungen zwischen dem Stickstoff- und Sauerstoffatom dar. Die Wasserstoffbrücken wurden erst in der letzten Phase der Strukturberechnung berücksichtigt. Im Weiteren wurden mit Hilfe des Programmes TALOS (Shen et al., 2009) die theoretischen Diederwinkelpaare der Aminosäuren berechnet und bei den Strukturberechnungen mittels CYANA (Güntert, 2004) berücksichtigt. Für die Errechnung der theoretischen Diederwinkelpaare wurden die Frequenzen der HN, C $\alpha$ , H $\alpha$ , C $\beta$ , H $\beta$  sowie CO-Atome verwendet.

Mit Hilfe der ermittelten Abstände wurden im Programm CYANA (Güntert, 2004) 400 Strukturberechnungen durchgeführt. Von diesen wurden die 20 Strukturen mit der niedrigsten *target function* ausgewählt und aus ihnen ein Ensemble aus 20 Strukturen generiert. Mit dem Programm WAHTIF (Vriend, 1990) wurde aus diesen eine mittlere Struktur berechnet und im Programm GROMOS (van Gunsteren et al., 1996) energieminiert. Die graphische Darstellung der Strukturen erfolgte mit den Programmen RIBBONS (Carson, 1991), MOLMOL (Koradi et al., 1996), GRASP2 (Nicholls et al. 1991) sowie UCSF CHIMERA (Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIH P41 RR001081)).



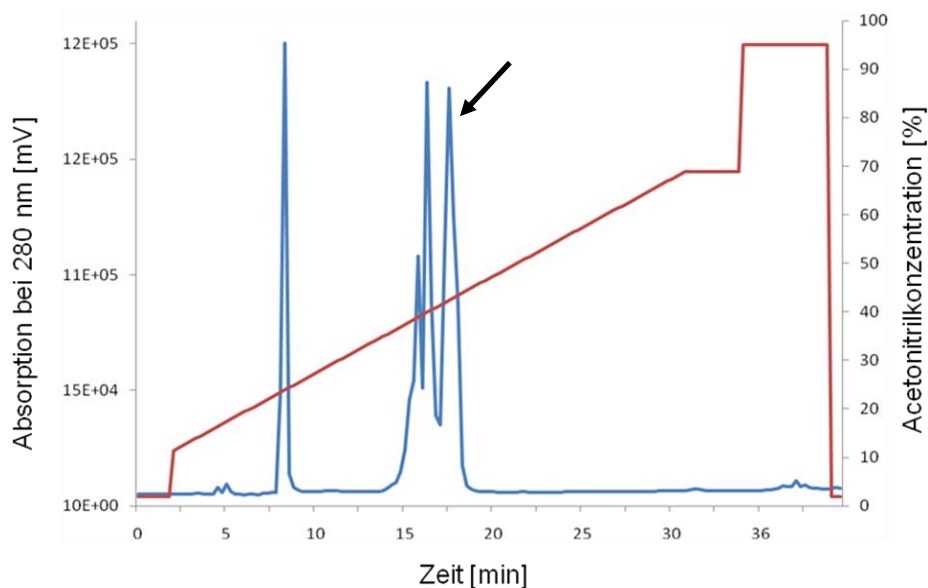
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Aufklärung der Tertiärstruktur von Alvinellacin

##### 3.1.1 Renaturierung und Proteinreinigung

Das lyophilisierte Peptid wurde in 10 mM HCl aufgenommen. Die Renaturierung erfolgte mittels Dialyse gegen einen Phosphatpuffer (pH 7,4).

Die Auftrennung der Peptidlösung wurde mittels RP-HPLC durchgeführt (Abbildung 3-1). Dabei wurden mehrere Fraktionen, welche bei 214 nm absorbieren, detektiert. Mit Hilfe der Massenspektroskopie (MALDI-TOF) wurde in der Fraktion bei 18 min die erwartete Größe von Alvinellacin (2,6 kDa) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).



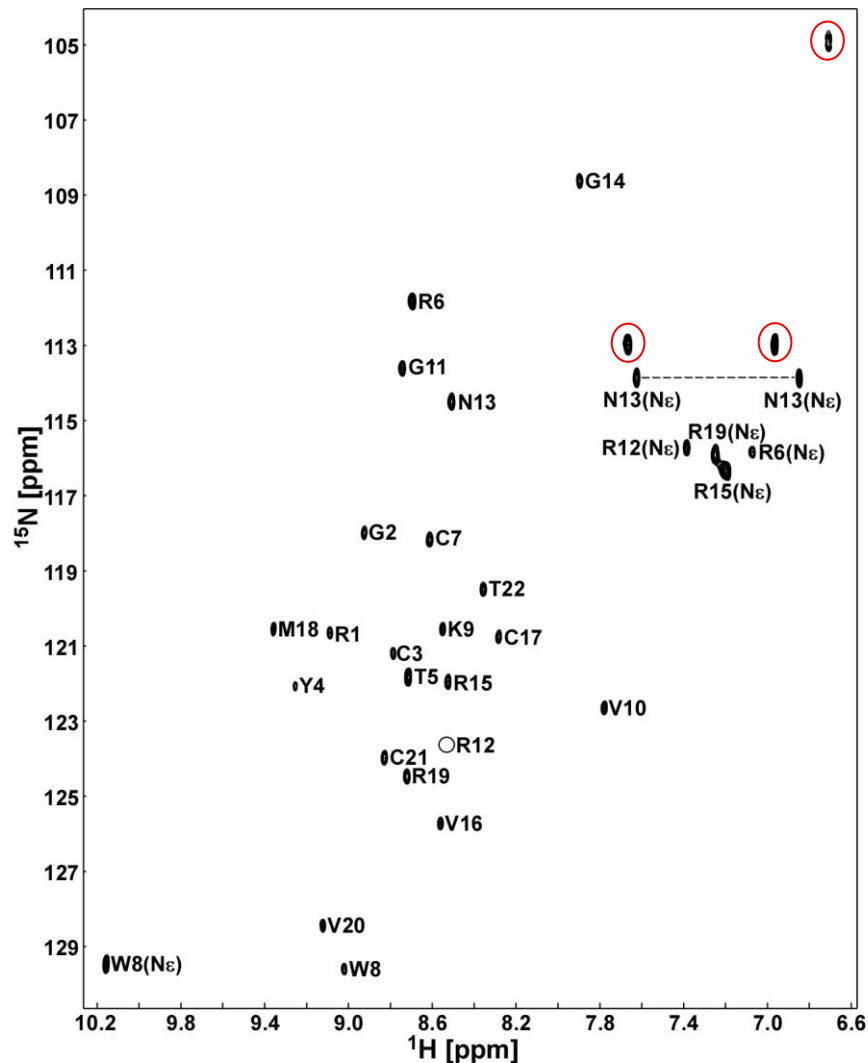
**Abb. 3-1: RP-HPLC-Diagramm der Reinigung des synthetischen Alvinellacins.** Blau: Chromatogramm der Proteinprobe nach der Renaturierung. Rot: Acetonitrilkonzentration (v/v) am Säuleneingang.

### 3.1.2 Die NMR-spektroskopische Aufklärung der Tertiärstruktur von Alvinellacin

Für die Aufklärung der Tertiärstruktur von Alvinellacin wurde zunächst ein 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum aufgenommen (Abbildung 3-2). In diesem Spektrum kann für jede Amidgruppe einer Aminosäure ein Signal erwartet werden. Dieses Signal entsteht aus den Frequenzen des Amidstickstoffs ( $^{15}\text{N}$ ) und des kovalent verknüpften Amidprotons ( $^1\text{HN}$ ). So werden für die Amidgruppen der Seitenketten von Asparagin und Glutamin und dem  $\text{N}_\epsilon$  des Tryptophan weitere Resonanzen erwartet. Da Prolin kein Amidproton besitzt, entsteht im 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC kein Signal. Im Weiteren besitzt der N-Terminus eine sehr hohe Protonenaustauschrate, wodurch er nur in wenigen Fällen detektiert werden kann.

In dem 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des Alvinellacins sind 30 Resonanzen zu erkennen, deren Zuordnung mit Hilfe der zweidimensionalen Spektren möglich war. Die Resonanzen für die Amidgruppen der Tryptophanseitenketten, der Seitenketten der Arginine und des Asparagins konnten eindeutig identifiziert werden (Abbildung 3-2). Drei Resonanzen konnten nicht zugeordnet werden. Zu denen zählt eine Resonanz, die auf eine chemische Verschiebung der Seitenketten des Asparagins hindeutet. Im Weiteren konnte die Stickstoffresonanz des Arginins R12 nur mit Hilfe der TOCSY- und NOESY-Spektren identifiziert werden.

Die Primärstruktur von Alvinellacin weist vier Cysteine auf. Um Disulfidisomere auszuschließen, wurde das 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum herangezogen. Dies konnte auf Grund der Resonanzen, die nicht zugeordnet werden konnten, nicht ausgeschlossen werden. Mit Hilfe des *Ellmans-assays* konnte nachgewiesen werden, dass alle Cysteine an der Bildung von Cysteinbrücken beteiligt waren (Daten nicht gezeigt).

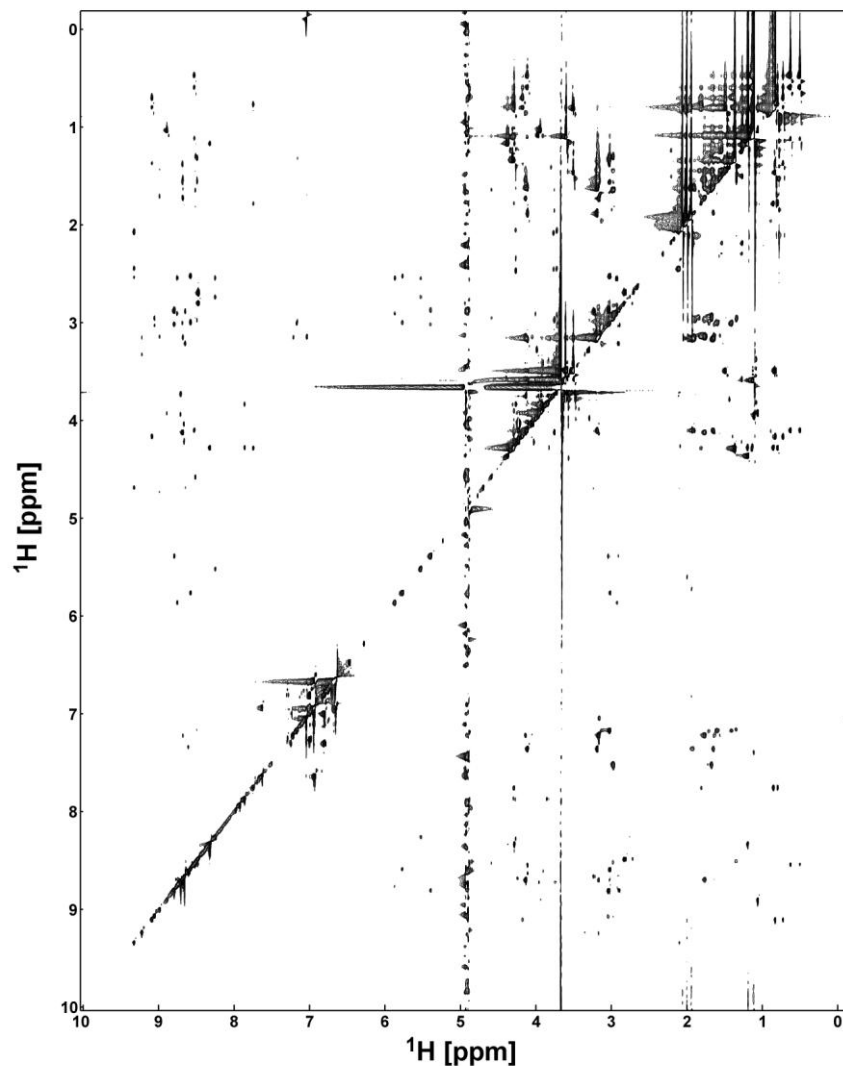


**Abb. 3-2: 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von Alvinellacin.** Dargestellt sind die Resonanzen jeder identifizierten Aminosäure. Die Beschriftung erfolgte mit der sequenziellen Position und dem Namen in Ein-Buchstaben-Code der jeweiligen Aminosäure. Die gestrichelte Linie gibt die Position der Aminprotonenresonanz der Asparaginseitenkette an. Der schwarze Kreis markiert die Position des Arginin R12, die roten Kreise markieren die nicht zugeordneten Resonanzen.

Im Anschluss an die Identifizierung der Aminprotonenfrequenzen im 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum, konnten im zweidimensionalen, homonuklearen TOCSY-Spektrum die Spinsysteme der Aminosäuren zugeordnet werden.

In Abbildung 3-3 ist ein homonukleares, zweidimensionales TOCSY-Spektrum bei einer Mischzeit von 120 ms dargestellt. In der vertikalen Achse des TOCSY-

Spektrums können die Resonanzen der Spinsysteme einer Aminosäure zugeordnet werden.

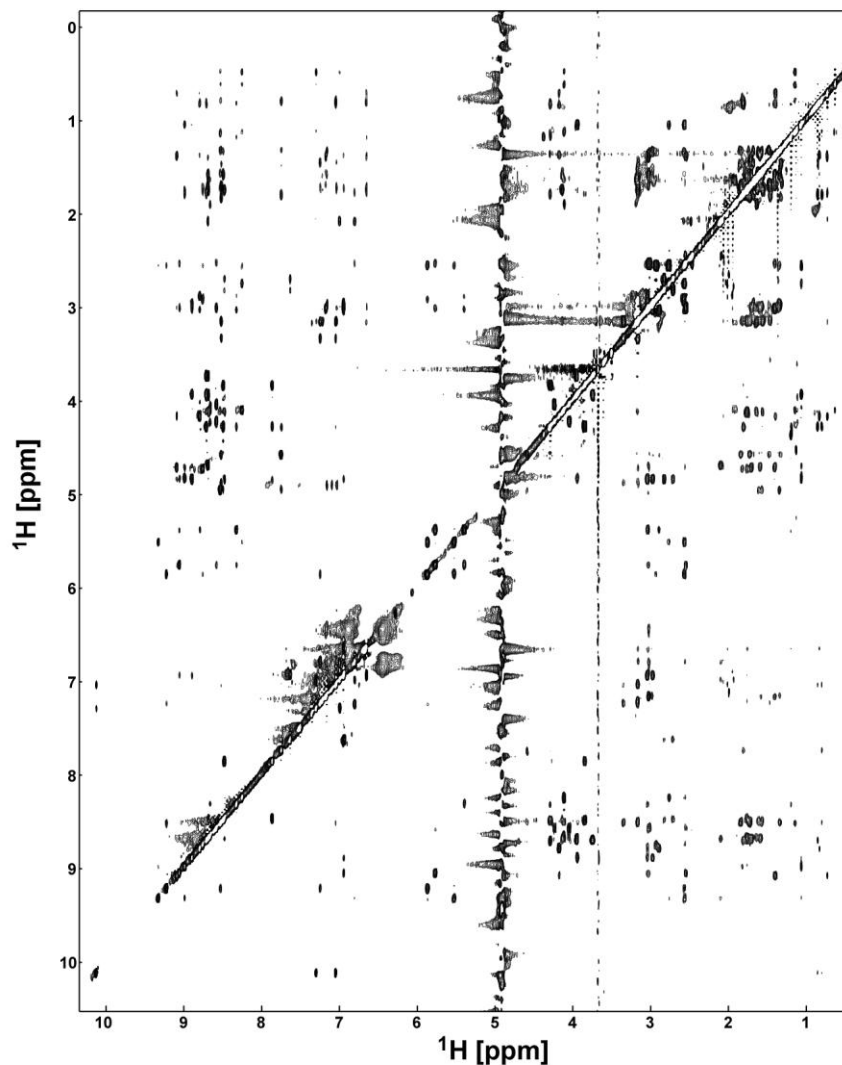


**Abb. 3-3: 2D- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY Spektrum von Alvinellacin.** Es sind alle Kreuzsignale zu sehen, die auf skalar koppelnden Protonen beruhen.

Als Grundlage für die Zuordnung sequenzspezifischer Resonanzen wurden NOESY-Experimente verwendet. Im NOESY-Spektrum werden sowohl intra- als auch interresiduale Kreuzsignale dargestellt. In Abbildung 3-4 ist ein zweidimensionales, homonukleares NOESY-Spektrum zu sehen. Dieses wurde mit einer Mischzeit von 200 ms aufgenommen. Wie man erkennen kann, sind in diesem Spektrum mehr Resonanzen zu erkennen als in dem TOCSY-Spektrum. Die zusätzlichen Signale entsprechen interresidualen Kreuzsignalen. Durch den Vergleich des TOCSY- mit

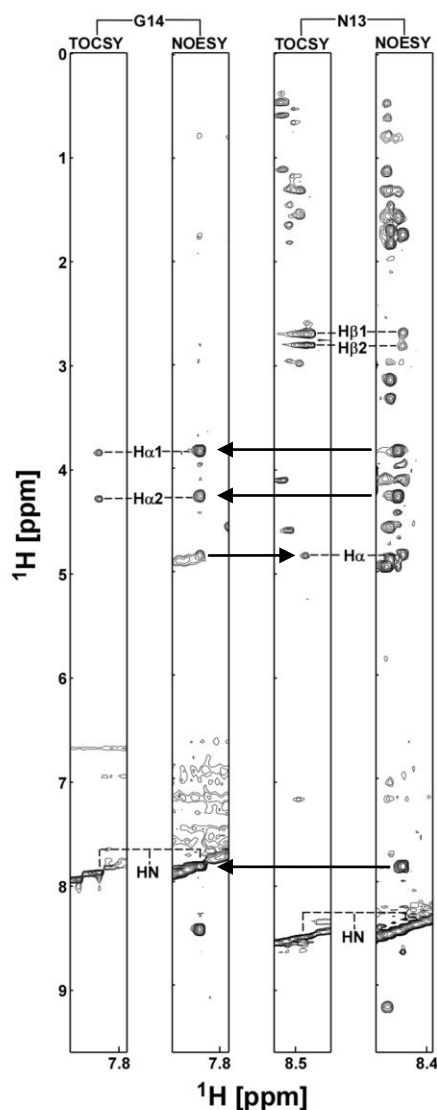
dem NOESY-Spektrum können die intraresidualen von den interresidualen Signalen unterschieden werden.

Resonanzen, die zu interresidualen Kopplungen gehören, entstehen durch Wechselwirkungen von Protonen, die durch die räumliche Struktur des Proteins nahe beieinander liegen. Die dabei entstehenden Kreuzsignale stammen von Aminosäuren, die in direkter Nachbarschaft oder auf Grund der Faltung in räumlicher Nähe liegen.



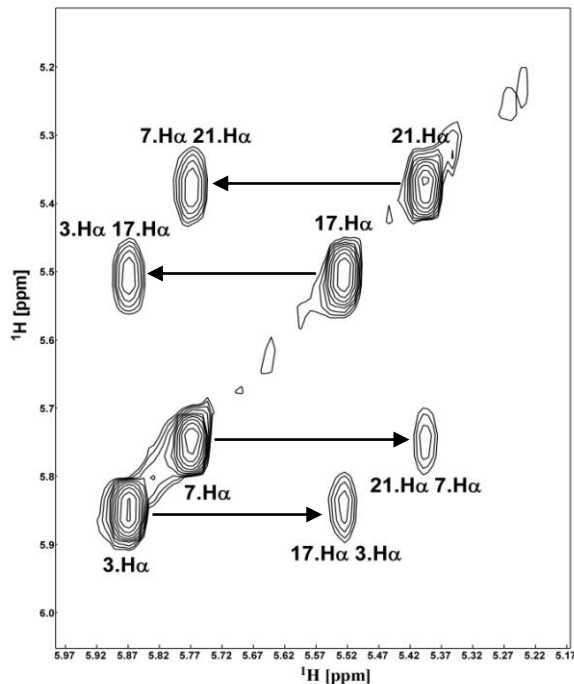
**Abb. 3-4:** 2D- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum von Alvinellacin. Es sind alle Kreuzsignale, die auf dipolar koppelnden Protonen mit einem Abstand kleiner als 5 Å beruhen, zu sehen.

Zum Beispiel konnten für die Aminosäuren G14 und N13 so intra- und interresiduale Resonanzen identifiziert werden (Abbildung 3-5). Es konnten für die Aminosäure G14 beide  $\alpha$ -Protonen identifiziert werden. Für die Aminosäure N13 dagegen konnten zwei  $\beta$ -Protonen und ein  $\alpha$ -Proton identifiziert werden. Man kann erkennen, dass beide Aminosäuren interresiduale Resonanzen zeigen, welche benachbarten aber auch sequentiell weit entfernten Aminosäuren zugeordnet werden konnten. Im Weiteren sind Kreuzsignale zwischen den beiden Aminosäuren identifizierbar (Abbildung 3-5 rote Linien).



**Abb. 3-5: Darstellung von intra- und interresidualen NOE-Signalen der Aminosäuren G14 und N13.** Die Darstellung zeigt die Spinsysteme sowie interresidualen Kreuzsignale der Aminosäuren G14 und N13 im 2D-TOCSY und 2D-NOESY. Die Position der Aminosäuren in der Primärsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code und der Position oberhalb der Rechtecke angegeben. Die Positionen der Resonanzen aus dem Spinsystem der jeweiligen Aminosäure sind mit gestrichelten schwarzen Linien sowohl im 2D- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY als auch im 2D- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum markiert. Die gestrichelten roten Linien markieren Kreuzsignale zwischen den beiden Aminosäuren.

In Abbildung 3-6 ist eine Darstellung eines interresidualen Kontaktes zwischen den Aminosäuren C3 und C17 sowie C7 und C21 abgebildet. Dabei koppeln die  $\alpha$ -Protonen der jeweiligen Aminosäuren, welche in der Primärstruktur weit auseinander liegen, miteinander.



**Abb. 3-6: Darstellung von interresidualen Signalen zwischen den Aminosäuren C3 und C17 sowie C7 und C21.** Die interresidualen Kontakte sind mit den Namen der in Wechselwirkung stehenden Atome bezeichnet.

### 3.1.3 Die Disulfidverbindungen von Alvinellacin

Im Anschluss an die Differenzierung von interresidualen Resonanzen, wurde mit Hilfe der Strukturberechnungen versucht, die Disulfidverknüpfungen zu ermitteln.

Die Sulfhydrylgruppen aller vier Cysteine liegen sehr nahe beieinander. Um die genaue Verknüpfung dieser Cysteine zu bestimmen, wurden unterschiedliche Kombinationen für die Strukturberechnung als Abstandsvorgaben benutzt. Die r.m.s.d., die Anzahl der Strukturabweichungen und die Verteilung der Diederwinkelpaare im Ramachandran-Diagramm diente als Kriterium für die Ermittlung des Ensembles mit der niedrigsten Energie. So konnte die Cysteinverknüpfung C3-C7 und C17-C21 (Tabelle 3-1) als das Ensemble mit der niedrigsten Zielfunktion ermittelt werden. Nach 400 Strukturberechnungen lag die r.m.s.d. bei 0,66 (Tabelle 3-1). Strukturverletzungen sind nicht aufgetreten. Im Weiteren ergab die Ramachandran-Darstellung für diese Cysteinverknüpfung die

energetisch günstigste Verteilung der Diederwinkelpaare. Daher wird diese Cysteinverbrückung favorisiert.

**Tab. 3-1: Cysteinkombinationen als Vorgaben für die Strukturberechnung von Alvinellacin.**

Cysteinverbindung	r.m.s.d.*	Fehler > 0,5 Å	Ramachandran-Plot <sup>§</sup>
Ohne Vergabe	0,75 +/- 0,14	0	18,5/48,8/27,6/5,0
C3-C7/C17-C21	0,66 +/- 0,13	0	17,6/64,7/17,6/0
C3-C17/C7-C21	0,64 +/- 0,13	0	12,6/45,3/33,5/8,5
C3-C21/C7-C17	0,65 +/- 0,10	0	22,4/41,2/31,2/5,3

r.m.s.d. = *root mean square deviation*. <sup>§</sup> Darstellung der Ramachandran-Verteilung von 20 Konformeren (Reihenfolge: am meisten begünstigte/ zusätzlich erlaubte/ generell erlaubte/ nicht erlaubte Bereiche der Torsionswinkel in %)

### 3.1.4 Die Tertiärstruktur von Alvinellacin

Für die Strukturberechnungen mit dem Programm CYANA (Güntert, 2004) konnten 196 Atomabstände verwendet werden (Tabelle 3-2). Für die Berechnung der mittleren Struktur von Alvinellacin wurden 20 Strukturen mit der niedrigsten *target function* ausgewählt.

In Tabelle 3-2 dargestellt ist die Verteilung der Diederwinkelpaare Phi und Psi des Proteinrückgrats der mittleren Struktur von Alvinellacin nach Ramachandran (Software *NMRView5.2.2*).



