

## 3. Ergebnisse

### 3.1. NMR-Spektroskopie

Als Wirkungsort der tryptophan- und argininreichen antimikrobiellen Peptide gilt die bakterielle Zytoplasmamembran. Um genauere Einblicke in die Funktion dieser Peptide zu erhalten, ist es sinnvoll, Strukturinformationen im membrangebundenen Zustand mit atomarer Auflösung zu erhalten. Die Lösungs-NMR-Spektroskopie erweist sich hier als eine mögliche Methode, diese Informationen zu erhalten. Das im Zentrum der Untersuchungen stehende Modellpeptid ist cyclo(RRWRF) (c-RW). Um Rückschlüsse auf die Funktion ziehen zu können, wurden weitere Peptide untersucht, bei denen spezifische Eigenschaften verändert waren (Tabelle 4). Bei cyclo(RRYRF) (c-RY) waren die Tryptophane durch Tyrosine ersetzt, bei cyclo(RRNalRF) (c-RNal) waren die Tryptophane gegen L- $\beta$ -(2-Naphtyl)-alanine ausgetauscht, bei cyclo(KKWWKF) (c-KW) waren die Arginine durch Lysine ersetzt. In zwei weiteren Peptiden, cyclo(RRWFR) (c-RW2) und cyclo(RRWFWR) (c-RW3), war die aromatische Aminosäure Phenylalanin in der Sequenz verschoben.

Um Strukturen membrangebundener Peptide und Proteine mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie untersuchen zu können, muss die Größe des Membransystems limitiert werden, da mit abnehmender Beweglichkeit die Relaxationsrate zunimmt und folglich die herkömmlichen Lösungs-NMR-Experimente versagen. Üblicherweise verwendet man Mizellbildner wie SDS (Natriumdodecylsulfat) und DPC (Dodecylphosphocholin), um die Umgebung einer Lipid-Wasser-Grenzfläche zu schaffen (siehe Kapitel 1.6.1). Die Struktur des im Zentrum der Untersuchung stehenden c-RW-Peptides wurde daher in Wasser sowie in einer SDS- bzw. DPC-Lösung bestimmt. Es wurden außerdem die

verwandten Peptide c-RY, c-KW, c-RNal, c-RW2 und c-RW3 untersucht, allerdings lediglich in einer DPC-Lösung.