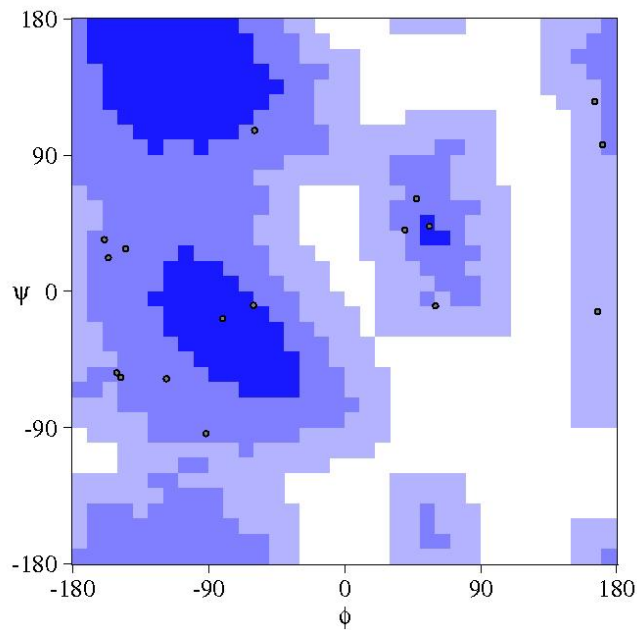
**Tab. 3-2: Statistik der Strukturberechnung der 20 energieärmsten Konformere von Alvinellacin.**

In keiner der Strukturen wurden die Abstandsbeschränkungen um mehr als 0,5 Å überschritten.

r.m.s.d. = root mean square deviation.

Abstandsvorgaben	
Intraresidual ( $i-j = 0$ )	60
Sequentiell ( $ i-j  = 1$ )	33
Medium-range ( $2 \leq  i-j  \leq 4$ )	22
Long-range ( $ i-j  \geq 5$ )	81
Disulfidbrücken	12
Insgesamt	196
Paarweise r.m.s.d.	
Mittlere r.m.s.d. des Rückgrats	0,66 +/- 0,13
Mittlere r.m.s.d. der schweren Atome	1,33 +/- 0,17
Ramachandran-Diagramm für die mittlere Struktur	
Meistbegünstigte Bereiche (%)	17,6
Zusätzliche begünstigte Bereiche (%)	64,7
Allgemein begünstigte Bereiche (%)	17,6
Nicht erlaubte Bereiche (%)	0

Das Ramachandran-Diagramm der mittleren Struktur von Alvinellacin ist in Abbildung 3-7 dargestellt. In diesem Diagramm repräsentieren die dunkelblauen Bereiche die energetisch meistbegünstigten Bereiche. In diesen sind 17,6 % der Torsionswinkel enthalten. 64,7 % der Torsionswinkel befinden sich in den mittelblauen Bereichen, welche zusätzlich erlaubte Areale darstellen. In den allgemein erlaubten Bereichen, welche in hellblau dargestellt sind, sind 17,6 % der Torsionswinkel und in den nicht erlaubten Bereichen, welche in weiß dargestellt sind, befinden sich 0 % der Torsionswinkel.



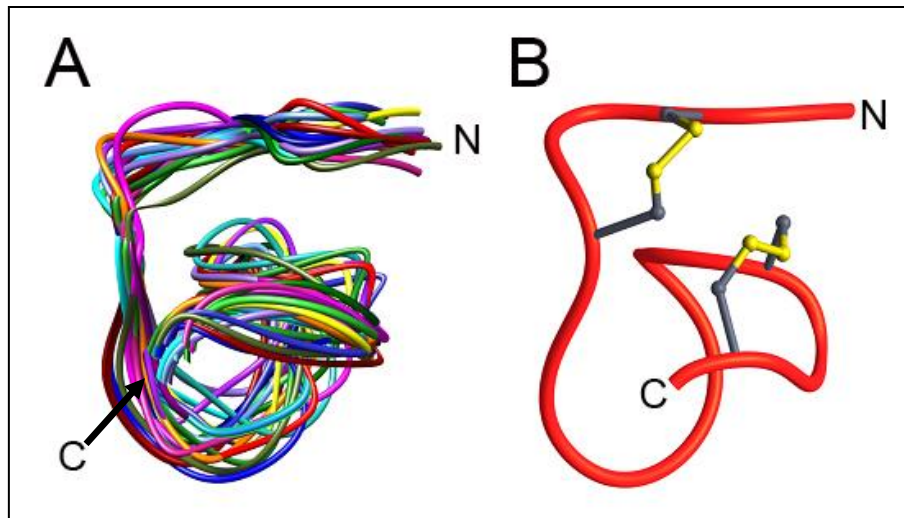
**Abb. 3-7: Ramachandran-Verteilung der Torsionswinkel von Alvinellacin.** Es ist die statistische Verteilung der Diederwinkelpaare der mittleren Struktur dargestellt. Sie entspricht den Angaben in Tabelle 3-2.

Die 20 Strukturen mit der geringsten Zielfunktion sind in Abbildung 3-8A dargestellt. Dieses Ensemble lässt in einigen Bereichen Abweichungen erkennen. Flexible Bereiche sind der N-Terminus und die beiden sich anschließenden Loops.

Nach der Berechnung der mittleren Struktur aus diesen 20 Strukturen, wurde diese energieminimiert. Diese ist in Abbildung 3-8B dargestellt.

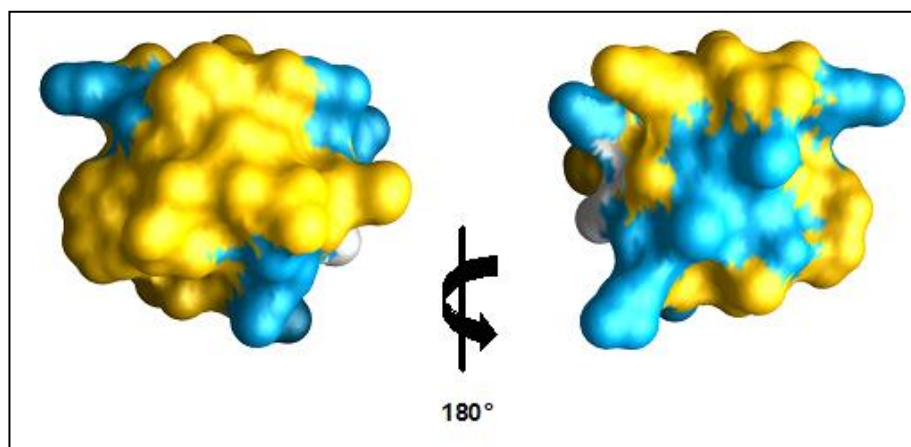
Es ist zu erkennen, dass Alvinellacin keine  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter aufweist. Das Peptid besteht aus *random coil* Elementen und weist eine G-förmige Konformation auf.

Wie bereits erwähnt, enthält die Primärstruktur von Alvinellacin vier Cysteine. Bei der favorisierten Verbrückung bilden die Cysteine C3 und C7 sowie die Cysteine C17 und C21 je eine Disulfidbrücke.



**Abb. 3-8: Darstellung der Tertiärstruktur von Alvinellacin.** A) Spaghettidarstellung des Ensembles der 20 energieärmsten Strukturen. B) Darstellung der mittleren energieminierten Struktur von Alvinellacin als *Ribbon-Modell*. Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt. Der N-Terminus und C-Terminus ist mit N respektive C gekennzeichnet.

Anschließend wurde die Verteilung von kationischen und hydrophoben Aminosäureresten auf der Oberfläche des Moleküls ermittelt (Abbildung 3-9). Dabei erkennt man, dass die molekulare Oberfläche von Alvinellacin zweigeteilt ist. Die eine Seite besteht hauptsächlich aus hydrophoben Arealen. Bei einer Drehung des Peptides um  $180^\circ$  wird ein kationischen Areal sichtbar. Es wird eine amphipathische Ladungsverteilung erkennbar.

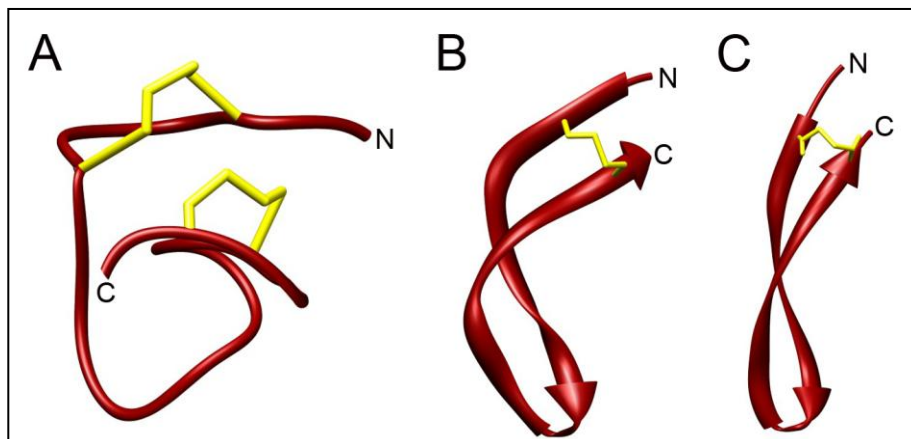


**Abb. 3-9: Darstellung der molekularen Oberfläche von Alvinellacin.** Oberflächenverteilung der hydrophoben (gelb) und kationischen (blau) Aminosäurereste.

### 3.1.5 Vergleich der Tertiärstrukturen von Alvinellacin, Arenicin-1 und Arenicin-2

Alvinellacin weist eine partielle Sequenzidentität zu Arenicin-1 und Arenicin-2 aus *Arenicola marina* auf. Ein Vergleich der Strukturen zeigte keine Analogie der Tertiärstrukturen zwischen den drei Peptiden.

Wie bereits erwähnt, zeigt Alvinellacin *random coil* Strukturelemente (Abbildung 3-10A). Die beiden Arenicine dagegen zeigen ein zweisträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, welches leicht um die mittlere Achse der Peptide gewunden ist (Abbildung 3-10B und C). Im Weiteren ist zu erkennen, dass die Cysteinverbrückungen unterschiedlich sind. Die beiden Arenicine besitzen eine Cysteinverbrückung, die die beiden Termini miteinander verbindet und dabei stabilisiert. Alvinellacin dagegen besitzt zwei Cysteinbrücken. Die favorisierte Verbrückung hat keine Ähnlichkeit zu der Cysteinbrücke der Arenicine.



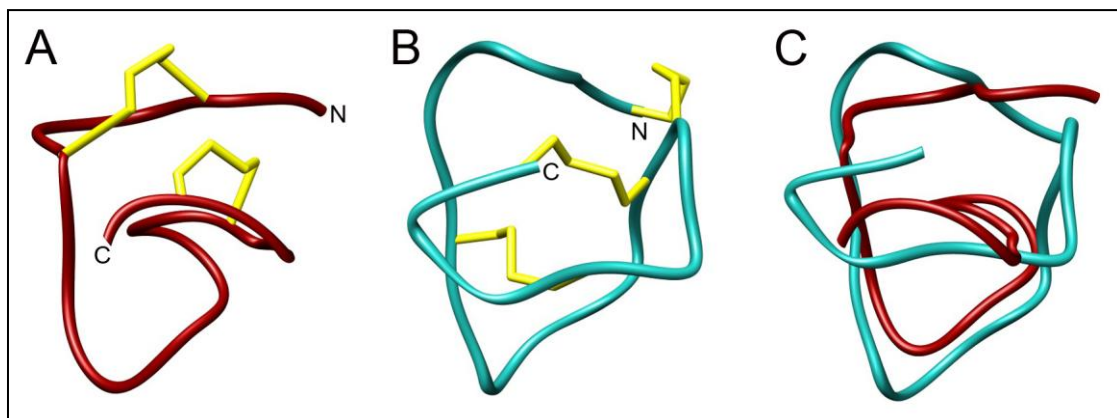
**Abb. 3-10: Struktureller Vergleich von Alvinellacin, Arenicin-1 und Arenicin-2.** Ribbon-Modell von A) Alvinellacin und B) Arenicin-1 sowie C) Arenicin-2. Cysteinbrücken sind in gelb dargestellt. Der N-Terminus und C-Terminus ist mit N respektive C gekennzeichnet.

### 3.1.6 Vergleich der Tertiärstruktur von Alvinellacin und Mitgliedern der Omega-Toxin-ähnlichen Proteinsuperfamilie

Um Peptide mit einer analogen Tertiärstruktur zu ermitteln, wurde ein Vergleich von einigen Strukturen aus der RCSB-Proteindatenbank (RCSB *protein data bank*), die

eine kurze Aminosäuresequenz besitzen, durchgeführt. Dabei konnte eine strukturelle Ähnlichkeit von Alvinellacin zu einem Toxin aus der Meeresschnecke *Conus magus*, dem  $\omega$ -Conotoxin MVIIC (Farr-Jones *et al.*, 1995), ermittelt werden (Abbildung 3-11). Das  $\omega$ -Conotoxin MVIIC gehört in die Familie der Conotoxine, welche die Knottin-Faltungstopologie aufweisen. Diese Faltungstopologie wird durch ein, durch Cysteinbrücken stabilisiertes,  $\beta$ -Faltblatt charakterisiert. SCOP (*Structural Classification of Proteins* (Murzin *et al.*, 1995) ordnet die Familie der Conotoxine zur Superfamilie der Omega-Toxin-ähnlichen Proteine, welche in die Klasse der kleinen Proteine eingeordnet wird.

Es ist zu erkennen, dass beide Peptide aus *random coil* Strukturelementen bestehen und eine G-förmige Konformation aufweisen (Abbildung 3-11). Hierbei weichen die Termini der beiden Peptide besonders stark voneinander ab (Abbildung 3-11C). Im Weiteren ist zu erkennen, dass die beiden Peptide eine unterschiedliche Cysteinverbindung haben. Die Position der für Alvinellacin favorisierten Cysteinverbrückung (C3-C7, C17-C21) im Molekül weicht stark von der Position der Cysteinverbrückungen des  $\omega$ -Conotoxins MVIIC ab. Die Cysteinverbrückung von Alvinellacin verbindet die Cystein 1-2 sowie 3-4. Im  $\omega$ -Conotoxin MVIIC werden dagegen die Cysteine 1-4, 2-5 und 3-6 verknüpft.

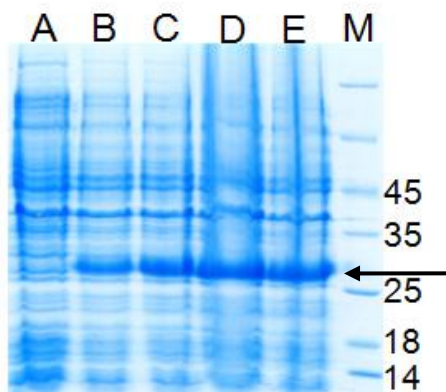


**Abb. 3-11: Struktureller Vergleich von Alvinellacin und  $\omega$ -Conotoxin MVIIC.** Ribbon-Modell von A) Alvinellacin und B)  $\omega$ -Conotoxin (pdb-Code 1OMN), C) Superpositionierung der beiden Peptide. Cysteinbrücken sind in gelb dargestellt. Der N-Terminus und C-Terminus ist mit N respektive C gekennzeichnet.

## 3.2 Aufklärung der Tertiärstruktur von Theromacin

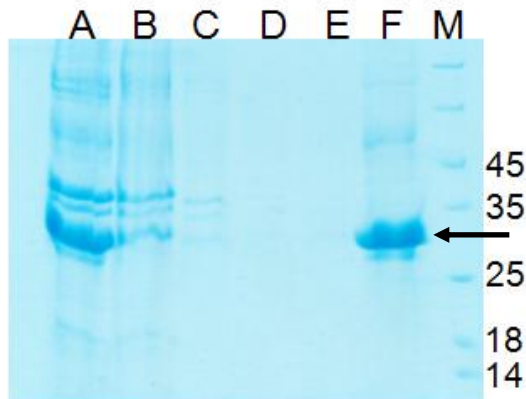
### 3.2.1 Expression, Renaturierung und Proteinreinigung

Das von Dr. Sascha Jung hergestellte Fusionsprotein enthält neben einer Enterokinaschnittstelle noch einen Hexa-Histidin-tag. Nachdem das Expressions- und Renaturierungsprotokoll von Dr. Sascha Jung etabliert wurde, wurde das Fusionsprotein in Minimalmedium exprimiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde eine Stunde nach der Induktion nachgewiesen. In Abbildung 3-12 ist die gelelektrophoretische Analyse der Proben dargestellt. Die Proben wurden jeweils vor und nach Induktion entnommen. Auf allen Gelspuren wurde die gleiche Menge an Bakterienpräzipitat aufgetragen. Es konnte festgestellt werden, dass nach vier Stunden eine große Menge an angereichertem Fusionsprotein vorlag.



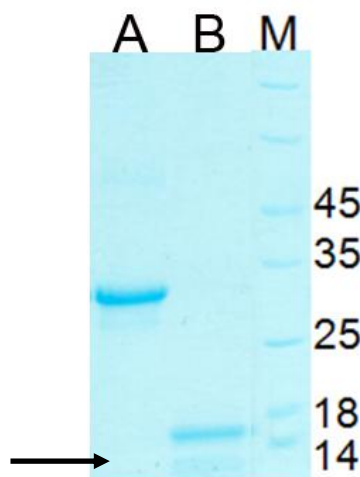
**Abb. 3-12: Gelelektrophoretische Analyse der Expression des Fusionsproteins.** Für die gelelektrophoretische Trennung der Proteine wurden Proben A) vor der Induktion der Expression, B) 1h, C) 2h, D) 3h und E) 4h nach der Induktion entnommen. Der Pfeil markiert die Lage des Fusionsproteins. M) Proteinstandard in kDa.

Die Aggregation des denaturierten Fusionsproteins führte zur Bildung von Einschlusskörpern. Diese wurden isoliert, anschließend gewaschen und solubilisiert. Mittels Ni-NTA-Agarose konnte das Fusionsprotein gereinigt und anschließend isoliert werden (Abbildung 3-13B). Bei den anschließenden Waschschritten wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt (Abbildung 3-13C-E). Dabei wurde in den Proben kein Fusionsprotein detektiert. Erst durch die Elution löste sich das Fusionsprotein von der Ni-NTA-Agarose. Anschließend lag das Fusionsprotein nahezu ohne Verunreinigungen vor (Abbildung 3-13F).



**Abb. 3-13: Reinigung der Proteinprobe mittels Ni-NTA-Agarose.** Proteinprobe A) vor Bindung an Ni-NTA-Agarose, B) nach Bindung an Ni-NTA-Agarose, C) Waschschrift 1, D) Waschschrift 2, E) Waschschrift 3 und F) Elution des Proteins. M) Protein-Standards in kDa.

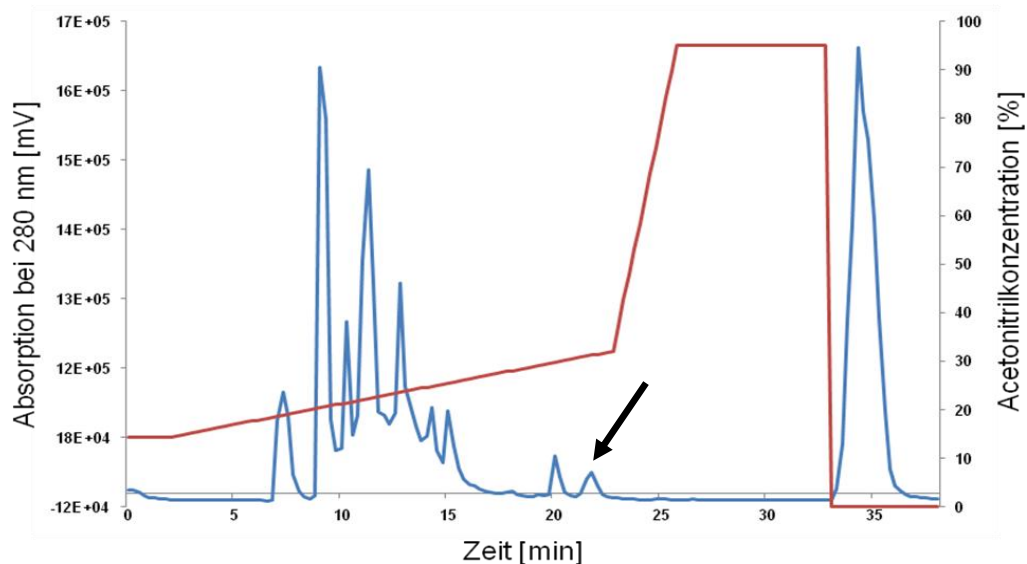
Anschließend an die Renaturierung mittels Dialyse wurde das Fusionsprotein proteolytisch gespalten. In Abbildung 3-14 ist die gelelektrophoretische Analyse der Probe vor und nach der proteolytischen Spaltung dargestellt. Nach der Renaturierung lag das Fusionsprotein ohne Verunreinigungen vor (Abbildung 3-14A). Nach dem Verdau mit EnterokinaseMax<sup>TM</sup> konnte eine Proteinbande detektiert werden, welche der des rekombinanten Theromacins entspricht. Die zweite, größere Proteinbande, die oberhalb der 14 kDa-Proteinbande des Molekulargewichtsstandards lag, stellt den Fusionsrest dar (Abbildung 3-14B). Für das Fusionsprotein konnte nach der proteolytischen Spaltung keine Proteinbande mehr nachgewiesen werden.



**Abb. 3-14: Enterokinase-Verdau des Fusionsproteins.** A) Proteinprobe vor Verdau mit EnterokinaseMax<sup>TM</sup>, B) Proteinprobe nach Verdau mit EnterokinaseMax<sup>TM</sup>. M) Protein-Standards in kDa.

Die Fraktionierung der Peptidlösung wurde mittels RP-HPLC durchgeführt (Abbildung 3-15). Dabei konnten mehrere Fraktionen detektiert werden. Mit Hilfe der Massenspektroskopie (MALDI-TOF) wurde gezeigt, dass die Fraktion bei 22 min die erwartete Größe von Theromacin aufwies (Daten nicht gezeigt).





**Abb. 3-15: RP-HPLC-Diagramm der Reinigung des Theromacin-Peptidlösung.**

Blau: Chromatogramm der Proteinprobe nach proteolytischer Spaltung des Fusionsproteins. Rot: Acetonitrilkonzentration (v/v) am Säuleneingang. Der Pfeil zeigt an, wo das Theromacin eluiert.

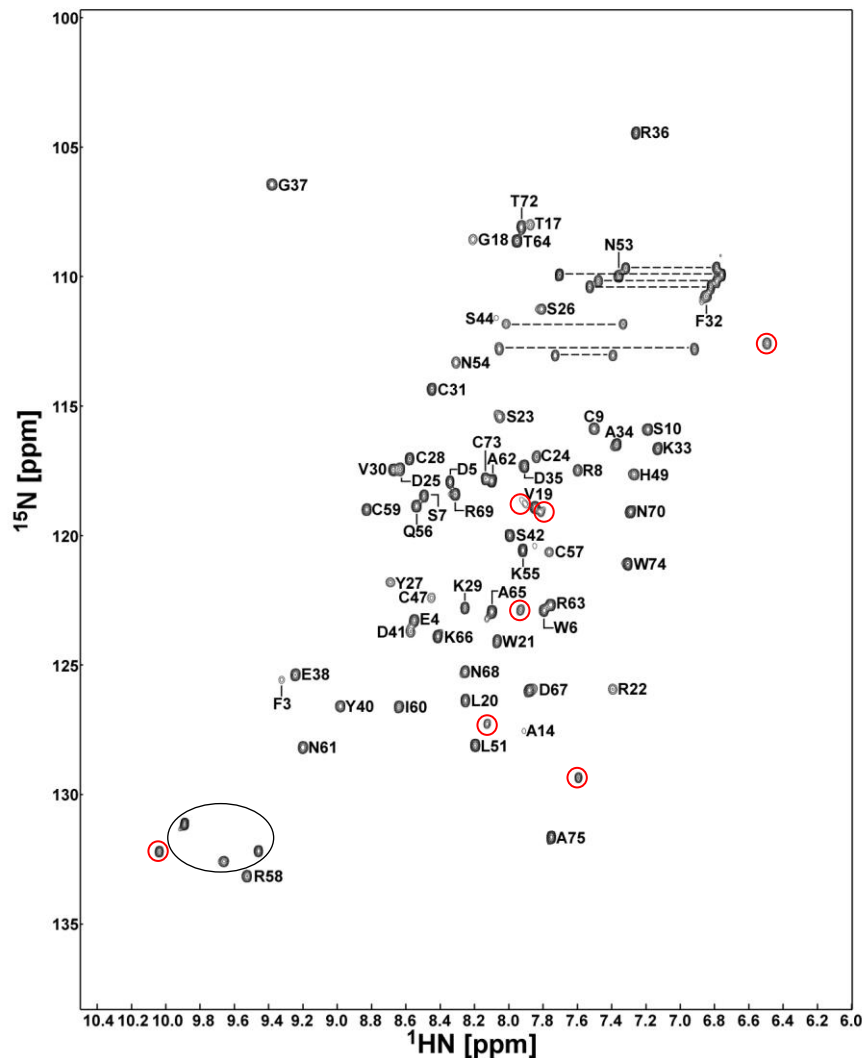
### 3.2.2 Die NMR-spektroskopische Aufklärung der Tertiärstruktur von Theromacin

Für die Aufklärung der Tertiärstruktur von Theromacin wurde zunächst ein 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum aufgenommen (Abbildung 3-16). Es wurden 86 Signale erwartet. Diese setzen sich aus den Resonanzen für die Amidgruppen der Aminosäuren, den Resonanzen der  $\text{N}_\epsilon$ -Protonen der Tryptophane und den Amidgruppen der Seitenketten von Asparagin und Glutamin zusammen. In dem 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum sind 85 Resonanzen zu erkennen. Im Weiteren konnte festgestellt werden, dass einige der Resonanzen (eingekreiste Resonanzen) zu einer Verunreinigung gehörten (Abbildung 3-16).