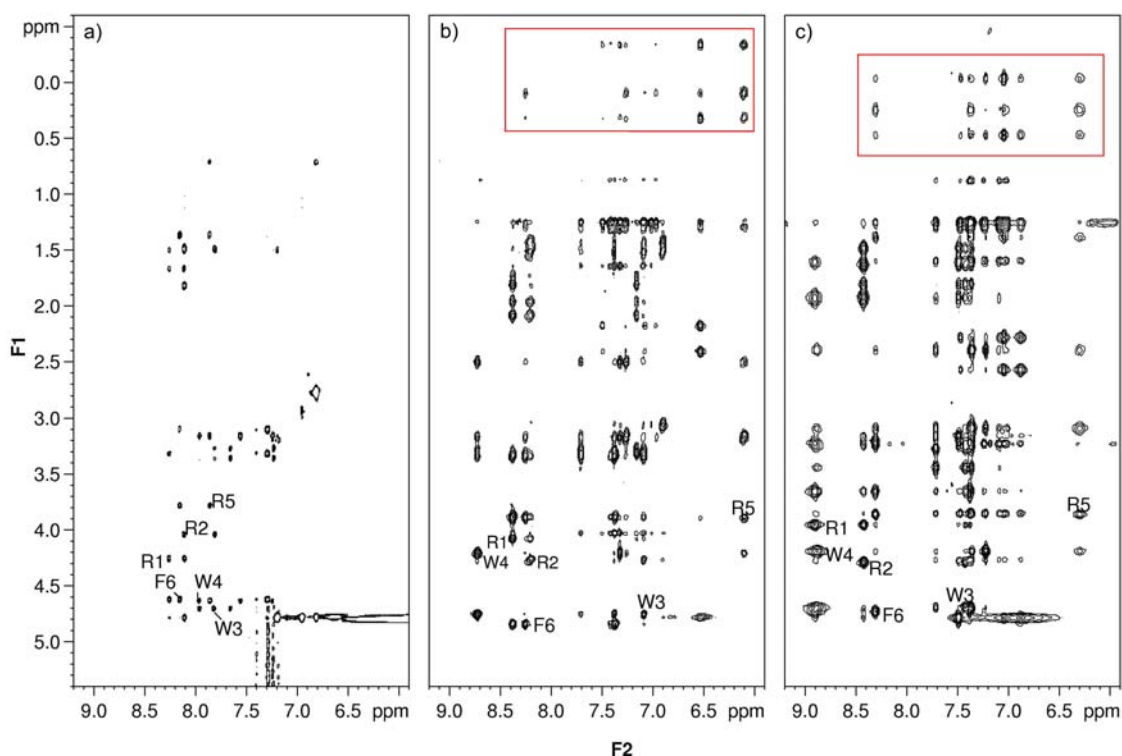
Name	Sequenz	MIC E. coli [ $\mu\text{M}$ ]	MIC B. subtilis [ $\mu\text{M}$ ]	Erythrozytenlyse bei 100 $\mu\text{M}$ [%]
c-RW	cyclo(RRWWRWF)	6,3	3,1	24,4
c-KW	cyclo(KKWWKF)	25,0	25,0	10
c-RY	cyclo(RRYYRF)	>100	>100	3
c-RNal	cyclo(RRNalNalRF)	12,5	1,5	34
c-RW2	cyclo(RRWWFR)	3,9	3,9	28,1
c-RW3	cyclo(RRWFWR)	2,0	3,9	18,5

**Tabelle 4: Sequenzen und biologische Aktivitäten der untersuchten Peptide.** Biologische Aktivitäten nach Dathe *et al.* und Wessolowski *et al.* [99-101].

### 3.1.1. Aufnahme und Zuordnung der Spektren

Die Konzentration von c-RW betrug in allen Fällen 2,5 mM. SDS und DPC wurde in Konzentrationen von 25 mM bzw. 50 mM verwendet, woraus sich ein Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:10 bzw. 1:20 ergab. Das Peptid zeigte eine breite Verteilung der Resonanzen der Amidprotonen in eindimensionalen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in allen drei Systemen, was auf eine geordnete Struktur hinwies. In wässriger Lösung zeigte c-RW keine NOE-Effekte bei einer Feldstärke von 600 MHz. Um Abstandsinformationen zu erhalten, wurden ROESY-Spektren aufgenommen (Abbildung 11a). Durch das Ausbleiben der NOE-Effekte für c-RW in Lösung war sichergestellt, dass die NOE-Informationen, die durch NOESY-Spektren in Anwesenheit von Mizellen erhalten wurden (Abbildung 11b und c), auf mizellgebundenes Peptid zurückzuführen waren und nicht von Peptid in Lösung stammten.

Neben zweidimensionalen NOESY- und ROESY-Spektren wurden eine Reihe von TOCSY-Spektren mit unterschiedlichen Mischzeiten und ein DQF-COSY aufgenommen. Zur Bestimmung der  $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha}$ -Kopplungskonstanten wurde ein



**Abbildung 11: Ausschnitt aus ROESY- und NOESY-Spektren des c-RW.** a) ROESY 80 ms des c-RW in H<sub>2</sub>O. b) NOESY 80 ms des c-RW in 25 mM SDS und c) in 50 mM DPC. Die roten Rechtecke zeigen NOEs von der Seitenkette des R5 zu den Seitenketten des W4 und des F6. Aus dem Kontakt mit den Aromaten resultiert eine starke Hochfeldverschiebung der R5-Protonen.

inphase-COSY basierend auf dem HNHA-Experiment aufgezeichnet. Heteronukleare Techniken kamen aufgrund der zu geringen Konzentration nicht zum Einsatz. Für die Peptide c-RY, c-KW, c-RNal, c-RW2 und c-RW3 wurde derselbe Spektrensatz in Gegenwart von DPC-Mizellen unter gleichen Bedingungen aufgenommen.

Die Zuordnung der Resonanzen erfolgte über ein konventionelles sequenzspezifisches Assignment basierend auf den NOESY-, ROESY- und TOCSY-Spektren. Die Spinsysteme wurden in den TOCSY-Spektren identifiziert und anschließend durch die  $H^{\alpha}_i-H^{N}_{i+1}$  (sequentiellen) Kreuzsignale in den NOESY- bzw. ROESY-Spektren verknüpft. Aromatische Spinsysteme wurden unter Verwendung von TOCSY- und DQF-COSY-Spektren zugeordnet und durch NOE-Signale zwischen den aromatischen Protonen und Seitenkettenprotonen den jeweiligen Aminosäuren zugeordnet. Eine vollständige Resonanzzuordnung wurde auf diese Weise für c-RW in allen drei Lösungsmittelsystemen und für c-

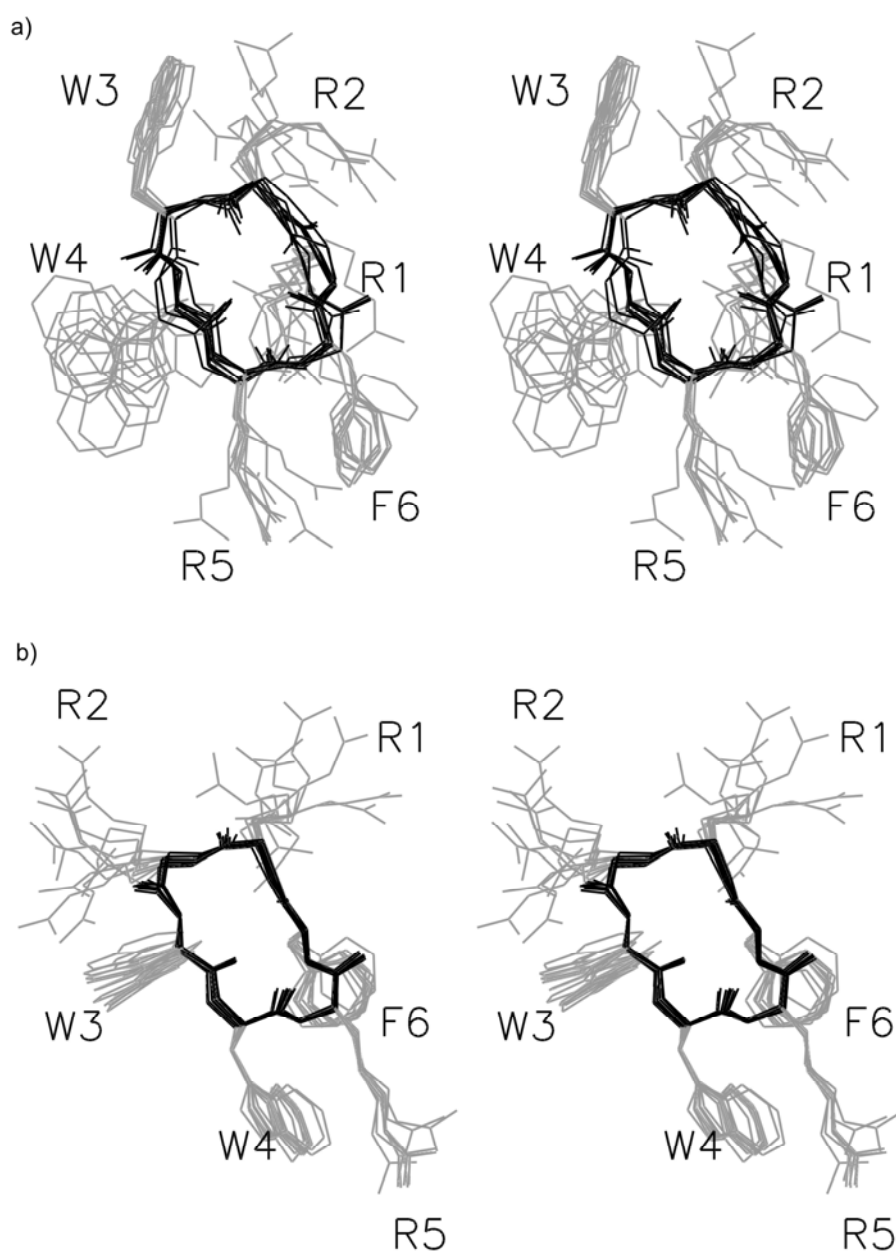
RY, c-KW, c-RW2 und c-RW3 gebunden an DPC-Mizellen erhalten. Die Zuordnung aromatischer Protonen der Naphthylalanine des c-RNal war aufgrund von Signalüberlagerungen unvollständig. Da die chemische Verschiebung ein Indikator für räumliche Struktur ist, wies bereits die Zuordnung darauf hin, dass das c-RW-Peptid in Wasser eine andere Struktur annimmt als mizellgebundenes Peptid. Aus ähnlichen Resonanzmustern bei SDS- bzw. DPC-gebundenem Peptid lies sich schlussfolgern, dass es sich bei diesen mizellgebundenen Peptiden um ähnliche Raumstrukturen handelte.