Die Primärstruktur von Theromacin weist zehn Cysteine auf. Um Disulfidisomere auszuschließen, wurde das 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum herangezogen. Das Vorhandensein von Disulfidisomeren kann nicht ausgeschlossen werden, da einige Resonanzen nicht zugeordnet werden konnten. Mit Hilfe des *Ellmans*-assays konnte



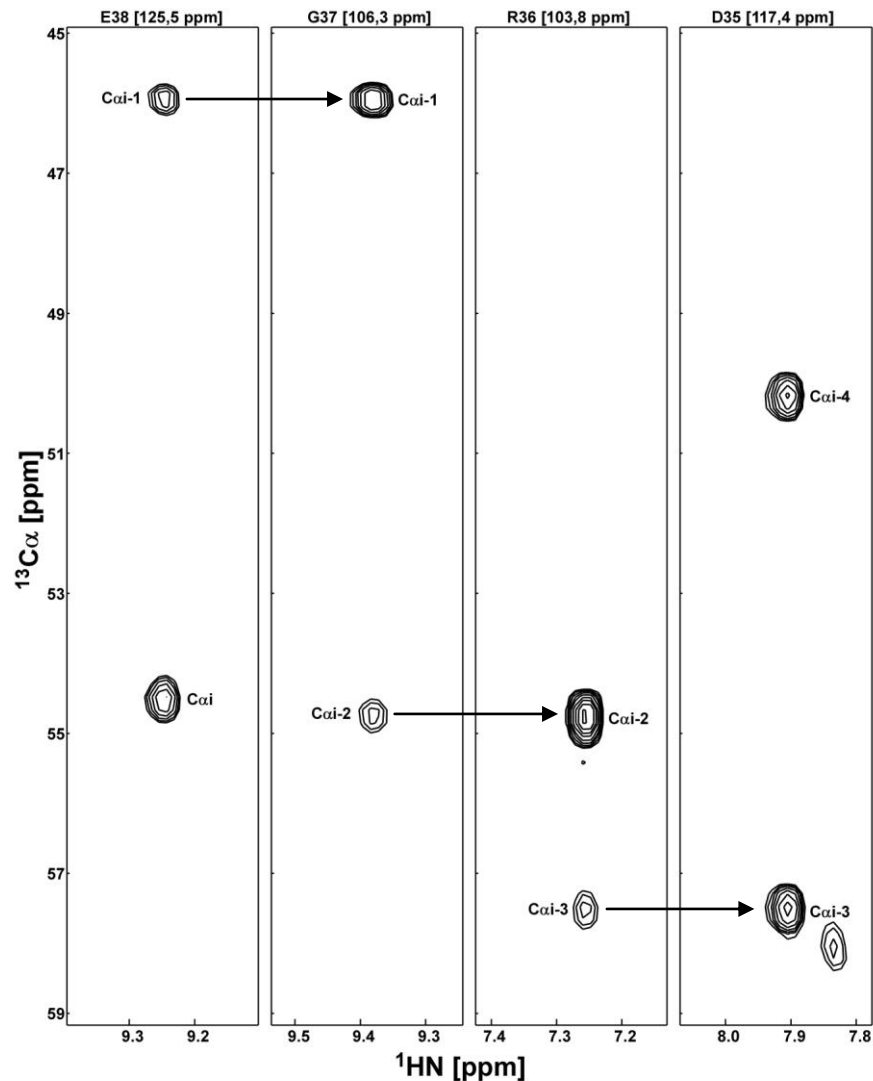
nachgewiesen werden, dass alle Cysteine an der Bildung von Cysteinbrücken beteiligt waren (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3-16: 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektrum von Theromacin.** Dargestellt sind die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Resonanzen jeder identifizierten Aminosäure. Die Beschriftung erfolgte mit der sequenziellen Position und dem Namen in Ein-Buchstaben-Code der jeweiligen Aminosäure. Die gestrichelten Linien geben die Positionen der Amidprotonenresonanzen der Asparagin- und Glutaminseitenketten an. Resonanzen, welche zu der Verunreinigung gehören, sind mit roten Kreisen markiert.

Die erste Zuordnung von sequenzspezifischen Resonanzen erfolgte im HNCA-Spektrum. Dieses gibt Aufschluss über die  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Frequenzen der Aminosäure  $i$  und  $i-1$ . Die Zuordnung erfolgte auf der Frequenz des Stickstoffprotons der Aminosäure  $i$ .

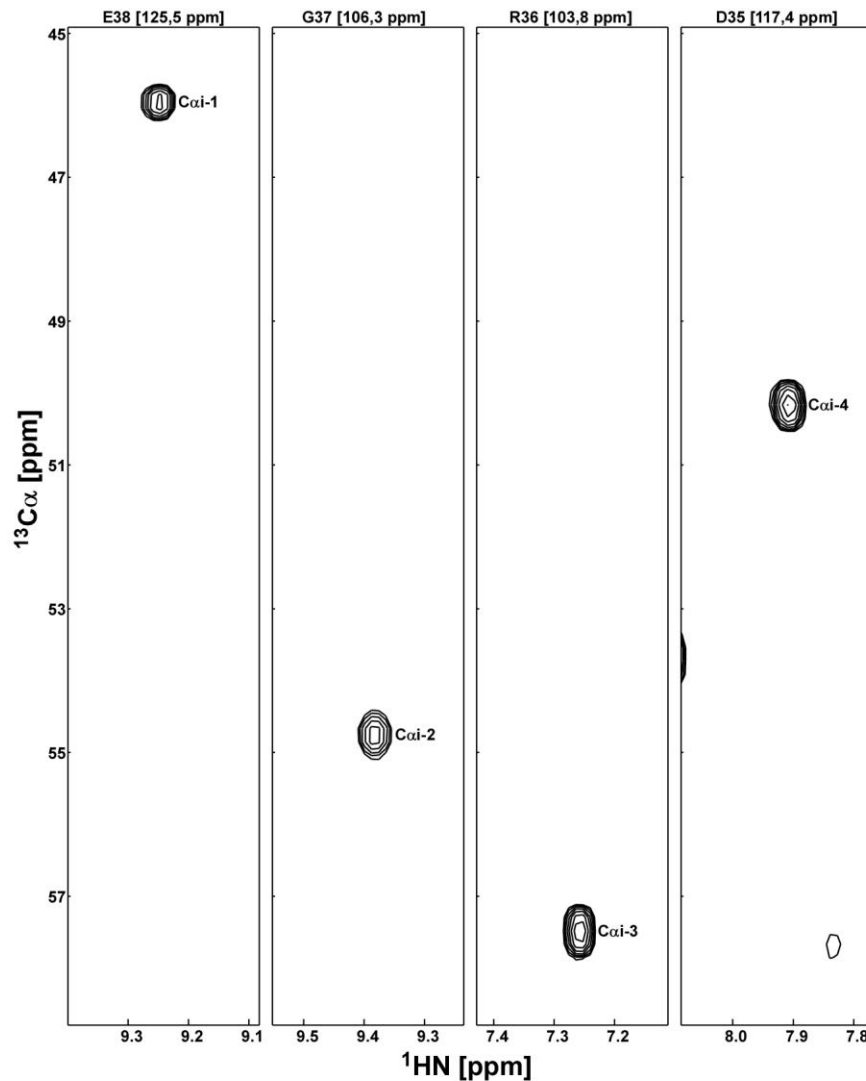
Mit Hilfe des 3D-HNCA-Spektrums konnten sequenziell benachbarte Aminosäuren identifiziert werden. In Abbildung 3-17 sind die  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Resonanzen von vier sequenziell benachbarten Aminosäuren und ihre Beziehung zueinander dargestellt. Dabei liegt die Aminosäure  $i$  in der Primärstruktur C-terminal zur Aminosäure  $i-1$ .



**Abb. 3-17: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im HNCA-Spektrum.** Die Darstellung zeigt die  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atome von vier Aminosäuren in der Abfolge der Primärsequenz. Es werden die Resonanzen der  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atome der Aminosäure  $i$  und  $i-1$  angegeben. Die Position der Aminosäuren in der Primärsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code und der Position oberhalb der Rechtecke angegeben. Die  $^{15}\text{N}$ -Frequenz ist in eckigen Klammern angegeben.

Für die Verifizierung der Zuordnung des Aminosäure-eigenen  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atoms wurde das

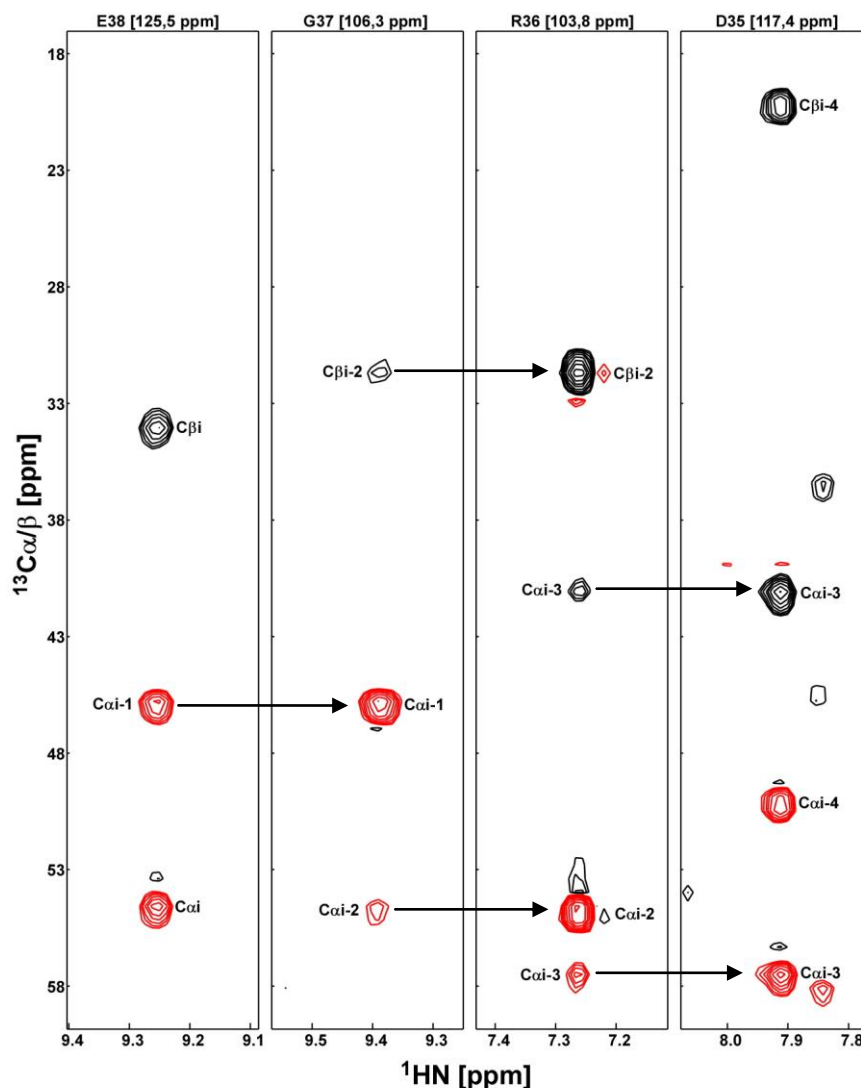
CA(CO)NH-Spektrum verwendet. In diesem Spektrum sind nur die Resonanzen für die  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atome der Aminosäure *i-1* zu erkennen (Abbildung 3-18). Diese Zuordnung erfolgt auf der Frequenz des Stickstoffprotons der Aminosäure *i*.



**Abb. 3-18: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im CA(CO)NH-Spektrum.** Die Darstellung zeigt die Resonanzen der  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atome der N-terminal gelegenen Aminosäure von vier Aminosäuren in der Abfolge der Primärsequenz. Die Position der Aminosäuren in der Primärsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code und der Position oberhalb der Rechtecke angegeben. Die  $^{15}\text{N}$ -Frequenz ist in eckigen Klammern angegeben.

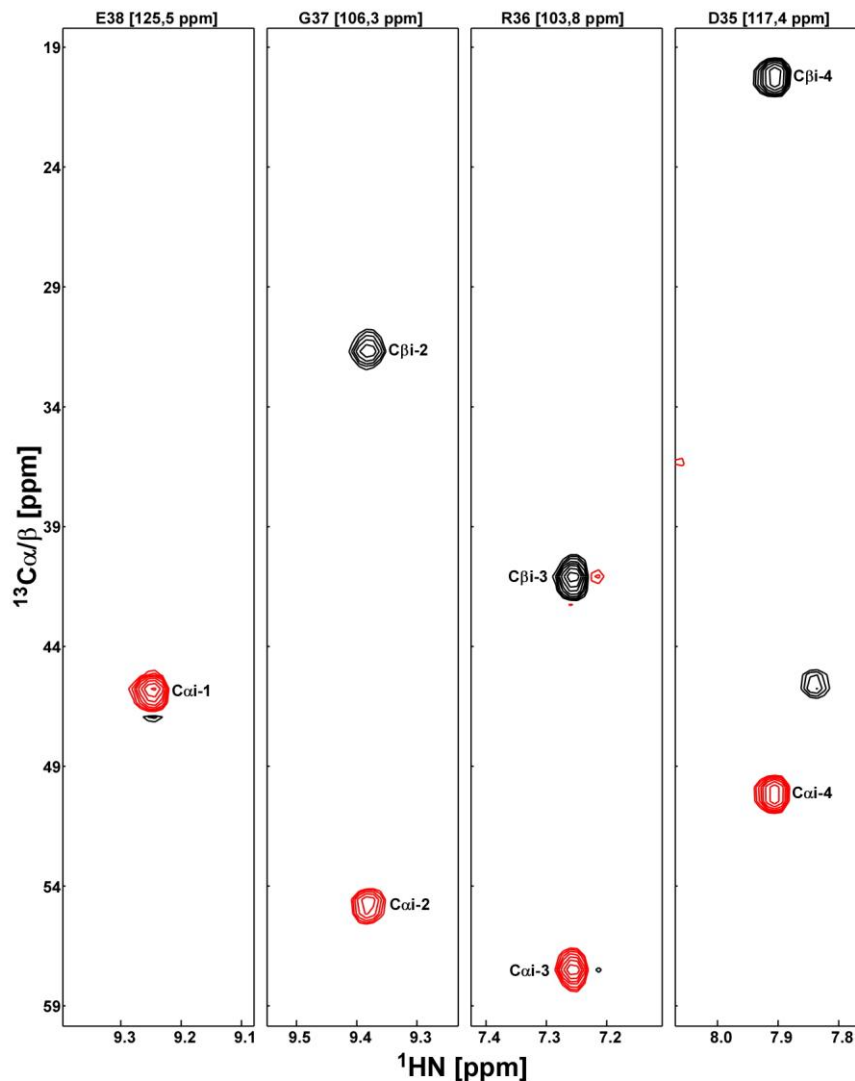
Anschließend an die Identifizierung der Resonanzen der  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atome der Aminosäuren *i* und *i-1*, wurden die Resonanzen der  $^{13}\text{C}_\beta$ -Atome mit Hilfe des

CBCANH-Spektrums identifiziert (Abbildung 3-19). Die Zuordnung der Resonanzen erfolgt auf der Frequenz des Stickstoffprotons der Aminosäure *i*. Auf der Stickstoffebene mit einer Frequenz von 125,5 ppm sind zwei  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atome und ein  $^{13}\text{C}_\beta$ -Atom zu erkennen. Die Frequenz des einen  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atoms konnte auf der Stickstoffebene mit einer Frequenz von 106,3 ppm erneut dargestellt werden. Da auf dieser Frequenz kein zweites  $^{13}\text{C}_\beta$ -Atom dargestellt ist, konnte die Aminosäure mit einer Stickstofffrequenz von 106,3 ppm als Glycin identifiziert werden.



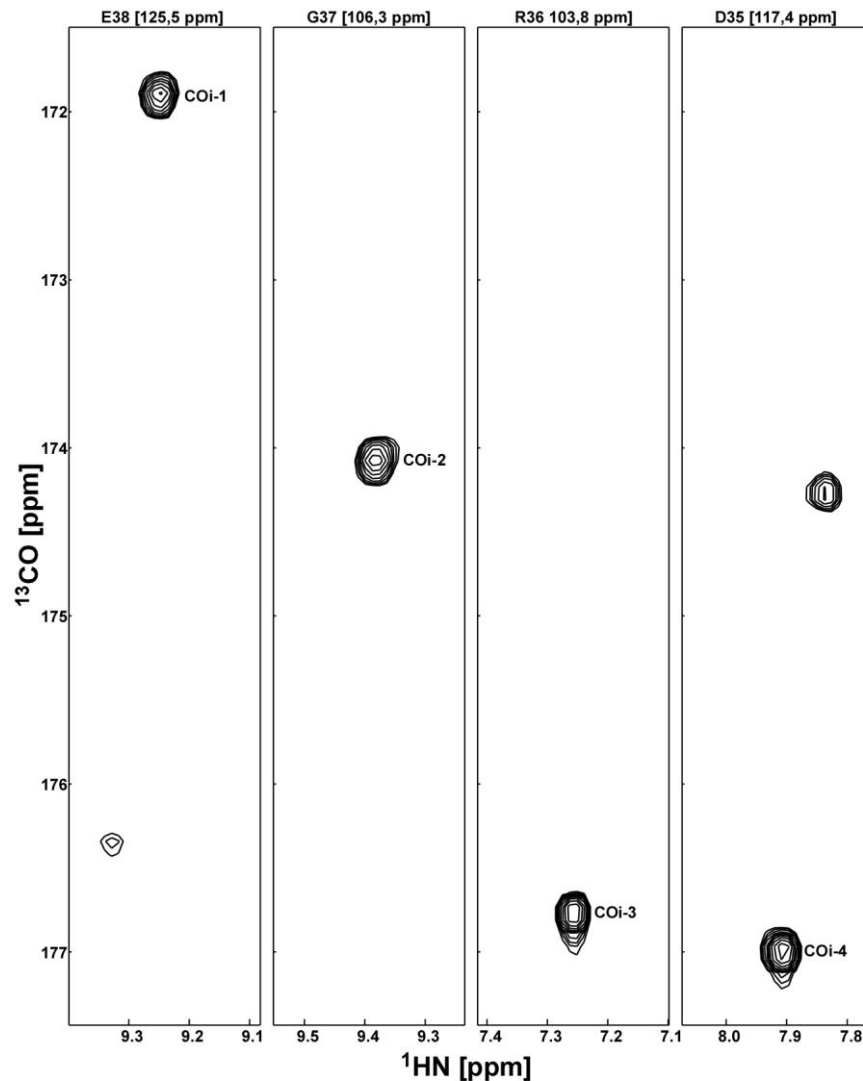
**Abb. 3-19: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im CBCANH-Spektrum.** Die Darstellung zeigt die Resonanzen der  $^{13}\text{C}_\alpha$ - und  $^{13}\text{C}_\beta$ -Atome der Aminosäuren *i* und *i-1* in der Abfolge der Primärsequenz. Die Position der Aminosäuren in der Primärsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code und der Position oberhalb der Rechtecke angegeben. Die  $^{15}\text{N}$ -Frequenz ist in eckigen Klammern angegeben.

Für die Verifizierung der  $^{13}\text{C}_\beta$ -Atome der Aminosäuren wurde das CBCA(CO)NH-Spektrum verwendet. In diesem Spektrum werden nur die Resonanzen für die  $^{13}\text{C}_\alpha$ - und  $^{13}\text{C}_\beta$ -Atome der Aminosäure  $i-1$  dargestellt (Abbildung 3-20). Mit Hilfe dieses Spektrums konnte das Glycin auf der Stickstofffrequenz von 106,3 ppm verifiziert werden. Die Verifizierung erfolgte auf der Stickstofffrequenz von 125,5 ppm, auf der nur eine Resonanz für das  $^{13}\text{C}_\alpha$ -Atom zu erkennen ist.



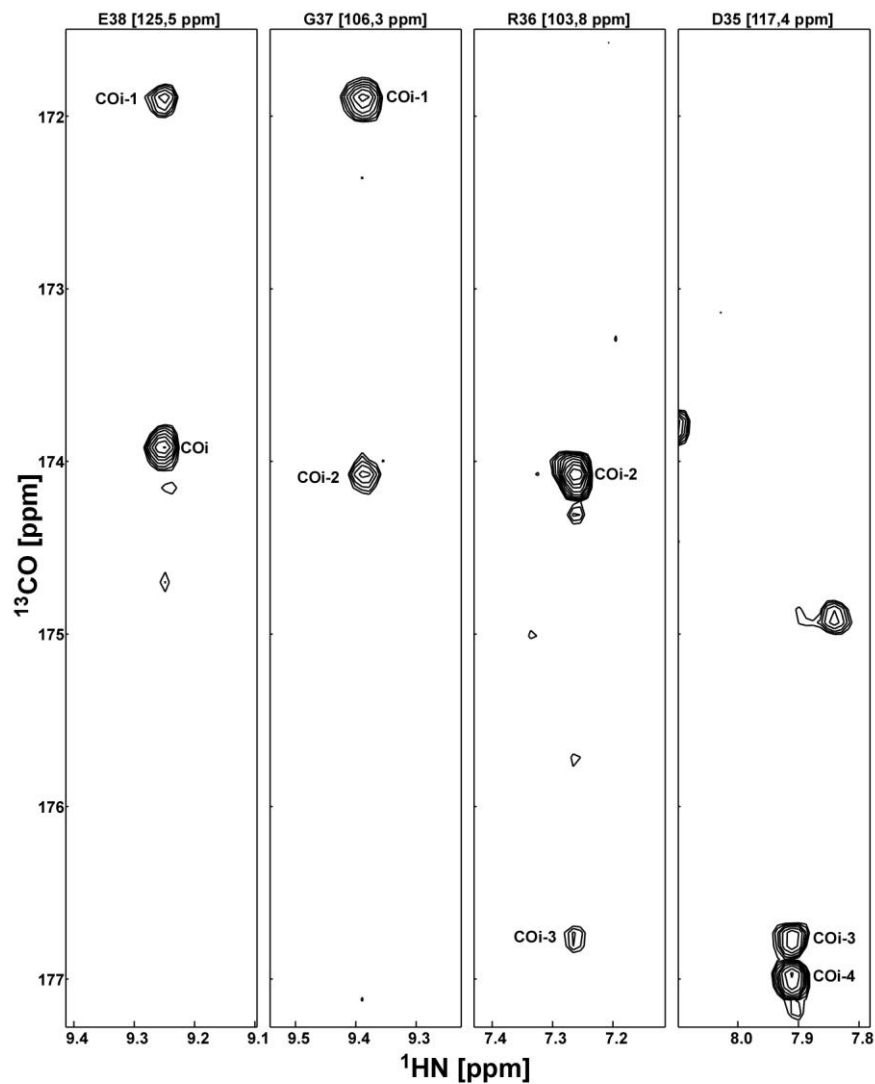
**Abb. 3-20: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im CBCA(CO)NH-Spektrum.** Die Darstellung zeigt die Resonanzen der  $^{13}\text{C}_\alpha$ - und  $^{13}\text{C}_\beta$ -Atome der Aminosäure  $i-1$  auf der Stickstofffrequenz der Aminosäure  $i$ . Die Position der Aminosäuren in der Primärsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code und der Position oberhalb der Rechtecke angegeben. Die  $^{15}\text{N}$ -Frequenz ist in eckigen Klammern angegeben.

Mit Hilfe des HNCO-Spektrums wurden den bereits bekannten Resonanzen der  $^{13}\text{C}\alpha$ - sowie  $^{13}\text{C}\beta$ -Atome der Aminosäure *i-1* die Frequenz des zugehörigen Carbonylkohlenstoffs ( $^{13}\text{CO}$ ) zugeordnet (Abbildung 3-21).



**Abb. 3-21: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im HNCO-Spektrum.** Die Darstellung zeigt die Resonanzen der  $^{13}\text{CO}$ -Atome der Aminosäure *i-1* auf der Stickstofffrequenz der Aminosäure *i*. Die Position der Aminosäuren in der Primärsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code und der Position oberhalb der Rechtecke angegeben. Die  $^{15}\text{N}$ -Frequenz ist in eckigen Klammern angegeben.

Im CO(CA)NH-Spektrum werden, neben den schon im HNCO-Spektrum vorhandenen Resonanzen der Carbonylkohlenstoffatom der Aminosäure *i-1*, auch die Resonanzen für das Carbonylkohlenstoffatom der Aminosäure *i* dargestellt (Abbildung 3-22). Mit Hilfe des CO(CA)NH- und des HNCO-Spektrum konnten die sequenzspezifischen Zuordnungen noch weiter verifiziert werden.

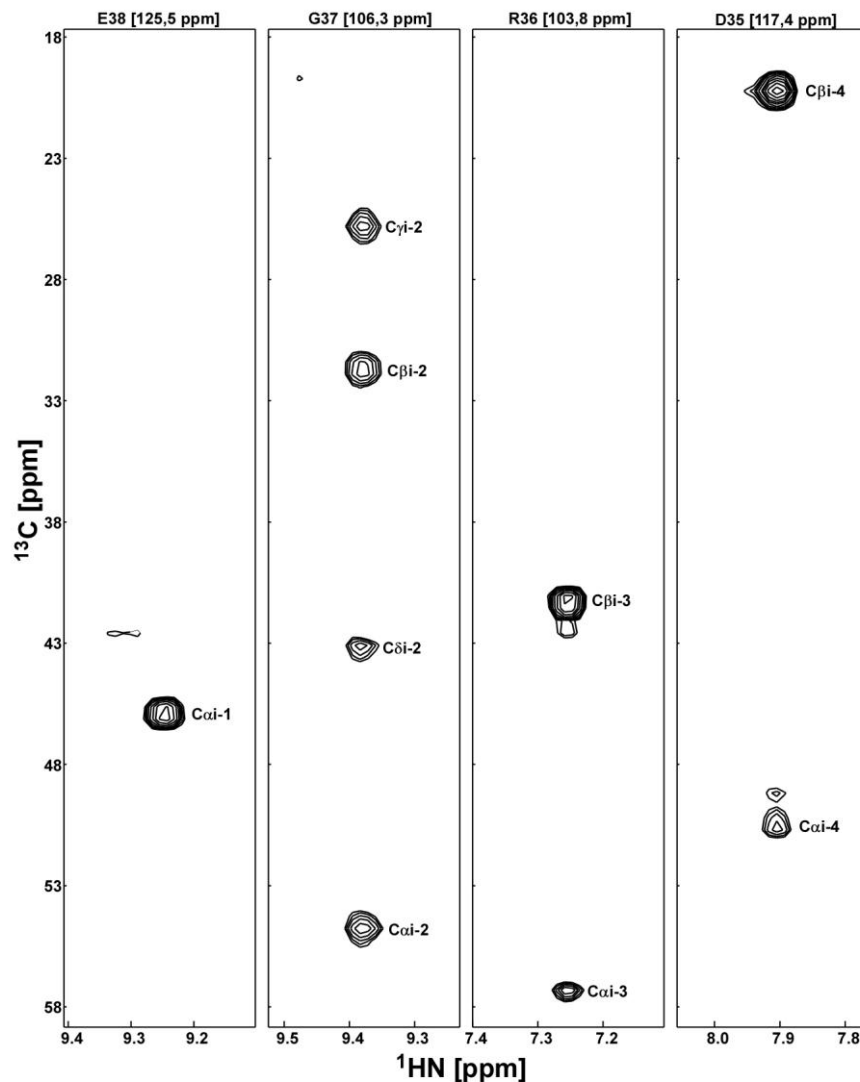


**Abb. 3-22: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im CO(CA)NH-Spektrum.** Die Darstellung zeigt die Resonanzen der  $^{13}\text{CO}$ -Atome der Aminosäuren *i* und *i-1* auf der Stickstofffrequenz der Aminosäure *i*. Die Position der Aminosäuren in der Primärsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code und der Position oberhalb der Rechtecke angegeben. Die  $^{15}\text{N}$ -Frequenz ist in eckigen Klammern angegeben.

Mit Hilfe des 3D-(H)C(CO)NH-Spektrums konnten den Aminosäuren *i-1* neben den C $\alpha$ - und C $\beta$ -Atomen noch weitere vorhandene Kohlenstoffatome zugeordnet werden (Abbildung 3-23). In diesem Spektrum wurde das zuvor identifizierte Glycin weiter verifiziert. Es konnten zwei Aminosäuren identifiziert werden, die nur ein  $^{13}\text{C}\alpha$ - und ein  $^{13}\text{C}\beta$ -Atom besitzen. Für die Aminosäure *i-1*, welche auf der Stickstofffrequenz von 117,4 ppm der C-terminal gelegenen Aminosäure zu erkennen ist, kam nur ein Alanin in Betracht. Dies konnte aus der Frequenz des  $^{13}\text{C}\beta$ -Atoms geschlossen werden. Nur für die Aminosäure Alanin ist bekannt, dass die Resonanz des  $^{13}\text{C}\beta$ -Atoms bei einer Frequenz von rund 20 ppm liegt.

Die Sequenz AXXGX kommt nur einmal in der Primärstruktur des Theromacins vor. Daher konnten die anderen drei Aminosäuren als Glutaminsäure, Arginin und Asparaginsäure identifiziert werden. Die Verifizierung der Resonanzen dieser Aminosäure erfolgte mit Hilfe der TOCSY-Spektren.



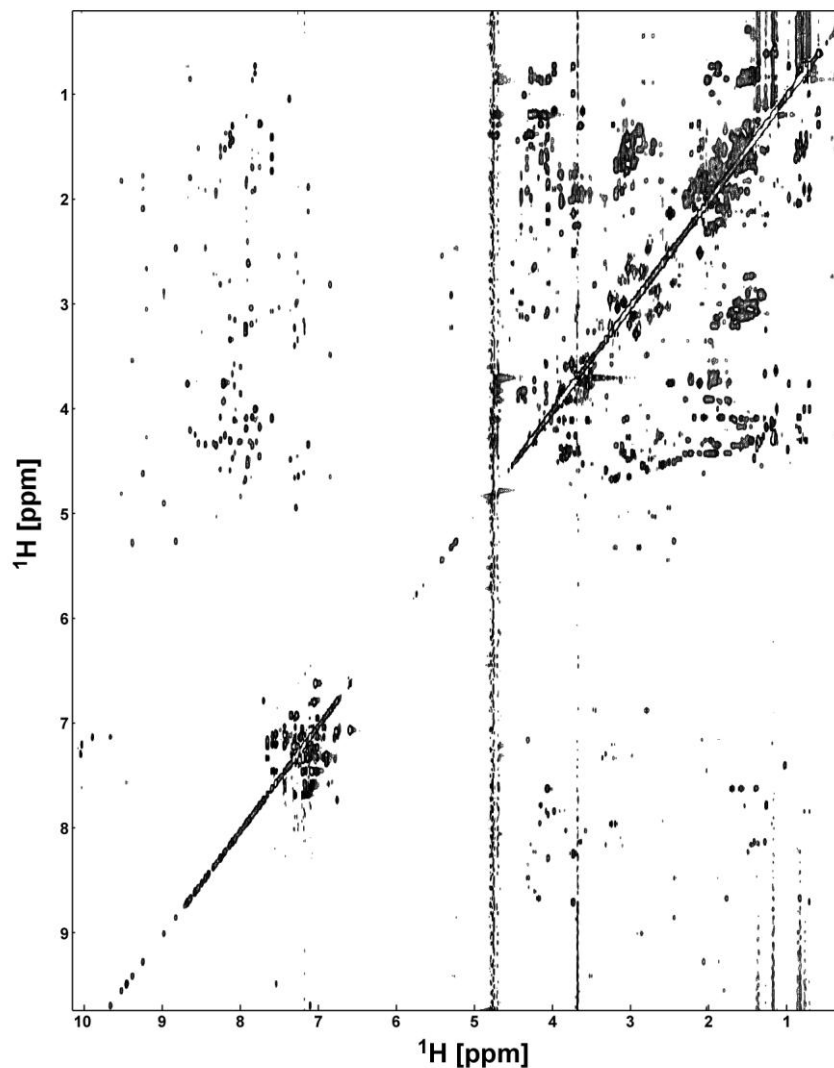


**Abb. 3-23: Darstellung von Resonanzen der Kohlenstoffatome sequenziell benachbarten Aminosäuren im (H)C(CO)NH-Spektrum.**

Die Darstellung zeigt die Resonanzen der Kohlenstoffatome der Aminosäure  $i-1$  auf der Stickstofffrequenz der Aminosäure  $i$ . Die Position der Aminosäuren in der Primärsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code und der Position oberhalb der Rechtecke angegeben. Die  $^{15}\text{N}$ -Frequenz ist in eckigen Klammern angegeben.

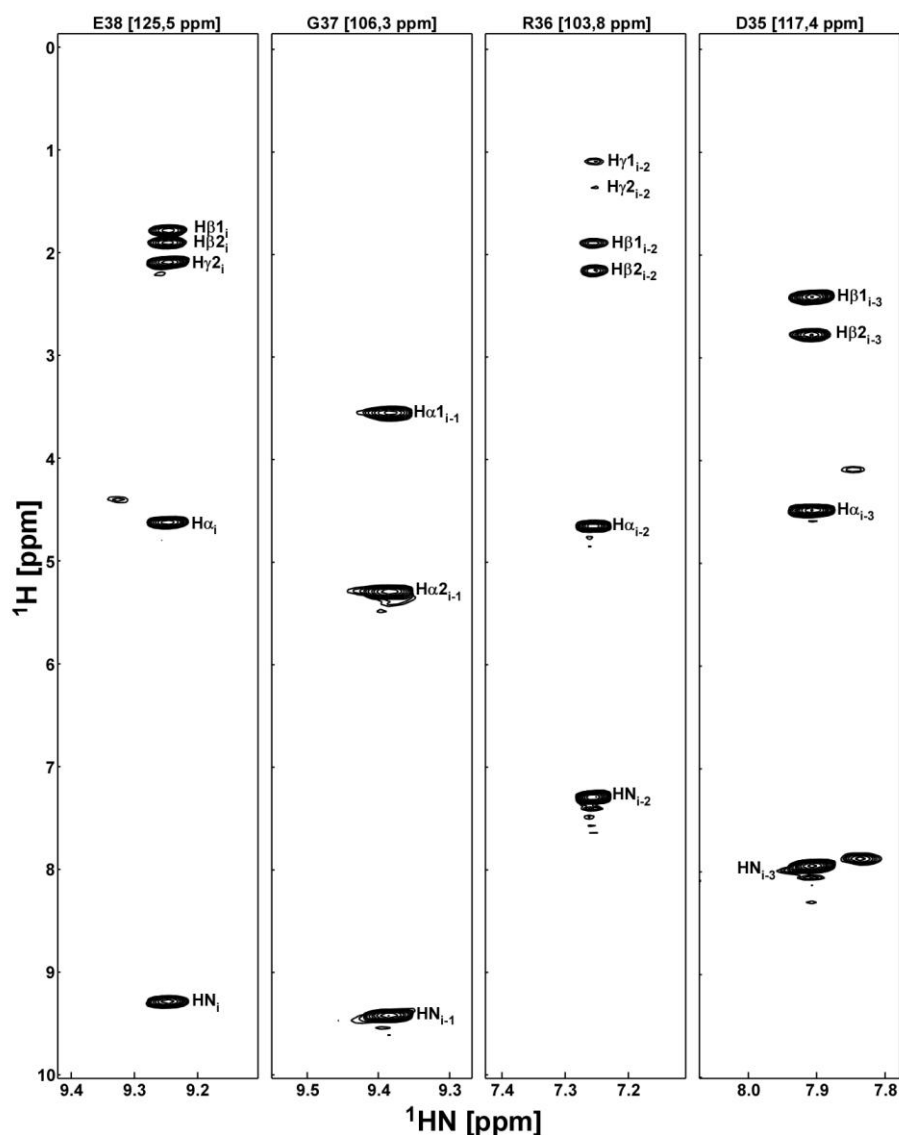
Im Anschluss an die Identifizierung von sequenziell benachbarten Aminosäuren wurden mittels des homonuklearen, zweidimensionalen TOCSY-Spektrums, des dreidimensionalen,  $^{15}\text{N}$ -editierten TOCSY-HSQC-Spektrums sowie dem dreidimensionalen,  $^{13}\text{C}$ -editierten TOCSY-HSQC-Spektrums die Spinsysteme den einzelnen Aminosäuren zugeordnet.

Wie bereits erwähnt, sind in einem TOCSY-Experiment auf Grund der skalaren Kopplung eines Spinsystems nahezu alle Protonen einer Aminosäure identifizierbar. In Abbildung 3-24 ist ein homonukleares, zweidimensionales TOCSY-Spektrum bei einer Mischzeit von 60 ms dargestellt. Mit Hilfe dieses Spektrums konnten die Spinsysteme der Aminosäuren zugeordnet werden.



**Abb. 3-24:** Zweidimensionales, homonukleares TOCSY-Experiment von Theromacin.

Da in einem zweidimensionalen, homonuklearen TOCSY-Spektrum die Resonanzen der einzelnen Aminosäuren trotz der Entzerrung der Signale aus einem 1D-Spektrum weiterhin überlagert sein können, wurde eine weitere Zuordnung von intraresidualen Signalen mit Hilfe eines dreidimensionalen,  $^{15}\text{N}$ -editierten TOCSY-Experimentes durchgeführt. Ein Ausschnitt des dreidimensionalen,  $^{15}\text{N}$ -editierten TOCSY-Spektrums, welcher die Zuordnung der Resonanzen des Spinsystems von vier Aminosäuren zeigt, ist in Abbildung 3-25 dargestellt. Der Ausschnitt zeigt die Zuordnung der Resonanzen für die Aminosäuren D35, R36, G37 sowie E38 (Abbildung 3-25), welche schon in den vorangegangenen Spektren verwendet wurden. Die Darstellung der Resonanzen des Spinsystems der Aminosäure G37 bestätigte weiterhin, dass es sich um ein Glycin handelt. Es konnten nur zwei  $\alpha$ -Protonen identifiziert werden. Nur die Aminosäure Glycin besitzt zwei  $\alpha$ -Protonen. Die Zuordnung der Resonanzen zeigte, dass für das Spinsystem der Aminosäure D35  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Protonen zugeordnet werden konnten. Die Zuordnung des Spinsystems zeigte für die Aminosäure R36 zusätzlich zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Protonen noch zwei  $\gamma$ -Protonen. Für die Aminosäure E38 konnte ebenfalls ein  $\gamma$ -Proton identifiziert werden. Die Identität der Aminosäuren war schon aus der sequenziellen Zuordnung bekannt. Sie konnte mit diesem Spektrum bestätigt werden.



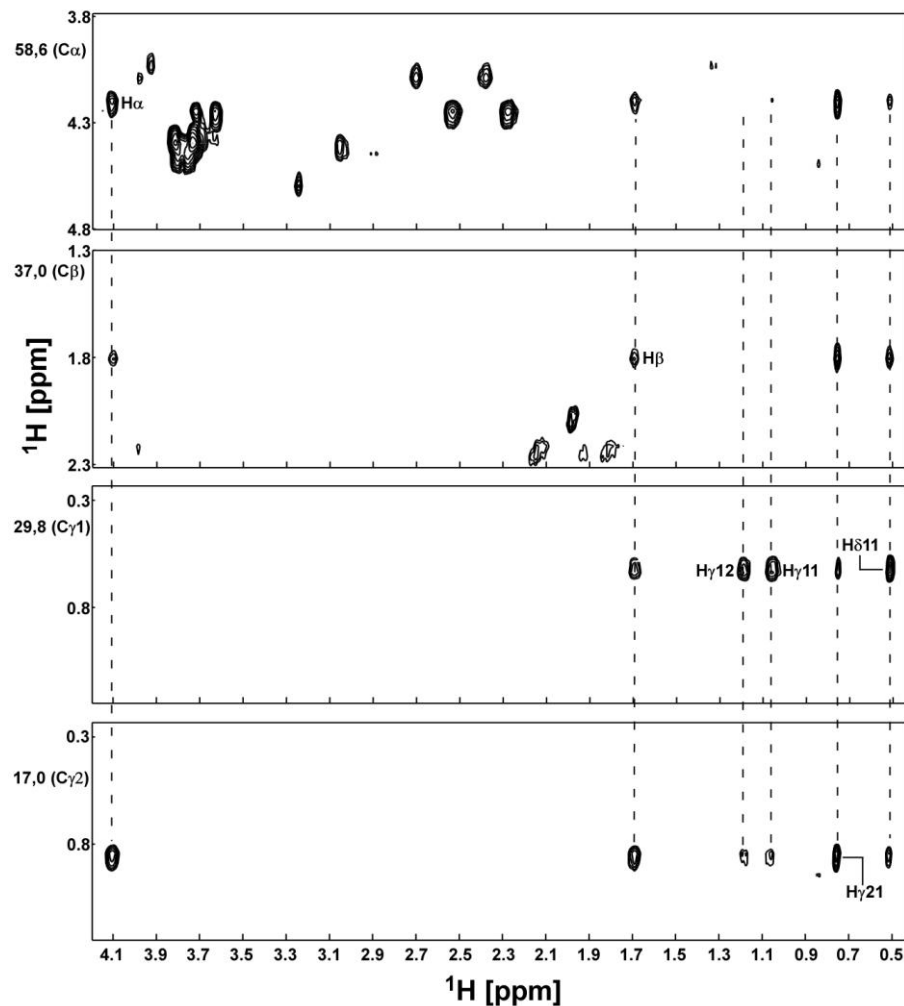
**Abb. 3-25: Darstellung der Resonanzen von Protonen der Seitenketten der Aminosäuren D35, R36, G37 und E38 im  $^{15}\text{N}$ -editierten TOCSY-Spektrum.** Die Darstellung zeigt die Spinsysteme vier sequenziell benachbarter Aminosäuren. Die Position der Aminosäuren in der Primärsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code und der Position oberhalb der Rechtecke angegeben. Die  $^{15}\text{N}$ -Frequenz ist in eckigen Klammern angegeben.

Anhand des  $^{13}\text{C}$ -editierten 3D-TOCSY-Spektrums konnten die chemischen Verschiebungen von Protonen identifiziert werden, deren Frequenzen in einem 2D-Spektrum überlagert sind. In Abbildung 3-26 wird die Zuordnung am Beispiel der Aminosäure I60 dargestellt.

Mit Hilfe der aus den anderen Spektren bekannten chemischen Verschiebungen des  $\alpha$ -,  $\beta$ - sowie  $\gamma$ -Protons konnten die Frequenzen der Kohlenstoffatome zugeordnet

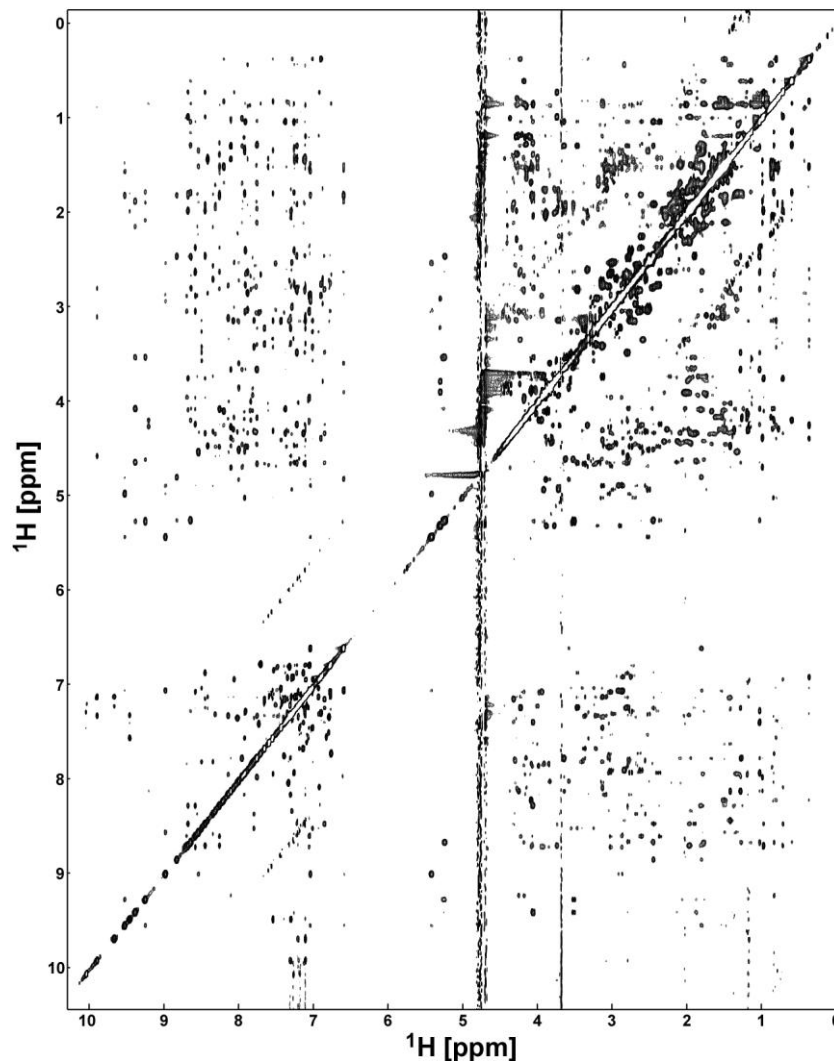
werden. Zusätzlich dazu konnten noch die chemischen Verschiebungen für die fehlenden Protonen identifiziert werden. Auf Grund der Überlagerung der Frequenzen der  $\beta$ -, der  $\gamma_2$ - sowie der  $\delta_1$ -Kohlenstoffatome, konnten nur das  $\beta$ - und das  $\gamma_2$ -Kohlenstoffatom identifiziert werden.

Auf den einzelnen Kohlenstofffrequenzen kann man die Korrelation der chemischen Verschiebungen einzelner Protonen zu einem Kohlenstoffatom erkennen. So konnten auf der Frequenz des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms die Resonanzen für das  $\alpha$ -, das  $\beta$ , das  $\gamma_{21}$  sowie das  $\delta_{11}$ -Proton identifiziert werden. Auf der Frequenz des  $\delta_1$ -Kohlenstoffatoms wurde keine Resonanz für das  $\alpha$ -Proton identifiziert, für die anderen Protonen konnte jeweils eine Resonanz zugeordnet werden.



**Abb. 3-26: Darstellung der Protonenresonanzen aus der Seitenkette der Aminosäure Isoleucin 60 im  $^{13}\text{C}$ -editierten TOCSY-Spektrum.** Die Darstellung zeigt das Spinsystem der Aminosäure I60 auf den einzelnen Kohlenstofffrequenzen. Die Kohlenstofffrequenzen und das Kohlenstoffatom (in Klammern) sind auf der linken Seite der Rechtecke angegeben. Die gestrichelten Linien markieren die Protonen auf den einzelnen Kohlenstofffrequenzen.

Als Grundlage für die Zuordnung interresidualer Resonanzen wurden NOESY-Experimente verwendet. Wie bereits erwähnt, können im NOESY-Spektrum sowohl intra- als auch interresiduale Kreuzsignale identifiziert werden. Daher sind im zweidimensionalen, homonuklearen NOESY-Spektrum (Abbildung 3-27) deutlich mehr Signale als im homonuklearen, zweidimensionalen TOCSY-Spektrum (Abbildung 3-24) zu erkennen.

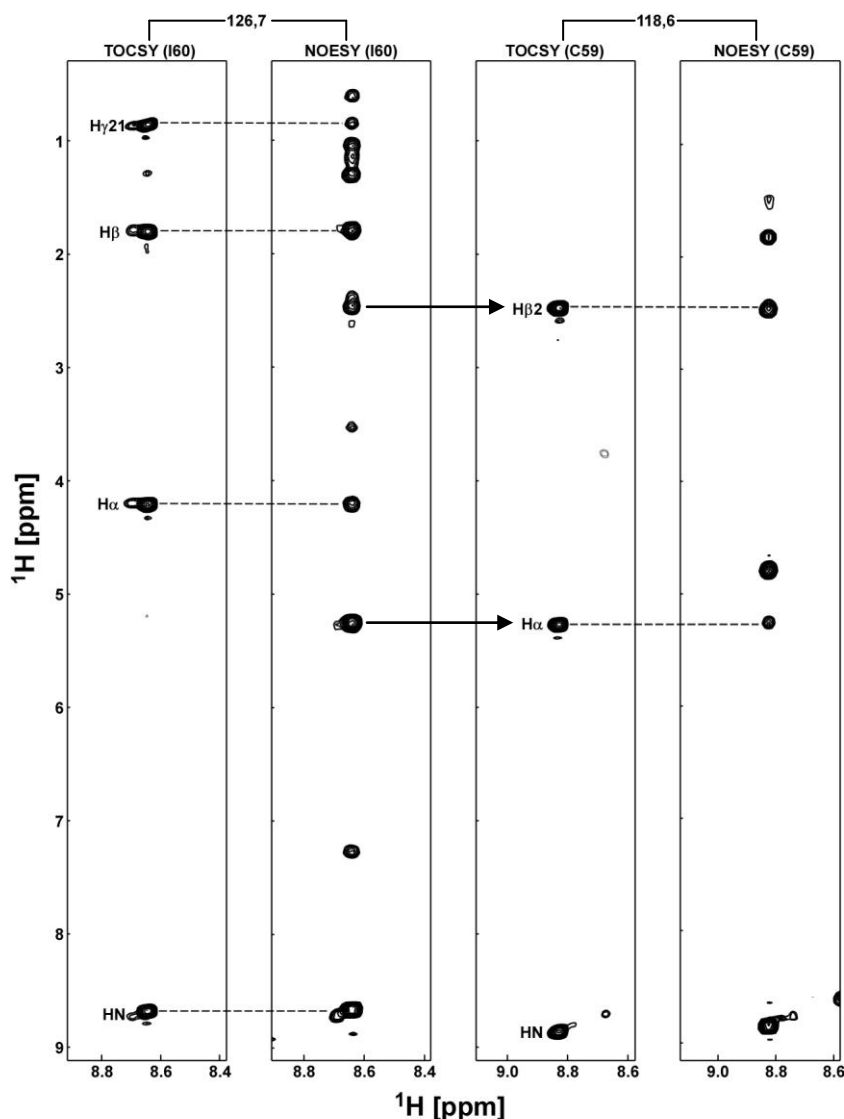


**Abb. 3-27: Zweidimensionales, homonukleares NOESY-Spektrum von Theromacin.** Aufgenommen mit einer Mischzeit von 200 ms.

Bei der Zuordnung der interresidualen Kontakte im zweidimensionalen, homonuklearen NOESY-Spektrum konnten Überlagerungen, welche durch ähnliche Resonanzen unterschiedlicher Protonen entstehen, festgestellt werden. Daher erfolgte eine weitere Zuordnung im dreidimensionalen,  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektrum. Die Unterscheidung von inter- und intraresidualen Signalen wird in Abbildung 3-28 beispielhaft an den beiden Aminosäuren C59 und I60 dargestellt. Im dreidimensionalen,  $^{13}\text{C}$ -editierten NOESY-Spektrum konnte so ebenfalls eine Unterscheidung von intra- und interresidualen Resonanzen vorgenommen werden (Daten nicht gezeigt).

Für die Aminosäuren C59 und I60 konnten so zahlreiche interresiduale Resonanzen identifiziert werden (Abbildung 3-28). Dies führte zur Identifikation von Kreuzsignalen

des  $H_{\alpha}$ - und des  $H_{\beta 2}$ -Protons der Aminosäure C59 auf der Stickstofffrequenz der Aminosäure I60.



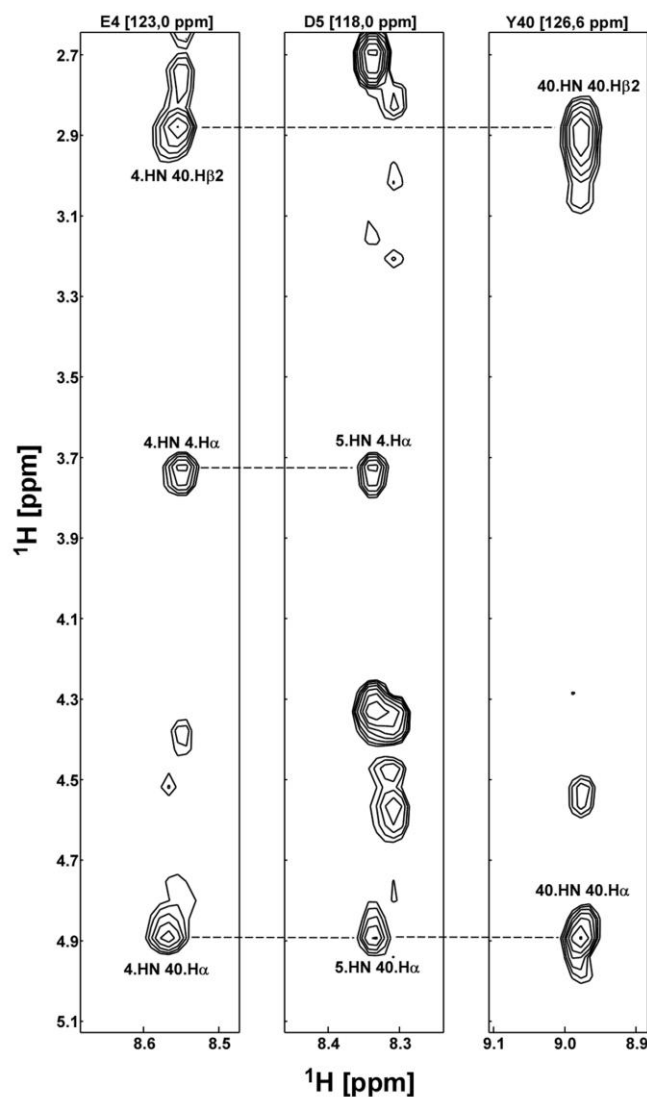
**Abb. 3-28: Darstellung von intra- und interresidualen NOE-Signalen bei den Aminosäuren I60 und C59.** In den vier Rechtecken sind die Resonanzen aus einem Ausschnitt des  $^{15}N$ -editierten 3D-TOCSY-beziehungsweise des  $^{15}N$ -editierten 3D-NOESY-Spektrums dargestellt. Der Name und die sequentielle Position der Aminosäure sind oberhalb der Rechtecke angegeben. Die Positionen der Resonanzen aus dem Spinsystem der jeweiligen Aminosäure sind mit gestrichelten Linien sowohl im  $^{15}N$ -editierten 3D-Tocsy- als auch im  $^{15}N$ -editierten 3D-Noesy-Spektrum markiert. Die Pfeile kennzeichnen Kontakte zwischen den beiden Aminosäuren.

Nach der Zuordnung intra- sowie interresidualer Resonanzen, konnten strukturelevante Resonanzen zugeordnet werden. Diese Zuordnung erfolgte mit



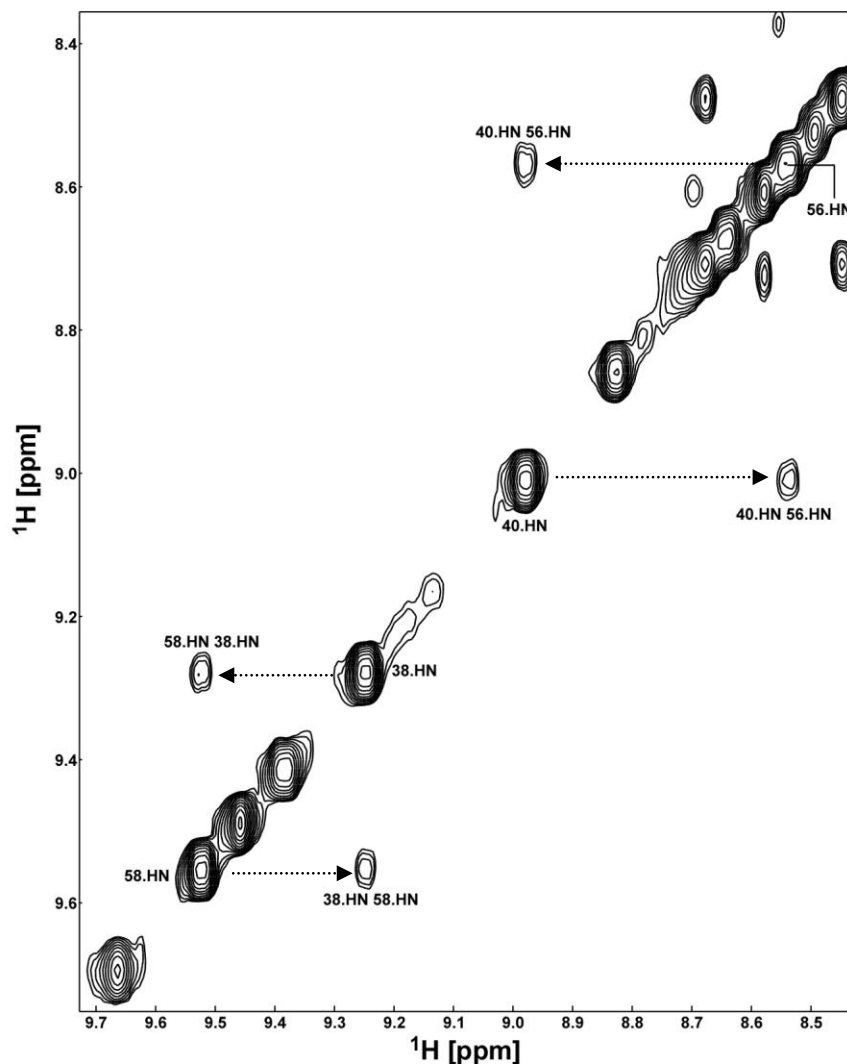
Hilfe der NOESY-Spektren. So können in einem  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektrum Kreuzsignale zwischen dem Amidproton einer Aminosäure und den Protonen der Aminosäurereste oder dem Amidproton einer anderen Aminosäure identifiziert werden.

Im dreidimensionalen  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektrum konnten interresiduale Kontakte zwischen den Aminosäuren E4, D5 und Y40 identifiziert werden (Abbildung 3-29). So entsteht ein Kontakt zwischen dem Amidproton der Aminosäure D5 und dem  $\alpha$ -Proton der Aminosäure E4. Das Kreuzsignal zwischen dem Amidproton der Aminosäure E4 und dem  $\alpha$ - sowie  $\beta$ -Proton der Aminosäure Y40 stellt ein strukturelevantes Kreuzsignal dar. Im Weiteren konnte ein *long range* NOE-Signal zwischen dem Amidproton der Aminosäure D5 und dem  $\alpha$ -Proton der Aminosäure Y40 identifiziert werden (Abbildung 3-29).



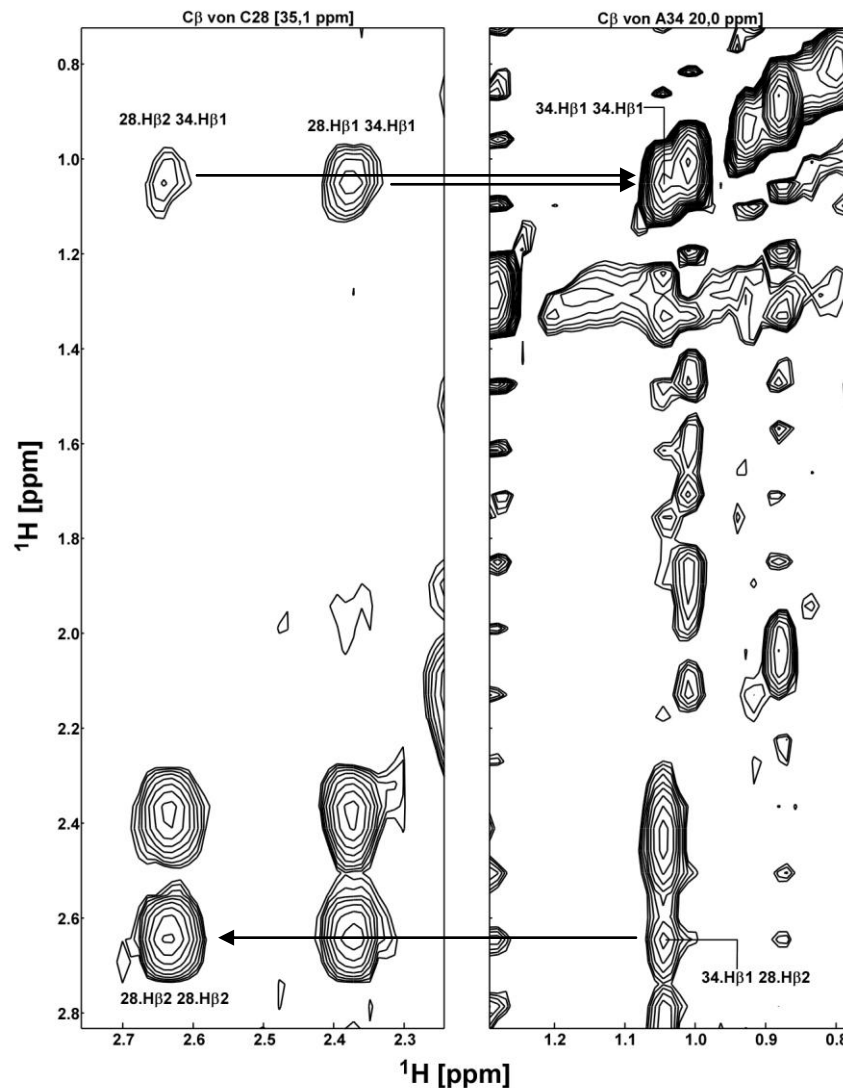
**Abb. 3-29:** Darstellung von interresidualen *long range* NOE-Signalen zwischen den Aminosäuren E4, D5 und Y40 und von sequentiellen NOE-Signalen zwischen den Aminosäuren E4 und D5 im  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektrum. Die Darstellung zeigt die Beziehung zwischen den Resonanzen der Aminosäuren E4, D5 und Y40. Die Position der Aminosäuren in der Primärsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code und der Position oberhalb der Rechtecke angegeben. Die  $^{15}\text{N}$ -Frequenz ist in eckigen Klammern angegeben. Die gestrichelten Linien kennzeichnen Kontakte zwischen den beiden Aminosäuren.

In einem 2D-NOESY-Spektrum können neben den Kontakten, welche auch im  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektrum identifiziert werden können, auch Kontakte zwischen den Protonen der Spinsysteme zweier Aminosäuren nachgewiesen werden. In Abbildung 3-30 sind Kreuzsignale zwischen den Amidprotonen der Aminosäure Y40 und Q56 sowie E38 und R58 dargestellt. Diese *long range* Kontakte sind strukturell relevante Signale.



**Abb. 3-30: Darstellung von *long range* NOE-Signalen zwischen den Aminosäuren E38 und R58 sowie zwischen den Aminosäuren Y40 und N56.** Die Darstellung zeigt die Beziehung zwischen den Amidprotonen der Aminosäuren E38 und R58 sowie Y40 und N56. Die Pfeile kennzeichnen Kontakte zwischen den beiden Aminosäuren.

*Long range* NOE-Signale zwischen Protonen der Aminosäureseitenketten können im dreidimensionalen,  $^{13}\text{C}$ -editierte NOESY-Spektrum identifiziert werden. Zusammen mit den strukturelevanten Kreuzsignalen aus dem 2D-NOESY-Spektrum und dem  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektrum geben sie Aufschluss über die Konformation des Proteins. In Abbildung 3-31 sind beispielhaft Kontakte zwischen den  $\beta$ -Protonen der Aminosäuren C38 und A34 dargestellt.



**Abb. 3-31: Darstellung eines interresidualen *long range* NOE-Signals zwischen den Aminosäuren C28 und A34 im  $^{13}\text{C}$ -editierten NOESY-Spektrum.** Die Darstellung zeigt die Beziehung zwischen den Resonanzen der  $\beta$ -Protonen der Aminosäuren C28 und A34. Die Position der Aminosäuren in der Primärsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code und der Position oberhalb der Rechtecke angegeben. Die Frequenzen des  $\beta$ -Kohlenstoffatoms sind in eckigen Klammern angegeben.

### 3.2.3 Die Disulfidverbindungen von Theromacin

Mit Hilfe der Strukturberechnungen konnten keine Disulfidbrücken einwandfrei identifiziert werden. Auf Grund ihrer räumlichen Position zueinander und der etwas abgeschiedenen Position in Bezug zu den anderen Cysteinen konnte angenommen werden, dass die Cysteine 2 und 73 sowie 31 und 47 je eine Disulfidbrücke bilden. Die Sulfhydrylgruppen der verbleibenden sechs Cysteine liegen sehr nahe beieinander. Um die korrekte Verknüpfung dieser Cysteine zu bestimmen, wurden unterschiedliche Kombinationen mit Rücksicht auf die Position der Cysteine im Molekül für die Strukturberechnung als Abstandsvorgabe benutzt. Im Weiteren wurde eine Cysteinverknüpfung berücksichtigt, die von Tasiemski *et al.* (2004) mittels proteolytischer Spaltung unter Verwendung der Endopeptidasen Lys-C und Glu-C postuliert wurde. Um die genaue Konformation zu identifizieren, wurden die Ensembles anhand der r.m.s.d., der Ramachandran-Darstellung und der Anzahl der Strukturabweichungen ausgewertet (Tabelle 3-3). Dabei lieferte die Cysteinverknüpfung C2-C73, C9-C39, C24-C57, C28-C59 und C31-C47 die energetisch günstigste Struktur. Nach 400 Strukturberechnungen lag die r.m.s.d. bei 1,58. Diese Cysteinverknüpfung verursachte 16 Strukturverletzungen größer als 0,5 Å. Weiteren ergab die Ramachandran-Darstellung für diese Cysteinverknüpfung die energetisch günstigste Verteilung der Diederwinkelpaare an. (Tabelle 3-3). Daher wird diese Cysteinverknüpfung favorisiert.

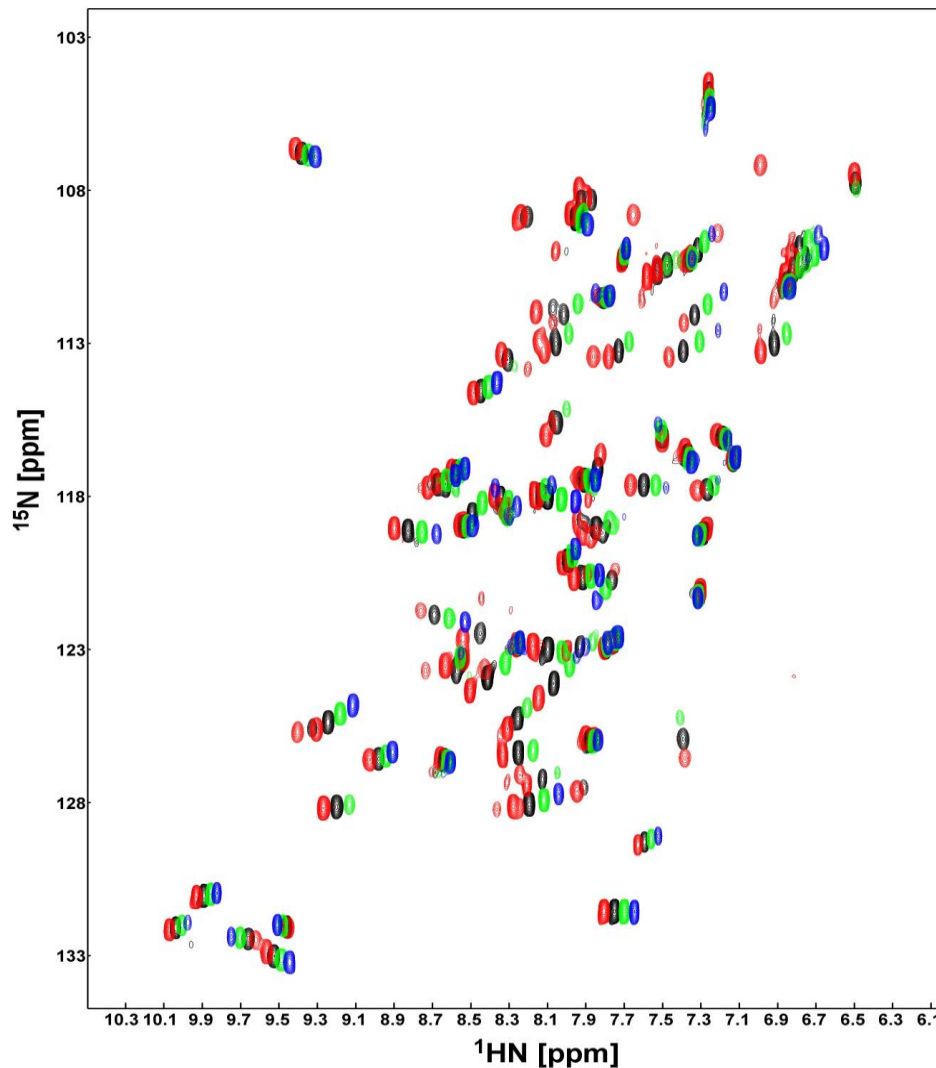
**Tab. 3-3: Cysteinkombinationen als Vorgaben für die Strukturberechnung von Theromacin.**

Nr.	Cysteinverbrückung	r.m.s.d.*	Fehler > 0,5 Å	Ramachandran-Plot <sup>§</sup>
1	Ohne Vorgabe	1,69 +/- 0,24	0	51,4/33,7/12,7/2,2
2	C2-C73/C9-C39/C24-C57/C28-C59/C31-C47	1,58 +/- 0,25	16	50,0/37,9/9,1/3,0
3	C2-C9/C24-C28/C31-C73/C39-C47/C57-C59	3,57 +/- 1,76	43	44,3/38,6/13,1/3,9
4	C2-C73/C31-C47/C9-C57/C24-C39/C28-C59	1,80 +/- 0,33	16	44,2/39,6/13,6/2,6
5	C2-C73/C31-C47/C9-C39/C24-C59/C28-C57	1,79 +/- 0,34	16	47,4/34,3/15,2/3,1
6	C2-C73/C31-C47/C39-C57/C28-C59/C24-C9	1,77 +/- 0,44	22	44,6/37,3/13,9/4,1
7	C2-C73/C31-C47/C9-C39/C24-C28/C57-C59	1,86 +/- 0,29	23	45,2/38,3/14,2/2,3
8	C2-C73/C31-C47/C39-C57/C9-C59/C24-C28	2,09 +/- 0,53	30	44,1/36,4/15,2/2,4
9	C2-C73/C31-C47/C39-C59/C24-C28/C9-C57	1,81 +/- 0,36	28	43,7/38,1/15,5/2,7

\* r.m.s.d. = *root mean square deviation*, <sup>§</sup> Ramachandran-Darstellung für 20 Konformere in der Reihenfolge am meisten begünstigte/zusätzlich erlaubte/generell erlaubte/verbotene Bereiche der Torsionswinkel in % (Abbildung 3-34).

### 3.2.4 Die Tertiärstruktur von Theromacin

Für die Identifizierung von Aminosäuren, die in Sekundärstrukturelemente liegen, wurde 2D-<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektren vom doppelt-markierten Theromacin bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen. Abbildung 3-32 zeigt eine Überlagerung dieser Spektren. Eine Änderung der chemischen Verschiebung der Aminosäurereste gibt Aufschluss darüber, ob eine Aminosäure in einem Sekundärstrukturelement oder einem flexiblen Bereich liegt. Eine geringe chemische Verschiebung deutet darauf hin, dass diese Aminosäure in einem Sekundärstrukturelement liegt und somit weniger flexibel ist. Dies kommt durch Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren zustande.

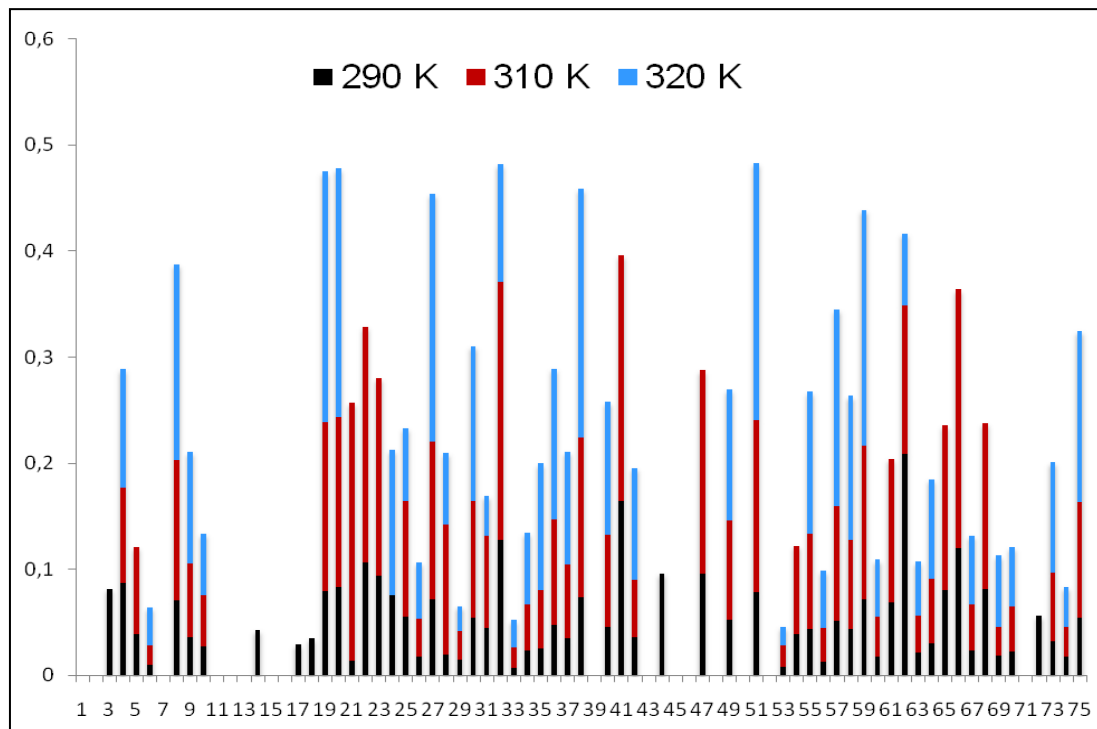


**Abb. 3-32: Übereinandergelagerte 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren von Theromacin bei unterschiedlichen Temperaturen.** Die 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren bei 290 K (rot), 300 K (schwarz), 310 K (grün) und 320 K (blau) wurden übereinander gelagert.

Mit Hilfe des zugeordneten 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums bei einer Temperatur von 300 K wurden die Änderungen der chemischen Verschiebungen bei unterschiedlichen Temperaturen berechnet (Abbildung 3-33). Hierbei kann man erkennen, dass nur wenige Aminosäuren eine sehr geringe chemische Verschiebung aufweisen. Für Aminosäuren D5, S10, S26, K29, K33, N53, Q56, I60, R63, D67, R69, N70 sowie W74 ließen sich nur sehr geringe chemische Verschiebungen berechnen. Dies deutet daraufhin, dass diese Aminosäuren in Sekundärstrukturelementen liegen und vermutlich eine Wasserstoffbrücke ausbilden. Für die Aminosäuren R8, V19, L20, Y27, V30, E38, L51, C59 sowie A62 konnte

dagegen eine sehr große chemische Verschiebung berechnet werden. Dies deutet daraufhin, dass diese Aminosäuren in flexiblen Bereichen liegen.

Für die Aminosäuren C24, D25, S26, C28, K29 und V31 ist bereits aus den Strukturberechnungen bekannt, dass sie eine  $\alpha$ -Helix bilden. Aus den überlagerten  $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren kann man erkennen, dass diese Aminosäuren relativ geringe chemische Verschiebung aufweisen.



**Abb. 3-33: Darstellung der Änderung der chemischen Verschiebungen bei unterschiedlichen Temperaturen.** Auf Basis des zugeordneten  $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums bei 300 K (3-18) wurden die Änderungen der chemischen Verschiebungen bei den Temperaturen 290 K (schwarz), 310 K (rot) und 320 K (blau) aus den jeweiligen  $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren errechnet. Aminosäuren ohne Balken konnten im  $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum nicht zugeordnet werden.

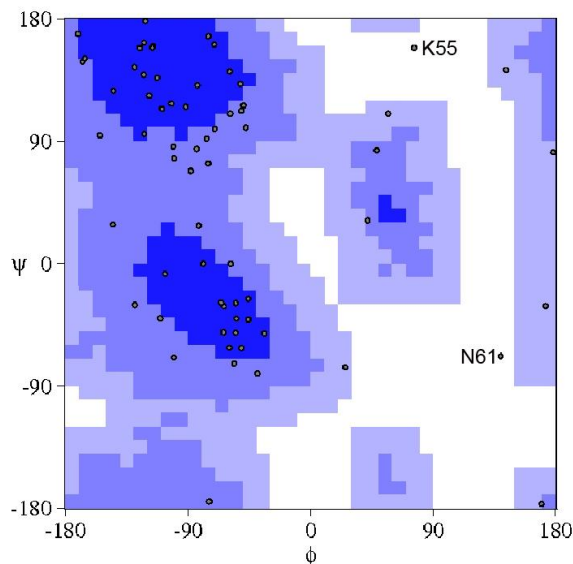
Für die Strukturberechnungen mit dem Programm CYANA (Güntert, 2004) wurden 574 Atomabstände verwendet (Tabelle 3-4). Im Weiteren wurden die mit dem Programm TALOS (Shen et al., 2009) statistisch ermittelten Diederwinkelpaare verwendet. Die 20 Strukturen mit der geringsten Zielfunktion wurden ausgewählt und zur Berechnung einer mittleren Struktur von Theromacin benutzt. Ebenfalls in Tabelle 3-4 dargestellt, ist die Analyse der Diederwinkelpaare des Proteinerückgrats der mittleren Struktur von Theromacin nach Ramachandran (Software – *NMRView5.2.2*).

**Tab. 3-4: Strukturelle Statistik der 20 energieärmsten Konformere von Theromacin.** r.m.s.d. = root mean square deviation.

<b>Abstandsvorgaben</b>	
Intraresidual ( $i-j = 0$ )	220
Sequentiell ( $ i-j  = 1$ )	153
Medium-range ( $2 \leq  i-j  \leq 4$ )	58
Long-range ( $ i-j  \geq 5$ )	99
Disulfidbrücken	30
Wasserstoffbrücken	14
Insgesamt	574
<b>Paarweise r.m.s.d.</b>	
Mittlere r.m.s.d. des Rückgrats	1,58 +/- 0,25
Mittlere r.m.s.d. der schweren Atome	2,41 +/- 0,23
<b>Paarweise r.m.s.d. für die Sekundärstrukturelemente</b>	
Mittlere r.m.s.d. des Rückgrats	0,62 +/- 0,23
Mittlere r.m.s.d. der schweren Atome	1,51 +/- 0,29
<b>Ramachandran-Diagramm für die mittlere Struktur</b>	
Meistbegünstigte Bereiche (%)	50,0
Zusätzliche erlaubte Bereiche (%)	37,9
Allgemein erlaubte Bereiche (%)	9,1
Nicht erlaubte Bereiche (%)	3,0

In Abbildung 3-34 sind die Diederwinkelpaare des Proteinrückgrats der mittleren Struktur von Theromacin im Ramachandran-Diagramm dargestellt. In den meistbegünstigten Bereichen sind 50,0 %, in den zusätzlich erlaubten 37,9 % und in den allgemein erlaubten Bereichen 9,1 % der Torsionswinkel enthalten. In den nicht erlaubten Bereichen liegen 3,0 %. Diese stellen zwei Aminosäurereste von Theromacin (K55 und I61) dar.



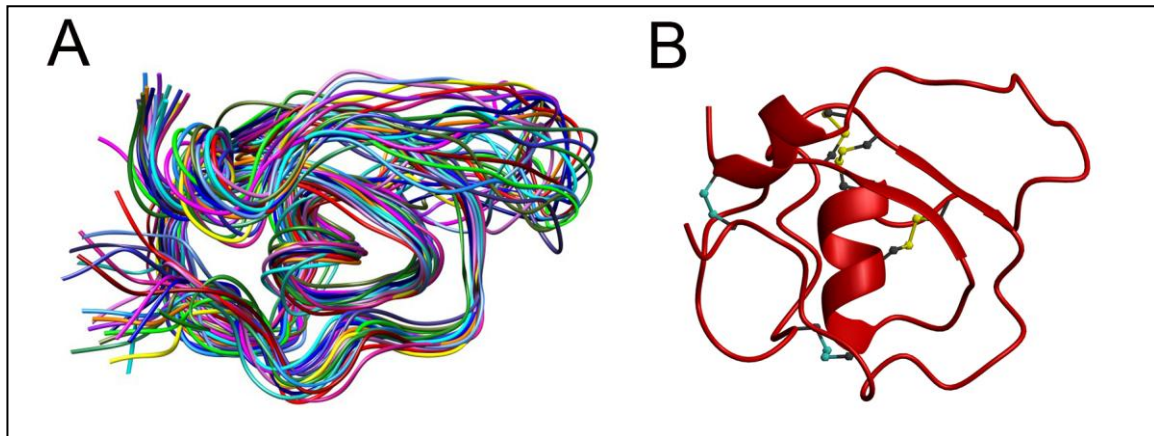


**Abb. 3-34: Darstellung der Verteilung der Torsionswinkel der mittleren Struktur von Theromacin in einem Ramachandran-Diagramm.** Die statistische Verteilung der Diederwinkelpaare des Proteinrückgrats entspricht den Angaben in Tabelle 3-4. Zwei Aminosäurereste, K55 und N61, sind in nicht erlaubten Bereichen lokalisiert.

In Abbildung 3-35A ist das Ensemble der 20 Strukturen mit der geringsten Zielfunktion dargestellt. Die Strukturen weichen in zwei Bereichen, dem C-Terminus und der Schleife zwischen den beiden Helices, stark voneinander ab. Dies weist auf flexible Bereiche innerhalb des Moleküls hin.

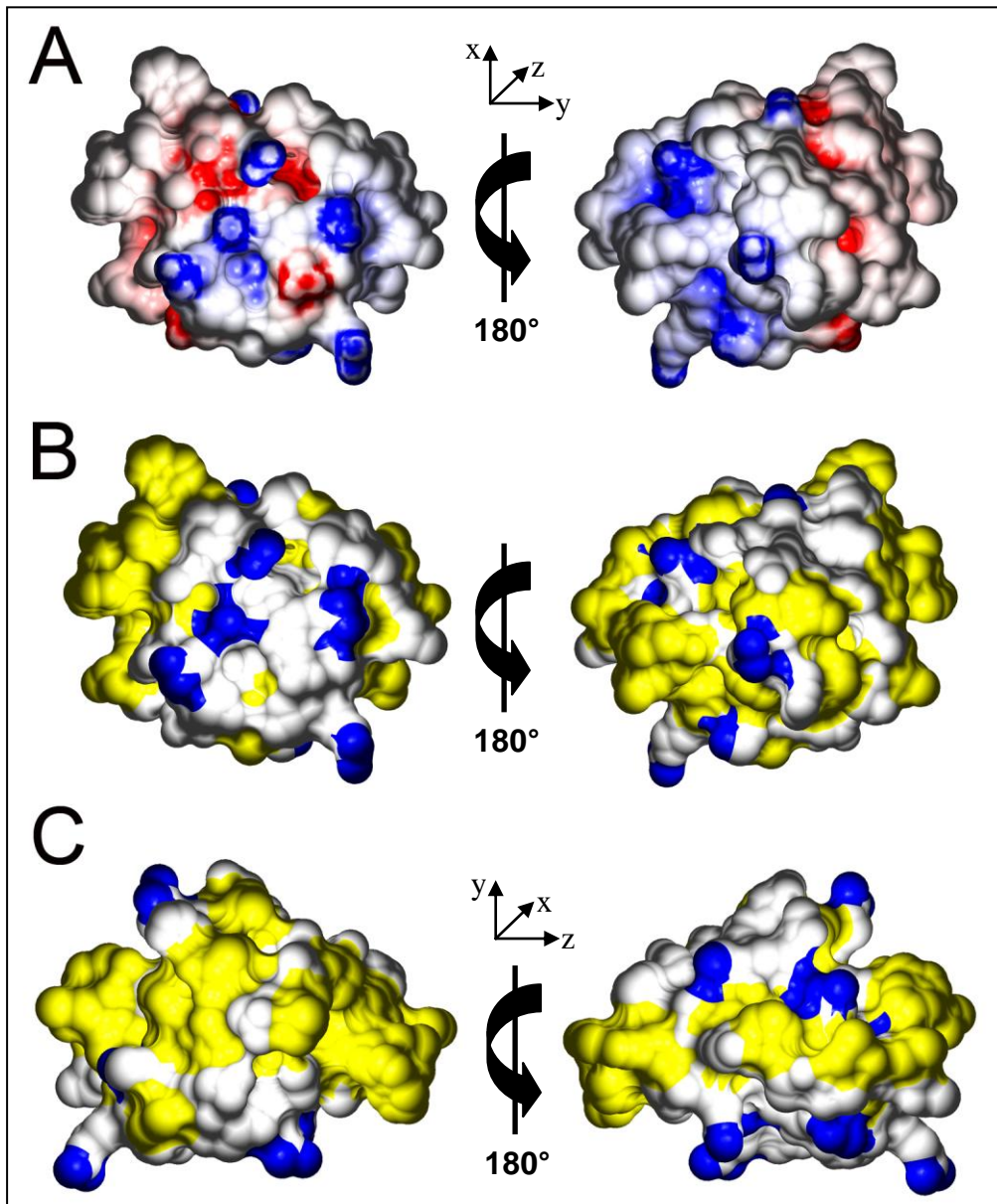
Aus den 20 Strukturen mit der geringsten Zielfunktion konnte eine mittlere Struktur von Theromacin berechnet werden. Diese wurde im Anschluss noch energieminiert. Eine Darstellung der mittleren Struktur ist in Abbildung 3-35B zu sehen. N-Terminal ist eine  $\alpha$ -Helix zu erkennen, welche durch eine große Schleife mit einer zweiten  $\alpha$ -Helix verbunden ist. An die zweite  $\alpha$ -Helix schließt sich ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt an. Die beiden Stränge des  $\beta$ -Faltblattes sind durch eine große Schleife voneinander getrennt. Der C-Terminus wird aus *random coil* Strukturelementen gebildet.

Das Peptid wird durch 10 Cysteine stabilisiert, welche fünf Disulfidbrücken bilden. Vier der Cysteinverbindungen sind um die zentral gelegene zweite  $\alpha$ -Helix gruppiert. Dabei verbinden zwei Cysteinbrücken die  $\alpha$ -Helix mit dem zweiten Strang des  $\beta$ -Faltblattes. Eine weitere Cysteinverbrückung verbindet die  $\alpha$ -Helix mit dem großen Loop zwischen den beiden  $\beta$ -Faltblattsträngen. Im Weiteren wird die erste  $\alpha$ -Helix durch eine Cysteinverbrückung mit dem ersten  $\beta$ -Faltblattstrang verbunden. Die fünfte Cysteinverbindung verbindet den N- mit dem C-Terminus.



**Abb. 3-35: Die Tertiärstruktur von Theromacin.** A) Spaghetti-Darstellung des Ensembles der 20 energieärmsten Strukturen. B) Darstellung der mittleren energieminierten Struktur von Theromacin als *Ribbon*-Modell. Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt. N und C bezeichnen N- und C-Terminus.

Mit der mittleren, energieminierten Struktur von Theromacin konnte das elektrostatische Oberflächenladungspotential (Abbildung 3-36) berechnet werden. Bei der Betrachtung dieses erkennt man, dass es eine ungleichmäßige Verteilung an kationischen und anionischen Aminosäuren auf der einen Seite, aber eine zweigeteilte auf der anderen Seite gibt (Abbildung 3-36A). Das Oberflächenladungspotentials besteht hauptsächlich aus ungeladenen Aminosäuren. In der Darstellung der hydrophoben Bereiche der Oberfläche von Theromacin besteht die eine Seite aus hauptsächlich positiv geladenen Bereichen, die nur an den Rändern hydrophobe Areale aufweisen. Dreht man das Molekül um 180°, dann kann man erkennen, dass die positiven und hydrophoben Areale ungleichmäßig verteilt sind (Abbildung 3-36B). Sieht man sich die beiden Darstellungen von oben an, so erkennt man eine Zweiteilung des Moleküls. Die eine Seite besteht hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren. Dagegen kann man, wenn man das Peptid um 180° dreht, einen Ring aus hydrophoben Aminosäuren erkennen. Dieser Ring wird zusätzlich von beiden Seiten von kationischen und ungeladenen Aminosäuren begrenzt (Abbildung 3-36C).



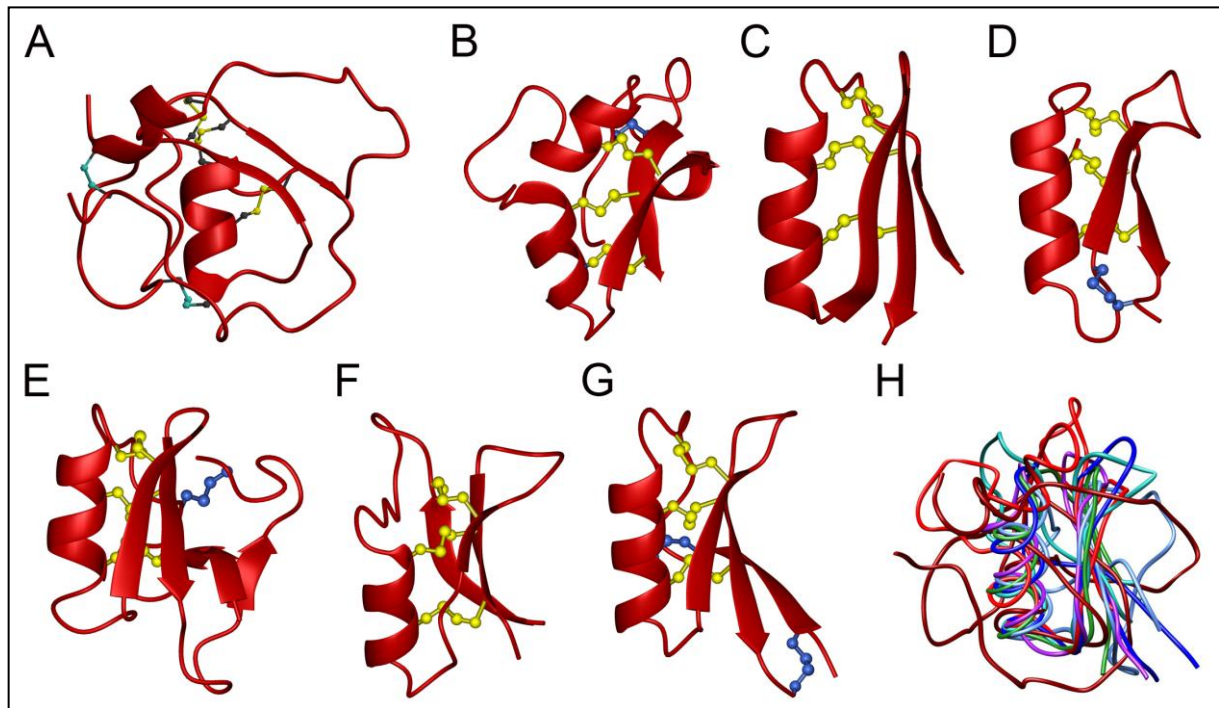
**Abb. 3-36: Darstellung der molekularen Oberfläche von Theromacin.** A) elektrostatisches Oberflächenladungspotential mit kationischen (blau) und anionischen (rot) Arealen. B) Verteilung von kationischen (blau) und hydrophoben (gelb) Arealen an der Oberfläche von Theromacin. C) Aufsicht auf die Darstellungen in B). Weiße Areale sind ungeladen.

### 3.2.5 Vergleich der Tertiärstruktur von Theromacin mit Vertretern der Skorpion-Toxin-ähnlichen Proteinsuperfamilie

Theromacin besitzt partielle Sequenzidentität zu Hydramacin, einem Vertreter der Skorpion-Toxin-ähnlichen Proteinsuperfamilie. Die mittlere Struktur von Theromacin ermöglichte einen Vergleich mit den in der SCOP-Datenbank enthaltenen Strukturen. Dieser Vergleich zeigte, dass Theromacin auch eindeutige strukturelle Analogien zu den Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptiden besitzt.

Die Superfamilie der Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptide zeichnet sich durch eine Knottin-Faltungstopologie aus. Diese besteht aus einem Disulfidbrücken-stabilisierten  $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Faltblatt-( $CS_{\alpha/\beta}$ )-Strukturmotiv (Abbildung 3-37). Es wird dadurch gekennzeichnet, dass sich die Disulfidbrücken leiterartig im Kern der Moleküle anordnen. Dabei stabilisieren zwei Disulfidbrücken die Verbindung zwischen einer  $\alpha$ -Helix und einem Strang des antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts. Die dritte Disulfidbrücke verbindet dagegen den zweiten Strang des antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts mit der N-terminal gelegenen zweiten  $\alpha$ -Helix. Die Superfamilie der Skorpion-Toxin-ähnlichen Proteine wird nach SCOP (*Structural Classification of Proteins* (Murzin et al., 1995)) in die Klasse der kleinen Proteine eingeordnet.

Der Vergleich der Tertiärstrukturen von Theromacin mit denen der Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptide zeigt deutlich das  $CS_{\alpha/\beta}$ -Strukturmotiv (Abbildung 3-37). Es sind aber auch strukturelle Unterschiede zu erkennen. Theromacin besitzt, ebenso wie Hydramacin-1 (Abbildung 3-37B) und das MGD1-Defensin (Abbildung 3-37D), nur zwei  $\beta$ -Faltblattstränge. Die meisten anderen Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptide weisen mindestens ein drei-strängiges  $\beta$ -Faltblatt auf. Zusätzlich dazu besitzt Theromacin eine weitere, N-terminal gelegene  $\alpha$ -Helix. Diese kommt nur noch in der Tertiärstruktur von Hydramacin-1 vor. Die  $\alpha$ -Helix von Theromacin liegt dabei weiter N-Terminal und ist von links nach rechts gewunden, die von Hydramacin-1 ist von rechts nach links gewunden. Ein weiterer Unterschied sind die großen Schleifen zwischen den beiden  $\alpha$ -Helices beziehungsweise den beiden Strängen des  $\beta$ -Faltblatts. Diese kommen nur bei Theromacin in dieser Ausprägung vor, in allen anderen Molekülen sind die Schleifen deutlich kleiner.

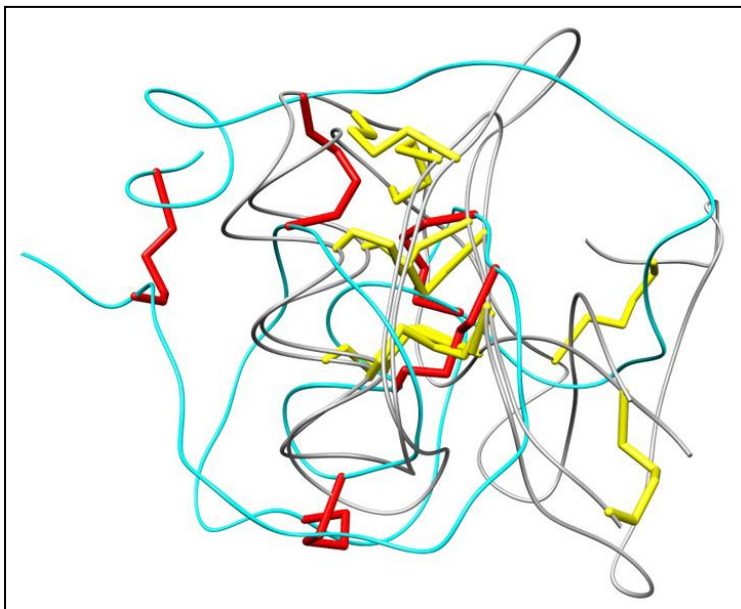


**Abb. 3-37: Vergleich der Strukturen von Theromacin und repräsentativen Mitgliedern der Familien der Skorpion-Toxin-ähnlichen Superfamilie.** *Ribbon-Modell* von A) Theromacin, B) Hydramacin (*Hydra vulgaris*, pdb-Code: 2K35), C) OSK1-Toxin (*Orthochirus scrobiculosus*, pdb-Code: 1SCO) D) MGD1 (*Mytilus galloprovincialis*, pdb-Code: 1FJN), E) Neurotoxin CsE-v5 (*Centruroides sculpturatus*, pdb-Code: 1NH5), F) Heliomicin (*Heliothis virescens*, pdb-Code: 1I2V), G) PhD1 (*Petunia hybrida*, pdb-Code: 1N4N) und H) Überlagerung aller Strukturen. Konservierte Cysteinverbindungen sind in gelb, zusätzliche in blau dargestellt.



Die Analyse der Cysteinbrücken zeigte, dass die sechs zum  $CS\alpha/\beta$ -Strukturmotiv gehörenden Cysteine von Theromacin im Vergleich zu den Mitgliedern der Skorpion-Toxin-ähnlichen Superfamilie eine verschobene räumliche Position aufweisen. Dabei ist besonders die Position der ersten Cysteinbrücke verschoben (Abbildung 3-38). Sie befindet sich weiter links im  $CS\alpha/\beta$ -Motiv als die vergleichbare Cysteinbrücke der Mitglieder der Skorpion-Toxin-ähnliche Proteinsuperfamilie. Im Weiteren weist die zweite Cysteinbrücke, welche die  $\alpha$ -Helix mit einem Strang des  $\beta$ -Faltblattes verbindet, eine leicht verschobene räumliche Position auf.

Im Weiteren weicht die vierte Cysteinbrücke, welche die zweite  $\alpha$ -Helix mit der großen Schleife zwischen den Strängen des  $\beta$ -Faltblatts verbindet, von den Positionen der nicht konservierten Cysteinbrücken der anderen Peptide ab. Die fünfte Cysteinbrücke, welche die beiden Termini miteinander verbindet, zeigt die gleiche Position in der Primärstruktur wie die vierte Cysteinbrücke des Neurotoxins CsE-v5 (Abbildung 3-38E) beziehungsweise die fünfte Cysteinbrücke des Pflanzendefensins Phd1 (3-38G). In der Tertiärstruktur sind die Termini der Peptide an unterschiedlichen Stellen.



**Abb. 3-38: Räumliche Lage der Cysteinverbrückungen.** *Ribbon-*Modell der Tertiärstruktur von Theromacin (blau) und der von zwei Vertretern (Phd1, CsE-v5) der Skorpion-Toxin-ähnlichen Proteine (grau). Die Cysteine von Theromacin sind in rot, die der Skorpion-Toxin-ähnlichen in gelb dargestellt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Tertiärstruktur von Alvinellacin

#### 4.1.1 Vergleich der Tertiärstrukturen von Alvinellacin mit denen der Conotoxine

Bei einem Vergleich bekannter Tertiärstrukturen kurzer Peptide mit der von Alvinellacin wurde eine strukturelle Ähnlichkeit zu einem Toxin,  $\omega$ -Conotoxin MVIIIC, aus der Meeresschnecke *Conus magus* festgestellt. Beide Peptide zeigen eine G-förmige Struktur bestehend aus *random coil*-Strukturelementen. Bei einem Vergleich mit weiteren  $\omega$ -Conotoxinen wurden weitere Toxine mit einer G-förmigen Struktur identifiziert.

Die  $\omega$ -Conotoxine gehören zu der Familie der Conotoxine, welche in die Superfamilie der Omega-Toxin-ähnlichen Peptide eingeordnet sind. Diese Superfamilie besteht aus vier Familien: die Spinnentoxine, die Insektentoxine, Albumin 1 sowie das VhV1.1 (PolyDNAvirales Genprodukt). Eine Besonderheit dieser Superfamilie ist der *Cystein Knot* (Abbildung 4-1). Dieser besteht aus drei Cysteinbrücken, die leiterartig im Molekül angeordnet sind. Dabei verbinden sich die Cysteine C1-C4, C2-C5 und C3-C6 zu jeweils einer Cysteinbrücke. Eine Ausnahme dabei bilden die  $\alpha$ -Conotoxine aus der Familie der Conotoxine, welche nur vier Cysteine besitzen. Dabei sind sich die Cysteine C1-C3 und C2-C4 zu je einer Disulfidbrücke verbunden (Arias und Blanton, 2000). Strukturell weisen die  $\alpha$ -Conotoxine keine Analogie zu Alvinellacin auf. Dies gilt, mit Ausnahme der  $\omega$ -Conotoxine, auch für alle anderen Mitglieder der Omega-Toxin-ähnlichen Peptide.

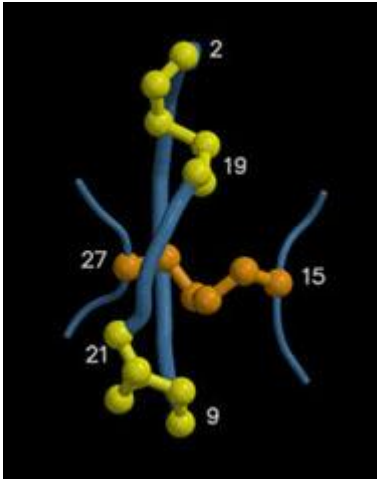


Abb. 4-1: Darstellung der räumlichen Lage der Cysteinverbrückungen in einem *Cystein Knot* (<http://knottin.cbs.cnrs.fr/>). Die Cysteinbrücke zwischen den Cysteinen C3-C6 (orange) kreuzt durch die Cysteinbrücken C1-C4 und C2-C5 (gelb).

Die Cysteinverbrückung von Alvinellacin konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Keine der möglichen Disulfidverbrückungen von Alvinellacin zeigt Ähnlichkeiten zu Disulfidverbrückungen der Conotoxine. Daher wäre eine Einordnung in diese Familie nur über die Tertiärstruktur möglich.

Alvinellacin ist ein porenbildendes antimikrobielles Peptid, welches Prokaryonten tötet. Der porenbildende Wirkmechanismus (*barrel-stave model* oder *toroidal model*) von Alvinellacin ist nicht bekannt. Die Mitglieder der Familie der Conotoxine sind Ionenkanalinhibitoren. Dabei wird der Einstrom beziehungsweise Ausstrom von Ionen gestört. Im Fall des  $\omega$ -Conotoxins MVIIC wird der Calciumstrom durch die Membran der neuronalen Zellkörper gehemmt (Hillyard *et al.*, 1992; Wheeler *et al.*, 1994). Weiterhin ist bekannt, dass es die Ausschüttung von Neurotransmittern von einigen präsynaptischen Nervenenden inhibiert (Lipscombe *et al.*, 1989; Gaur *et al.*, 1994). Auf diese Weise werden die Beutetiere, zum Beispiel kleine Fische, von den Meeresschnecken getötet. Die Conotoxine werden seit vielen Jahren auf ihren therapeutischen Nutzen hin untersucht. Dabei wird besonders die Einsetzbarkeit bei Krankheiten wie chronischen Schmerzen, Epilepsie, kardiovaskulären Krankheiten, Parkinson, Alzheimer und Krebs geprüft (Lovelace *et al.*, 2006).



#### 4.1.2 Vergleich der Tertiärstrukturen von Alvinellacin, Arenicin-1 und Arenicin-2

Alvinellacin weist in der Primärstruktur eine Analogie zu den aus *Arenicola marina* isolierten antimikrobiellen Peptide Arenicin-1 und Arenicin-2 auf.

Bei dem Vergleich der Tertiärstrukturen von Alvinellacin und mit Arenicin-1 und Arenicin-2, wurde gezeigt, dass die Tertiärstrukturen jedoch unterschiedlich sind. Die Tertiärstrukturen der beiden Arenicine weisen ein antiparalleles zweisträngiges  $\beta$ -Faltblatt auf. Diese sind leicht um ihre Achse verdreht. Zwischen den beiden Termini bildet sich eine Disulfidbrücke aus. Alvinellacin dagegen zeigt eine aus *random coil*-Strukturelementen aufgebaute Tertiärstruktur.

In der Primärstruktur abweichend sind unter anderem die beiden zusätzlichen Cysteine C7 und C17 von Alvinellacin. Bei einem Vergleich der Positionen der Brücken in den Molekülen konnte gezeigt werden, dass die bevorzugte Verbrückung C1-C2 und C3-C4 von Alvinellacin keine Analogie zu der Disulfidverbrückung der beiden Arenicine aufweist.

Bei der Vorhersage der Diederwinkelpaare aus den chemischen Verschiebungen mit dem Programm TALOS (Shen *et al.*, 2009) wurde für die Tertiärstruktur von Alvinellacin ein Cystein-stabilisiertes  $\beta$ -Faltblatt vorhergesagt. Dieses entspricht in seiner Ausprägung dem der Arenicine. Die Auswertung der NMR-Spektren zeigte allerdings deutlich, dass strukturell wichtige *long-range* NOE-Signale existieren, die mit einem Cystein-stabilisiertes  $\beta$ -Faltblatt nicht in Einklang zu bringen sind. Dieser strukturelle Unterschied könnte aber einen Hinweis darauf geben, dass Alvinellacin möglicherweise zwei Konformationen, eine G-förmige oder ein  $\beta$ -Faltblatt, annehmen kann. Da Alvinellacin aus dem Tiefseewurm *Alvinella pompejana* isoliert wurde, ist es möglich, dass die Tertiärstruktur von Alvinellacin bei einem Druck von 300 bar und einer Temperatur von 80 °C die  $\beta$ -Faltblatt-Konformation annimmt. Die in dieser Arbeit vorgestellte Tertiärstruktur von Alvinellacin wurde mit Hilfe von NMR-Experimenten aufgeklärt, welche bei Standardbedingungen (1 bar und 25 °C) durchgeführt wurden.

Im Weiteren ist für beide Arenicine bekannt, dass sie Poren bilden beziehungsweise die Membranintegrität stören. Es wird angenommen, dass die beiden antimikrobiellen Peptide entweder über das toroidale Porenmodell oder über das *carpet*-Modell wirken (Ovchinnikova *et al.*, 2007; Andrä *et al.*, 2008). Für Alvinellacin ist der

porenbildende Wirkmechanismus (*toroidal model* oder *barrel-stave model*) noch nicht bekannt.

## 4.2 Die Tertiärstruktur von Theromacin

Die Tertiärstruktur von Theromacin zeigte, dass dieses in die Superfamilie der Skorpion-Toxin-ähnlichen Proteine einzuordnen ist. Theromacin sowie die meisten Skorpion-Toxin-ähnlichen Proteine weisen das Cystein-stabilisierte  $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Faltblatt-Motiv auf. Dieses ist charakterisiert durch zwei Disulfidbrücken, die eine  $\alpha$ -Helix mit einem  $\beta$ -Faltblatt verbinden. Eine dritte Disulfidbrücke verknüpft den zweiten Strang des  $\beta$ -Faltblatts mit dem N-Terminus. Dabei bildet sich ein charakteristischer *Cystein Knot* (Abbildung 4-1) aus. Wie in Abbildung 3-40 gezeigt, weicht die Disulfidverbrückung von Theromacin stark von der räumlichen Position der Cystinen der Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptide ab. Daraus könnte man schließen, dass die Funktionsweise von Theromacin von denen der anderen Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptide abweicht. Dr. Sascha Jung konnte bereits zeigen, dass Theromacin nicht auf die gleiche Weise wirkt wie Hydramacin-1 (mündliche Mitteilung). Bei einem Vergleich der Oberflächeneigenschaften der beiden Peptide, lässt sich erkennen, dass die Verteilungen der hydrophoben und kationischen Areale stark voneinander abweichen.

Im Weiteren sind die bei Theromacin zusätzlich vorkommenden Disulfidbrücken in ihrer Lokalisation nicht mit denen der Skorpion-Toxin-ähnlichen Proteine vergleichbar. Die fünfte Disulfidbrücke (C2-C73) verbindet, wie die fünfte Disulfidverbrückung des Pflanzendefensins PhD1 (Abbildung 3-39G) und die vierte Disulfidverbrückung des Neurotoxins CsE-v5 (Abbildung 3-39E), die beiden Termini. Durch eine Überlagerung der  $CS\alpha/\beta$ -Motive dieser drei Proteine wurde festgestellt, dass die Lokalisation dieser Disulfidbrücke völlig unterschiedlich ist. Bei dem Pflanzendefensin und dem Neurotoxin liegen die beiden Termini in der Nähe des  $\beta$ -Faltblattes des  $CS\alpha/\beta$ -Motivs. Bei Theromacin dagegen liegen sie in der Nähe der  $\alpha$ -Helix des  $CS\alpha/\beta$ -Motivs.

Nur in den Tertiärstrukturen von Theromacin und Hydramacin-1 konnte eine zweite  $\alpha$ -Helix identifiziert werden. Diese zweite  $\alpha$ -Helix weist bei den beiden molekülen

eine andere Lokalisation auf. So liegt die  $\alpha$ -Helix von Theromacin in der Nähe der beiden vom CS $\alpha$ /b-Motiv „abgewandten“ Termini. Die  $\alpha$ -Helix von Hydramacin-1 dagegen ist parallel zum  $\beta$ -Faltblatt des CS $\alpha$ / $\beta$ -Motiv angeordnet. Im Weiteren sind diese beiden AMPs die einzigen Vertreter der Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptide, die große Loops zwischen den Sekundärstrukturelementen aufweisen. Diese Loops sind bei Theromacin deutlich größer als bei Hydramacin. Auf Grund der sequentiellen Ähnlichkeiten als auch in der Tertiärstruktur stellt Theromacin ein weiteres Mitglied der Macin-Familie innerhalb der Skorpion-Toxin-ähnlichen Proteinsuperfamilie dar.

Die Mitglieder dieser Superfamilie vereinen ein breites Funktionsspektrum mit hauptsächlich antimikrobieller Aktivität. Die meisten dieser Peptide sind gegen gram-positive oder gram-negative Bakterien aktiv. Es wurden aber auch Peptide beschrieben, welche eine antimikrobielle Aktivität gegen Pilze haben. Weiterhin ist bekannt, dass die Mitglieder der Familien der langen Skorpiontoxine als auch die der kurzen Skorpiontoxine Ionenkanäle durch Aktivierung oder Inhibition steuern (Cheek *et al.*, 2006, Jablonsky *et al.*, 2001, Bulet *et al.*, 1999). Einen möglichen Hinweis auf die Art des Wirkmechanismus von Theromacin könnten die Eigenschaften der molekularen Oberfläche geben. Bei dieser werden die kationischen Areale von den hydrophoben Arealen flankiert. Dies konnte für eine Reihe von zytolytischen antimikrobiellen Peptiden nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind das Cardiotoxin, das Magainin sowie das Skorpion-Toxin-ähnliche Peptid MGD-1 aus der Muschel *Mytilus galloprovincialis* (Yang *et al.*, 2000).

Wie bereits erwähnt, konnten in dem 2D- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum nicht alle Resonanzen zugeordnet werden. Bei diesen Resonanzen konnte jedoch festgestellt werden, dass sie eine Aminosäurekette mit Kreuzsignalen zueinander bilden. Die zugeordneten Aminosäureidentitäten stimmen mit fünf Aminosäuren des N-Terminus von Theromacin überein. Jedoch konnten keine Kreuzsignale zu den anderen zugeordneten Aminosäuren identifiziert werden.

Da die Disulfidbrücken nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wäre ein Cysteinisomer denkbar. Die Cysteinverbrückungen Nummer zwei und fünf (Tabelle 3-3) kommen dabei in Frage. Die Cystine, welche unterschiedliche Brücken bilden können (für Nummer zwei C24-C57, C28-C59 und für Nummer fünf C24-C59 und C28-C57), befinden sich im Kern des Moleküls. Die nicht zuzuordnenden Resonanzen entsprechen dagegen Aminosäuren auf der Oberfläche des Moleküls.

Zu diesen Aminosäuren zählt auch des Cystein C9. Eine Cysteinbrücke zwischen C9 und C24, C28, C57 oder C59 ist auf Grund der räumlichen Struktur des Moleküls unwahrscheinlich. Ein Disulfidisomer würde daher für die chemischen Verschiebungen dieser Aminosäuren nicht in Frage kommen.

Am wahrscheinlichsten ist eine Verunreinigung mit einem kleinen Peptidfragment von Theromacin.

## 5 Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit konnte die Tertiärstruktur des antimikrobiellen Peptides Alvinellacin aufgeklärt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit mit Alvinellacin sollte die bevorzugte Cysteinverbrückung (C1-C2, C3-C4) verifiziert werden. Dies könnte mit Hilfe eines enzymatischen Verdau mit Endoproteasen und einer anschließenden MALDI-TOF-Analyse erfolgen. Im Weiteren könnte die Tertiärstruktur unter anderen Bedingungen aufgeklärt werden. Dazu könnten NMR-Experimente bei 300 bar und 80 °C durchgeführt werden. Diese Parameter würden den Umweltbedingungen von *Alvinella pompejana* entsprechen und Aufschluss über die Tertiärstruktur unter diesen Bedingungen geben.

Um den Wirkmechanismus von Alvinellacin aufzuklären, wären *Cross-linking*-Experimente zur möglichen Dimerisierung oder Multimerisierung denkbar.

Für *Alvinella pompejana* wurde gezeigt, dass dieser Tiefseewurm eine Symbiose mit Bakterien eingeht. Diese sind auf der dorsalen Oberfläche des Wurmes lokalisiert. Es wäre interessant zu untersuchen, ob bei einem Eindringen dieser Bakterien in den Organismus Alvinellacin aktiviert wird. Dies würde darauf hindeuten, dass Alvinellacin als erste Immunabwehr des Pompejiwurms gegen die symbiontischen Bakterien fungiert.

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Tertiärstruktur von Theromacin aufgeklärt. Da die Funktionsweise nicht bekannt ist, wäre es sinnvoll, unterschiedliche Wirkmechanismen zu überprüfen. Im Zuge dessen sollte eine mögliche Dimerisierung oder Multimerisierung mittels *Cross-linking*-Experimenten untersucht werden.

Im Weiteren sollte über einen enzymatischen Verdau und anschließender MALDI-TOF-Analyse die Cysteinverbrückung verifiziert werden.

Die Aufklärung der Tertiärstruktur des dritten Mitgliebes der Macin-Familie, Neuromacin, wäre für die Definition der Macin-Familie ein wichtiger Aspekt. Die Untersuchung der Wirkmechanismen von Theromacin und Neuromacin würde zu dieser Definition beitragen.

Im Weiteren könnten die Tertiärstrukturen und die Wirkmechanismen der beiden antimikrobiellen Peptide Alvinellacin und Theromacin für die Entwicklung von

synthetischen Antibiotika von Interesse sein. Im Zuge der Entstehung multiresistenter Bakterien wird weltweit nach neuen Antibiotika gesucht. Die bisher beste Möglichkeit sind natürlich vorkommende Abwehrmoleküle. Antimikrobielle Peptide sind gut für die Herstellung synthetischer Antibiotika geeignet, da bisher kein Bakterium eine Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden entwickelt hat.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A	Alanin
AMP	antimikrobielles Peptid
C	Cystein
CS $\alpha/\beta$	Cysteinstabilisiertes $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Faltblatt
CsEv5	<i>Centruroides sculpturatus Ewing</i> variant 2 toxin
CYANA	combined-assignment and dynamic algorithm for NMR applications
D	Asparaginsäure
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
E	Glutaminsäure
<i>FID</i>	<i>Free-induction decay</i>
G	Glycin
HSQC	<i>Heteronuclear-single quantum coherence</i>
I	Isoleucin
K	Lysin
K	Kelvin
L	Leucin
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight</i>
MGD-1	<i>Mediterranean Mussel Defensin-1</i>
N	Asparagin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>Nuclear-Overhauser effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser and exchange spectroscopy</i>
pdb	<i>Protein-data base</i>
PhD1	<i>Petunia hybrida defensin 1</i>
ppm	<i>pars per million</i>
Q	Glutamin
R	Arginin
r.m.s.d.	<i>root mean square deviation</i>

RP-HPLC	<i>Reversed-phase high performance liquid chromatography</i>
S	Serin
SCOP	<i>structural classification of proteins</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TOCSY	<i>Total-correlation spectroscopy</i>
V	Valin
Y	Tyrosin



## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Übersicht über die Diversität der antimikrobiellen Peptide. ....	4
Abb. 1-2: <i>Alvinella pompejana</i> und sein Lebensraum (modifiziert nach Le Bris und Gaill, 2007). ....	6
Abb. 1-3: Die Tertiärstrukturen und Oberflächenpotentiale von Arenicin-1 und Arenicin-2. ....	7
Abb. 1-4: <i>Hirudo medicinalis</i> , der medizinische Blutegel (modifiziert nach Jauker und Clauss, 2003). ....	8
Abb. 1-5: Die Tertiärstruktur und die molekulare Oberfläche von Hydramacin-1. ....	9
Abb. 1-6: Übersicht über die unterschiedlichen Familien der Skorpion-Toxin-ähnlichen Peptide. ....	10
Abb. 1-7: Ausrichtung der Atomkerne mit und ohne äußerem Magnetfeld $B_0$ . ....	12
Abb. 1-8: Wirkung eines $90^\circ$ Pulses auf die z-Magnetisierung. ....	13
Abb. 1-9: Schematische Darstellung der Pulssequenz eines eindimensionalen NMR-Experimentes. ....	14
Abb. 1-10: Schematische Darstellung der Pulssequenz eines homonuklearen 2D-NMR-Experimentes. ....	14
Abb. 2-1: Schematische Darstellung des Theromacin-Fusionsproteins. ....	18
Abb. 3-1: RP-HPLC-Diagramm der Reinigung des synthetischen Alvinellacins. ....	33
Abb. 3-2: 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC-Spektrum von Alvinellacin. ....	35
Abb. 3-3: 2D- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY Spektrum von Alvinellacin. ....	36
Abb. 3-4: 2D- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum von Alvinellacin. ....	37
Abb. 3-5: Darstellung von intra- und interresidualen NOE-Signalen der Aminosäuren G14 und N13. ....	38
Abb. 3-6: Darstellung von interresidualen Signalen zwischen den Aminosäuren C3 und C17 sowie C7 und C21. ....	39
Abb. 3-7: Ramachandran-Verteilung der Torsionswinkel von Alvinellacin. ....	42
Abb. 3-8: Darstellung der Tertiärstruktur von Alvinellacin. ....	43
Abb. 3-9: Darstellung der molekularen Oberfläche von Alvinellacin. ....	43
Abb. 3-10: Struktureller Vergleich von Alvinellacin, Arenicin-1 und Arenicin-2. ....	44
Abb. 3-11: Struktureller Vergleich von Alvinellacin und $\omega$ -Conotoxin MVIIC. ....	45
Abb. 3-12: Gelelektrophoretische Analyse der Expression des Fusionsproteins. ....	46
Abb. 3-13: Reinigung der Proteinprobe mittels Ni-NTA-Agarose. ....	47

Abb. 3-14: Enterokinase-Verdau des Fusionsproteins. ....	47
Abb. 3-15: RP-HPLC-Diagramm der Reinigung des Theromacin-Peptidlösung. ....	48
Abb. 3-16: 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC-Spektrum von Theromacin. ....	49
Abb. 3-17: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im HNCA-Spektrum. ....	50
Abb. 3-18: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im CA(CO)NH-Spektrum. ....	51
Abb. 3-19: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im CBCANH-Spektrum. ....	52
Abb. 3-20: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im CBCA(CO)NH-Spektrum. ....	53
Abb. 3-21: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im HNCO-Spektrum. ....	54
Abb. 3-22: Darstellung von Resonanzen sequenziell benachbarter Aminosäuren im CO(CA)NH-Spektrum. ....	55
Abb. 3-23: Darstellung von Resonanzen der Kohlenstoffatome sequenziell benachbarten Aminosäuren im (H)C(CO)NH-Spektrum. ....	57
Abb. 3-24: Zweidimensionales, homonukleares TOCSY-Experiment von Theromacin. ....	58
Abb. 3-25: Darstellung der Resonanzen von Protonen der Seitenketten der Aminosäuren D35, R36, G37 und E38 im $^{15}\text{N}$ -editierten TOCSY-Spektrum. ....	60
Abb. 3-26: Darstellung der Protonenresonanzen aus der Seitenkette der Aminosäure Isoleucin 60 im $^{13}\text{C}$ -editierten TOCSY-Spektrum. ....	62
Abb. 3-27: Zweidimensionales, homonukleares NOESY-Spektrum von Theromacin. ....	63
Abb. 3-28: Darstellung von intra- und interresidualen NOE-Signalen bei den Aminosäuren I60 und C59. ....	64
Abb. 3-29: Darstellung von interresidualen <i>long range</i> NOE-Signalen zwischen den Aminosäuren E4, D5 und Y40 und von sequentiellen NOE-Signalen zwischen den Aminosäuren E4 und D5 im $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Spektrum. ....	65
Abb. 3-30: Darstellung von <i>long range</i> NOE-Signalen zwischen den Aminosäuren E38 und R58 sowie zwischen den Aminosäuren Y40 und N56. ....	66
Abb. 3-31: Darstellung eines interresidualen <i>long range</i> NOE-Signals zwischen den Aminosäuren C28 und A34 im $^{13}\text{C}$ -editierten NOESY-Spektrum. ....	67

Abb. 3-32: Übereinandergelagerte 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren von Theromacin bei unterschiedlichen Temperaturen. ....	70
Abb. 3-33: Darstellung der Änderung der chemischen Verschiebungen bei unterschiedlichen Temperaturen. ....	71
Abb. 3-34: Darstellung der Verteilung der Torsionswinkel der mittleren Struktur von Theromacin in einem Ramachandran-Diagramm. ....	73
Abb. 3-35: Die Tertiärstruktur von Theromacin. ....	74
Abb. 3-36: Darstellung der molekularen Oberfläche von Theromacin. ....	75
Abb. 3-37: Vergleich der Strukturen von Theromacin und repräsentativen Mitgliedern der Familien der Skorpion-Toxin-ähnlichen Superfamilie. ....	77
Abb. 3-38: Räumliche Lage der Cysteinverbrückungen. ....	78
Abb. 4-1: Darstellung der räumlichen Lage der Cysteinverbrückungen in einem <i>Cystein Knot</i> ( <a href="http://knottin.cbs.cnrs.fr/">http://knottin.cbs.cnrs.fr/</a> ). ....	80

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Kernspin, natürliche Häufigkeit und gyromagnetische Verhältnisse einiger Atomkerne. ....	11
Tab. 2-1: Zusammensetzung des 2 x M9-Minimalmediums mit Vitaminen.....	19
Tab. 2-2: Zusammensetzung des Wasch- und Elutionspuffers. ....	20
Tab. 2-3: Zusammensetzung des zweifachen Laemmli-Probenpuffers. ....	22
Tab. 2-4: Zusammensetzung des zehnfach konzentrierten Laemmli-Laufpuffers. ..	22
Tab. 2-5: Zusammensetzung von SDS-PAGE-Proteingelen. ....	23
Tab. 2-6: Zusammensetzung der Coomassie-Lösungen.....	24
Tab. 2-8: Zusammensetzung der Renaturierungslösung I.....	25
Tab. 2-9: Zusammensetzung der Renaturierungslösung II.....	25
Tab. 2-10: Zusammensetzung der Laufmittel I und II. ....	27
Tab. 2-11: RP-HPLC-Protokoll für die Reinigung von Alvinellacin.....	27
Tab. 2-12: RP-HPLC-Protokoll für die Reinigung von Theromacin.....	27
Tab. 2-13: Durchgeführte NMR-Experimente für Alvinellacin. ....	29
Tab. 2-14: Durchgeführte NMR-Experimente für Theromacin. ....	30
Tab. 3-1: Cysteinkombinationen als Vorgaben für die Strukturberechnung von Alvinellacin.....	40
Tab. 3-2: Statistik der Strukturberechnung der 20 energieärmsten Konformere von Alvinellacin.....	41
Tab. 3-3: Cysteinkombinationen als Vorgaben für die Strukturberechnung von Theromacin.....	69
Tab. 3-4: Strukturelle Statistik der 20 energieärmsten Konformere von Theromacin. ....	72

## 9 Literaturverzeichnis

**Alanis, AJ. (2005).** Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Arch Med Res 36(6):697-705.

**Andrä, J., Jakovkin, I., Grötzinger, J., Hecht, O., Krasnosdembkaya, AD., Goldmann, T., Gutschmann T. und Leippe M. (2008).** Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin. Biochem J 410:113-22.

**Andrews, S. (2001).** *Hirudo medicinalis*: the medicinal leech. Journal of Audiovisual Media in Medicine 24(3):126-31.

**Arias, HR., und Blanton, MP. (2000).** Alpha-conotoxins. Int J Biochem Cell Biol 32:1017-28.

**Bai, X., Adams, BJ., Ciche, TA., Clifton, S., Caugler, R., Hohenhout, SA., Spieth, J., Sternberg, PW., Wilson, RK. und Grewal, PS. (2009).** Transcriptomic analysis of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* TTOI. BMC Genomics 10:205.

**Bax, A. und Ikura, M. (1991).** An efficient 3D NMR technique for correlating the proton and <sup>15</sup>N backbone amide resonance with the alpha-carbon of the preceding residue in uniformly <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C enriched proteins. J Biomol NMR 1(1):99-104.

**Bloch, F., Hansen, WW. Und Packard, ME. (1946).** Nuclear induction. Phys Rev 69(127).

**Bodenhausen, G. und Ruben, D (1980).** Natural Abundance Nitrogen-15 NMR by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy. Chem Phys Lett 69:185-9

**Braunschweiler, L. und Ernst, RR. (1983).** J Magn Reson 53:512.

**Brutscher, B., Cordier, F., Simorre J-P., Caffrey, M. und Marion, D. (1995).** High-resolution 3D HNCOCA experiment applied to a 28 kDa paramagnetic protein. J Biomol NMR 5:202-206.

**Brogden, KA. (2005).** Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? Nat Rev Micr 3:238-50.

**Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J-L. und Hoffmann, D. (1999).** Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev Com Immun 23:329-44.

**Carlomagno, T., Maurer, M., Sattler, M., Schwendinger, MG., Glaser, SJ. und Griesinger, C. (1996).** PLUSH TACS: Homonuclear planar TACS with two-band selective shaped pulses applied to C-alpha, C' transfer and C-beta, C-aromatic correlations. J Biomol NMR 8(2):161-70.

**Carson, M. (1991).** Ribbons 2.0. J. Appl. Crystallography 24:946-950.

**Cheek, S., Krishna, SS. und Grishin, NV. (2006).** Structural Classification of Small, Disulfide-rich Protein Domains. J Mol Biol 359:215-37.

**Cho, JH., Park, CB., Yoon, YG. und Kin, SC. (1998).** Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. Biochim Biophys Acta 1408:67-70.

- Chu-Kung, AF., Nguyen, R., Bozelli, KN. und Tirrell, M. (2010).** Chain length dependence of antimicrobial peptide – fatty acid conjugate activity. *Journal of Colloid and Interface Science* 345:160-67.
- Clowes, RT., Boucher, W., Hardman, CH., Domaille, PJ. und Laue, ED. (1993).** A 4D HCC(CO)NNH experiment for the correlation of aliphatic sidechain and backbone resonances in  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled proteins. *J Biomol NMR* 3:349-54.
- Cornet, B., Bonmatin, J-L., Hetru, C., Hoffmann, JA., Ptak, M. und Vovelle, F. (1995).** Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure* 3:435-48.
- Clubb, RT., Thanabal, V. und Wagner, G. (1992).** A constant-time three dimensional triple resonance pulse scheme to correlate intraresidue  $^1\text{HN}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts in  $^{15}\text{N}$ --- $^{13}\text{C}$ -labelled proteins. *J Magn Reson* 97(1):213-217.
- Davis, AL., Keeler, J., Laue, ED., und Moskau, D. (1992).** Experiments for Recording Pure-Absorption Heteronuclear Correlation Spectra Using Pulsed Field Gradients. *J Magn Reson* 98:207-16.
- Delaglio, F., Grzesiek S., Vuister, GW., Zhu, G., Pfeifer, J. und Bax, A. (1995).** NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6(3):277-93.
- De Moreno, MR., Smith, JF. und Smith, RV. (1985).** Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie bluesilver stain procedure. *Anal Biochem* 151(2):466-70.
- Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A. und Kisich, KO. (2009).** The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. *Curr Pharm Des* 15(21):2377-92.
- Ellman, GL. (1959).** Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.
- Ernst, RR. und Anderson, WA. (1966).** Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. *Rev Sci Instr* 37:93-102.
- Farr-Jones, S., Miljanich, GP., Nadasdi, L., Ramachandran, J. und Basus, VL. (1995).** Solution Structure of  $\omega$ -Conotoxin MVIIIC, a High Affinity Ligand of P-type Calcium Channels, using  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy and Complete Relaxation Matrix Analysis. *J Mol Biol* 248:106-24.
- Fiaux, J., Bertelsen, EB., Horwich, AL. und Wüthrich, K. (2002).** NMR analysis of a 900K GroES complex. *Nature* 418:207-11.
- Gallo, RL., Murakami, M., Ohtake, T. und Zaiou, M. (2002).** Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* 110(6):823-31.
- Gaur, S., Newcomb, R., Rivnay, B., Bell, JR., Ramachandran, J. und Miljanich, GP. (1994).** Calcium channel antagonist peptides define several components of transmitter release in the hippocampus. *Neuropharmacology* 33:1211-19.
- Guiliani, A., Pirri, G., Bozzi, A., Di Giulio, A., Aschi, M. und Rinaldi, AC. (2008).** Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell Mol Life Sci* 65:2450-60.
- Güntert, P. (2004).** Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol Biol* 278:353-78

- Grzesiek, S. und Bax, A. (1992).** Improved 3D Triple-Resonance NMR Techniques Applied to a 31-kDa Protein. *J Magn Reson* 96(2):432-40.
- Grzesiek, S. und Bax, A. (1992).** An Efficient Experiment for Sequential Backbone Assignment of Medium-Sized isotopically Enriched Proteins. *J Magn Reson* 99(1):201-7.
- Grzesiek, S., Anglister, J. und Bax, A. (1993).** 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* 101(1):114-9.
- Grzesiek, S. und Bax, A. (1993).** Amino-Acid Type Determination in the Sequential Assignment Procedure of Uniformly C-13/N-15-Enriched Proteins. *J Biomol NMR* 3(2):185-204.
- Haddad, A., Camacho, F., Durand, P. und Cary, SC. (1995).** Phylogenetic Characterization of the Epibiotic Bacteria Associated with the Hydrothermal Vent Polychaete *Alvinella pompejana*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5):1679-87.
- Hancock, RE. und Rozek, A. (2002).** Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett* 206(2):143-9.
- Hancock, REW. und Stahl H-G. (2006).** Antimicrobial and host-defense peptides as new-anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotech* 24.
- Hankin, EH. (1892).** Reports to the Scientific Grants Committee of the British Medical Association; Report on the Bactericidal Action of Alexins. *Brit Med Jour* 728-30.
- Hillyard, DR., Monje, VD., Mintz, IM., Bean, BP., Nadasdi, L., Ramachandran, J., Miljanich, G., Azimi-Zoonooz, A., McIntosh, JM., Cruz, LJ., Imperial, JS. und Olivera, BM. (1992).** A new conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 9:69-77.
- Hoskin, DW. und Ramamoorthy, A. (2008).** Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778:357-75.
- Ittiprasert, W., Miller, A., Myers, J., Nene, V., El-Sayed, NM. und Knight, M. (2010).** Identification of immediate response genes dominantly expressed in juvenile resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* snails upon exposure to *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 169:27-39.
- Jauker, J. und Claus, W. (2003).** *Hirudo medicinalis* – Blutsauger in der Forschung. *Biol unserer Zeit* 33(1).
- Jenssen, H., Hamill, P. und Hancock, REW. (2006).** Peptide Antimicrobial Agents. *Clin Micro Rev* 19(3):491-511.
- Johnson, BA. (2004).** Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol Biol* 278:313-52.
- Jung, S., Dingley, AJ., Augustin, R., Anton-Erxleben, F., Stanisak, M., Gelhaus, C., Gutschmann, T., Hammer, MU., Podschun, R., Bonvin, AMJJ., Leippe, M., Bosch, TCG. und Grötzinger, J. (2009).** Hydramacin-1, Structure and Antibacterial Activity of a Protein from the Basal Metazoan Hydra. *J Biol Chem* 284(3):1896-1905.

**Juniper, SK. und Martineu, P. (1995).** Alvinellids and Sulfides at Hydrothermal Vents of the Eastern Pacific: A Review. *Amer Zool* 35:174-85.

**Kay, LE., Ikura, M. Tschudin, R. und Bax, A. (1990).** Three-Dimensional Triple-Resonance NMR Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins. *J Magn Reson* 89:496-514.

**Kay, LE., Keifer, P. und Saarinen, T. (1992).** Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J Am Chem Soc* 114:10663-5.

**Kay, LE., Xu, GY., Singer, AU., Muhandiram, DR. und Forman-Kay, JD (1993).** A Gradient-Enhanced HCCH-TOCSY Experiment for Recording Side-Chain  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Correlations in  $\text{H}_2\text{O}$  Samples of Proteins. *J Magn reson Ser B* 101:333-7.

**Kay, LE., Xu, GY. und Yamazaki, T. (1994).** Enhanced-sensitivity triple-resonance spectroscopy with minimal  $\text{H}_2\text{O}$  saturation. *J Magn reson Ser A* 109:129-33.

**Kottin Website** <http://knottin.cbs.cnrs.fr/>.

**Kobayashi, Y., Takashima, H., Tamaoki, A., Kyogoku, Y., Lambert, P., Kuroda, H., Chino, N., Watanabe, TX, Kimura, T., Sakakibara, S. und Moroder, L. (1991).** The cysteine stabilized  $\alpha$ -helix: a common structural motif of ion channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolymers* 31:1213-20.

**Koradi, R., Billeter, M. und Wüthrich, K. (1996).** MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structure. *J Mol Graph* 14(1):51-5, 29-32.

**Laemmli, UK. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.

**LeBris, N. und Gaill, F. (2007).** How does the annelid *Alvinella pompejana* deal with an extreme hydrothermal environment? *Rev Environ Sci Biotechnol* 6:197-221.

**Lipscombe, D., Kansomut, S. und Tsien, RW (1989).** A adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature* 340:639-41.

**Logan, TM., Olejniczak, ET., XU, RX. und Fesik, SW. (1993).** A general method for assigning NMR spectra of denatured proteins using 3D HC(CO)NH-TOCSY triple resonance experiments. *J Biomol NMR* 3:225-31.

**Lovelace, ES., Armishaw, CJ., Colgrave, ML., Wahlstrom, ME., Alewood, PF., Daly, NL. und Craik, DJ (2006).** Cyclic MrlA: A Stable and Potent Cyclic Conotoxin with a Novel Topological Fold that Targets the Norepinephrine Transporter. *J Med Chem* 49:6561-68.

**Lyons, BA. und Montelione, GT. (1993).** 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* 101:206-9.

**McPhee, JB. und Hancock, REW. (2005).** Function and therapeutic potential of defense peptides. *J Peptide Sci* 11:677-87.

**Melo, MN., Ferre, R und Castanho, MARB. (2009).** Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Micro* 7:245-50.



- Montelione, GT., Lyons, BA., Emerson, SD. und Tashiro, M. (1992).** An efficient triple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotopically enriched proteins. *J Amer Chem Soc* 114:10974-5.
- Muhandiram, DR. und Kay, LE. (1994).** Gradient-Enhanced Triple Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity. *J Magn reson Ser B* 103:203-16.
- Mukherjee, S., Vaishnava, S. und Hooper LV. (2008).** Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. *Cell Mol Life Sci*
- Murzin, AG., Brenner, SE., Hubbard, T. und Chothia, C. (1995).** SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* 247(4):536-40.
- Neuhaus, D. und Williamson, M. (1989).** The Nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis. VCN Publishers.
- Nijnik, A. und Hancock, REW. (2009).** Host defense peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerging Health Threats Journal* 2:e1.
- Nicholls, A., Sharp, KA., und Honig, B. (1991).** Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11(4):281-96.
- Noggle, J. und Schirmer, RE. (1971).** The Nuclear Overhauser effect. Chemical Applications. Academic Press.
- Ovchinnikova, TV., Shenkarev, ZO., Balandin, SV., Nadezhdin, KD., Paramonov, AS., Kokryakov, VN. und Arseniev, AS. (2007).** Molecular Insight into Mechanism of Antimicrobial Action of the  $\beta$ -Hairpin Peptide Arenicin: Specific Oligomerization in Detergent Micelles. *Biopolymers* 89(5):455-64.
- Ovchinnikova, TV., Shenkarev, ZO., Nadezhdin, KD., Balandin, SV, Zhmak, MN., Kudelina, IA., Finkina, EI., Kokryakov, VN. und Arseniev., AS (2007).** Recombinant expression, synthesis, purification, and solution structure of arenicin. *Biochem Biophys Res Commun* 360:156-62.
- Pallaghy, PK., Nielsen, KJ., Craik, DJ. und Norton, RS. (1994).** A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded  $\beta$ -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Prot Sci* 3:1833-39.
- Palmer, AG., Cavanagh, J., Wright, PE. und Rance, M.(1991).** Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *J Magn Reson* 93:151-70.
- Pettersen, EF., Goddard, TD., Huang, CC., Couch, GS., Greenblatt, DM., Meng, EC. und Ferrin, TE. (2004).** UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25(13):1605-12.
- Piotto, M., Saudek, V. und Sklenár, V. (1992).** Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Bioml NMR* 2 (6):661-5.
- Poehling, H. und Neuhoff, V. (1981).** Visualization of proteins with a silver stain: a critical analysis. *Electrophoresis* 2:141-147.

**Powers, J-PS., und Hancock, REW (2003).** The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24:1681-91.

**Proteincalculator v3.3.,** <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>.

**Purcell, EM., Torrey, HC. und Pound, RV. (1946).** Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys Rev* 69:37-8.

**Rice, LB. (2009).** The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Cur Opin Micro* 12:476-81.

**Ridley, F. (1928).** Lysozyme: An Antibacterial Body present in Great Concentration in Tears, and its Relation to Infection of the Human Eye. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1495-1506.

**Rousset, V., Rouse, GW., Féral, J-P., Desbruyères, D. und Pleijel, F. (2003).** Molecular and morphological evidence of Alvinellidae relationships (Terebelliformia, Polychaeta, Annelida). *Zool Scripta* 32(2):185-197.

**Schikorski, D., Cuvillier-Hot, V., Leippe, M., Boidin-Wichlacz, C., Slomianny, C., Macagno, E., Salzet, M. und Tasiemski, A. (2008).** 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 Immun* 181:1083-95.

**Schittek, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G. und Garbe, C. (2001).** Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immuno* 2(12):1133-7.

**Schleucher, J., Sattler, M und Griesinger, C. (1993).** Coherence Selection by gradients without Signal Attenuation: Application to 3D HNCO experiments. *Angew Chem Int Ed* 32:1489-91.

**Schleucher, J., Schwendinger, M, Sattler, M., Schmidt, P., Schedletsky, O., Glaser, SJ., Sorensen, OW. und Griesinger, C. (1994).** A General Enhancement Scheme in Heteronuclear Multidimensional NMR Employing Pulsed Field Gradients. *J Biomol NMR* 4:301-6.

**Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G. und Bax, A. (2009).** TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J Biomol NMR* 44:213-223.

**Shin, D., DiDonato, M., Barondeau, DP., Hura, GL., Hitomi, C., Berglund, JA., Getzoff, ED., Cary, SG. und Tainer, JA. (2009).** Superoxide Dismutase from the Eukaryotic Thermophile *Alvinella pompejana*: Structure, Stability, Mechanism, and Insights into Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Mol Biol* 385:1534-1555.

**Simon, B. und Sattler, M. (2004).** Biomolekulare NMR-Spektroskopie auf der Überholspur. *Angew Chemie* 116:800-804.

**Sklenár, V, Piotto, M., Leppik, R. und Saudek, V. (1993).** Gradienttailored water suppression for  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. *J Magn Reson Ser A* 102:241-2.

**Software, NMRView5.2.2 – Internes Benutzerhandbuch (1994 – 2004).** One Moon Scientific, Inc. Westfield, NJ, USA.

**Stryer, L. (1999).** Biochemie. Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg Berlin Oxford

**Takahashi, D., Shukla, SK., Prakash, O. und Zhang, D. (2010).** Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie* 92:1236-1241.

**Tang, M. und Hong, M. (2009).** Structure and Mechanism of  $\beta$ -Hairpin Antimicrobial Peptides in Lipid Bilayers from Solid-State NMR Spectroscopy. *Mol Biosyst* 5(4):317-22.

**Tasiemski, A. (2008).** Antimicrobial peptides in annelids. *ISJ* 5:75-82.

**Tasiemski, A., Vandenbulcke, F., Mitta, D., Lemoine, J., Lefebvre, C., Sautière, P-E. und Slazet, M. (2004).** Molecular Characterization of Two Novel Antibacterial Peptides Inducible upon Bacterial Challenge in an Annelid, the Leech *Theromyzon tessulatum*. *J Biol Chem* 279: 30973-30982.

**UCSF CHIMERA** (Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIH P41 RR001081))

**Van Gunsteren, WF., Billeter, SR., Eising, AA., Hünenberger, PH., Krüger, P., Mark, AE., Scott, WRP. und Tironi, IG. (1996).** Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide. Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich 1-1042.

**Vriend, G. (1990).** WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* 8(1):52-6,29.

**Wang, Z. und Wang, G. (2004).** APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res* 32(database issue):D590-2.

**Wheeler, DB., Randall, A. und Tsien, RW. (1994).** Roles of N-type and Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264:107-111.

**Wüthrich, K. (1986).** NMR of Proteins and Nucleic Acids. John Wiley & Sons, Inc, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore.

**Xu, Q., Wang, G., Yuan, H., Chai, Y. und Xiao, Z. (2010).** cDNA sequence and expression analysis of an antimicrobial peptide, theromacin, in the triangle-shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii*. *Comp Biochem Phys, Part B* 157:119-26.

**Yang, Y-S., Mitta, G., Chavanieu, A., Calas, B., Sanchez, JF., Roch, P. und Aumelas, A. (2000).** Solution Structure and Activity of the Synthetic Four-Disulfide Bond Mediterranean Mussel Defensin MDG-1. *Biochem* 39:14436-47.

**Zaslloff, M. (2002).** Antimicrobial peptide of multicellular organisms. *Nature* 415(6870):389-95.

**Zhang, O., Kay, LE., Olivier, JO. und Forman-Kay, JD. (1994).** Backbone  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  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* 4:845-58.

**Zhu, S., Gao, B. und Tytgat, J. (2005).** Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CSa/ $\beta$  superfamily. *Cell mol Life Sci* 62:2257-69.

## 10 Lebenslauf

Name: Madlen Mohr  
Geburtsdatum: 25.09.1981  
Geburtsort: Berlin  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Bildungsweg

1988 – 1994: Grundschule Berlin-Treptow  
1994 – 2001: Philippe-Cousteau-Gymnasium Berlin  
12.07.2001 allgemeine Hochschulreife  
2002 – 2006: Studium im Fach Biologie an der Philipps-Universität Marburg  
2006 – 2007: Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Monika Hassel an der Universität Marburg mit dem Thema „Untersuchungen zur Lokalisation des Kringelchen Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor Proteins in Hydra“  
30.08.2007 Erhalt des akademischen Grades Diplombiologin  
2008 – 2010: Promotionsarbeit und wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Biochemie bei Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger mit dem Thema „Aufklärung der Tertiärstruktur der antimikrobiellen Peptide Alvinellacin und Theromacin mit Hilfe der NMR-Spektroskopie“

## 11 Poster

**M. Mohr**, H. Fedders, O. Hecht, C. Gelhaus, S. Jung, M. Leippe, A. Tasiemski, J. Grötzinger.

Structure of the antimicrobial peptide alvinellacin from *Alvinella pompejana*.

Drittes Biophysiker-Treffen, 22. Januar 2010, Borstel, Germany

**M. Mohr**, S. Jung, F. Soennichsen, A. Tasiemski, M. Leippe, J. Grötzinger. *Theromacin from the Leech - Structure of a further Member of the Macin Protein Family.*

14th Joint Meeting Signal Transduction 18.-20.Oktober 2010, Leonardo Hotel, Weimar, Germany

## 12 Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Erstgutachter Prof. Dr. Joachim Grötzinger. Ich bedanke mich vielmals für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit schreiben zu können. Natürlich bedanke ich mich auch für die Betreuung, die sehr interessanten Themen und das Korrekturlesen.

Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John möchte ich herzlich dafür danken, dass er mich am Institut für Biochemie aufgenommen und mir somit die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation zu schreiben.

Des Weiteren danke ich der ganzen Arbeitsgruppe Grötzinger (Inken Lorenzen, Matthias Michalek, Mohamad Shomali, Verena Pawlak, Björn Spudy, Ahmad Trad, Jana Kieper, Britta Hansen, Janina Schröder, Ursula Mundt, Jessica Schneider, Sina Viehweg) für die kollegiale Zusammenarbeit und für sämtliche Hilfestellungen während der gesamten Zeit. Hierbei sei besonders Dr. Sascha Jung genannt. Ich danke ihm für die Erklärung und Hilfestellung bei der NMR-Spektroskopie und für das Korrekturlesen.

Dem Zweitgutachter, Herr Prof. Dr. Matthias Leippe, möchte ich ebenfalls danken.

Im Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Frank Sönnichsen und Herrn Dr. Oliver Hecht. Ohne die von Ihnen aufgenommenen NMR-Experimente wäre ich nicht in der Lage gewesen, die Tertiärstrukturen von Alvinellacin und Theromacin aufzuklären.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie. Ihr wart immer für mich da, egal in welcher Situation. Eure aufmunternden Worte haben mir viel Mut gegeben. Bei den Telefonaten und Besuchen konnte ich immer wieder Kraft schöpfen. Wie ich die ganze Hilfe und Unterstützung jemals wieder gut machen kann, weiß ich nicht. Aber ich werde immer für euch da sein, so wie ihr es für mich wart. Ich liebe euch von ganzem Herzen!!!!

Im Weiteren möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken. Bei Olga Braun möchte ich mich für das Korrekturlesen und die tollen Gespräche herzlich bedanken.

Bei Katja Hüpeden, Rose Fahrenkrog-Petersen und Yvonne Roger für die aufmunternden E-Mails und Telefonate. Ein ganz besonderer Dank geht an meine Großcousine Julia Heidemüller. Obwohl wir uns erst kennengelernt haben, als ich hierher nach Kiel gezogen bin, warst du von Anfang an für mich da. Ich danke dir für die tollen Abende, die tollen Gespräche und die Unterstützung in allen Belangen des Lebens. Das werde ich nie vergessen und ebenfalls immer für dich da sein!

Zum Schluss möchte ich noch Tobias Altrock für das Instandhalten meines Computers von ganzem Herzen danken!

Ich liebe euch und werde nie vergessen, welch ein Glück ich besitze euch zu haben!!!

## 13 Erklärung

Hiermit versichere ich gem. § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass die vorliegende Arbeit unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger (Institut für Biochemie, CAU zu Kiel) selbstständig verfasst, keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet und sämtliche Stellen, die den benutzten Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, mit Quellenangabe kenntlich gemacht sind. Alle wörtlich entnommenen Stellen sind als Zitate kenntlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

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

Kiel, \_\_\_\_\_

(Madlen Mohr, Verfasser)