### 3.1.2. Struktur des c-RW

Wie erwähnt, wurde für das Modellpeptid c-RW die Struktur in Wasser sowie gebunden an SDS- und DPC-Mizellen untersucht. Die Strukturen des c-RW wurden aus den Abständen, die aus den NOE- und ROE-Intensitäten abgeleitet wurden, und den Torsionswinkeln basierend auf den homonuklearen Kopplungskonstanten errechnet.

Wie für ein zyklisches Hexapeptid zu erwarten ist, erschien c-RW in Wasser eher flexibel, was sich durch eine eher geringe Anzahl an ROEs äußerte. Die errechnete Raumstruktur erwies sich daher als weniger gut definiert als die nachfolgenden mizellgebundenen Strukturen (Abbildung 12a). Das Rückgrat bildet zwei  $\beta$ -Schleifen, so dass die Aminosäure R2 in der  $i+1$ -Position und W3 in der  $i+2$ -Position der ersten Schleife sowie die Aminosäure R5 an der  $i+1$ -Position und F6 an der  $i+2$ -Position der zweiten Schleife zu finden sind.

Die Struktur ändert sich jedoch dramatisch, wenn c-RW an SDS-Mizellen gebunden ist. Das Rückgrat bildet zwar immer noch zwei  $\beta$ -Schleifen, aber die Position der Schleifen ist derart verschoben, dass nun eine  $\beta$ I-Schleife mit  $i+1$  bei R1 und  $i+2$  bei R2 gebildet wird (Abbildung 12b). Eine  $\beta$ II'-Schleife hat ihre  $i+1$ -Position bei W4 und ihre  $i+2$ -Position bei R5. Dies resultiert in einem RMSD von 3,6 Å für alle Schweratome zwischen c-RW-Struktur in Wasser und gebunden an SDS-Mizellen. Die Amidprotonenregion des NOESY-Spektrums (Abbildung 11b)



**Abbildung 12: Stereodarstellung des c-RW.** a) in Wasser, b) gebunden an SDS-Mizellen. Es sind jeweils die 10 Konformere mit den niedrigsten Energien dargestellt.

zeigte eine deutliche Zunahme von Kreuzsignalen (Tabelle 5). Insbesondere NOEs zwischen Protonen der Aminosäureseitenketten erlaubten eine wesentlich genauere Bestimmung der Seitenkettenkonformation. Exemplarisch wird dies durch Kreuzsignale zwischen R5 und aromatischen Protonen verdeutlicht (rotes Rechteck in Abbildung 11b). Diese Seitenkette ist in engem Kontakt mit

ERGEBNISSE

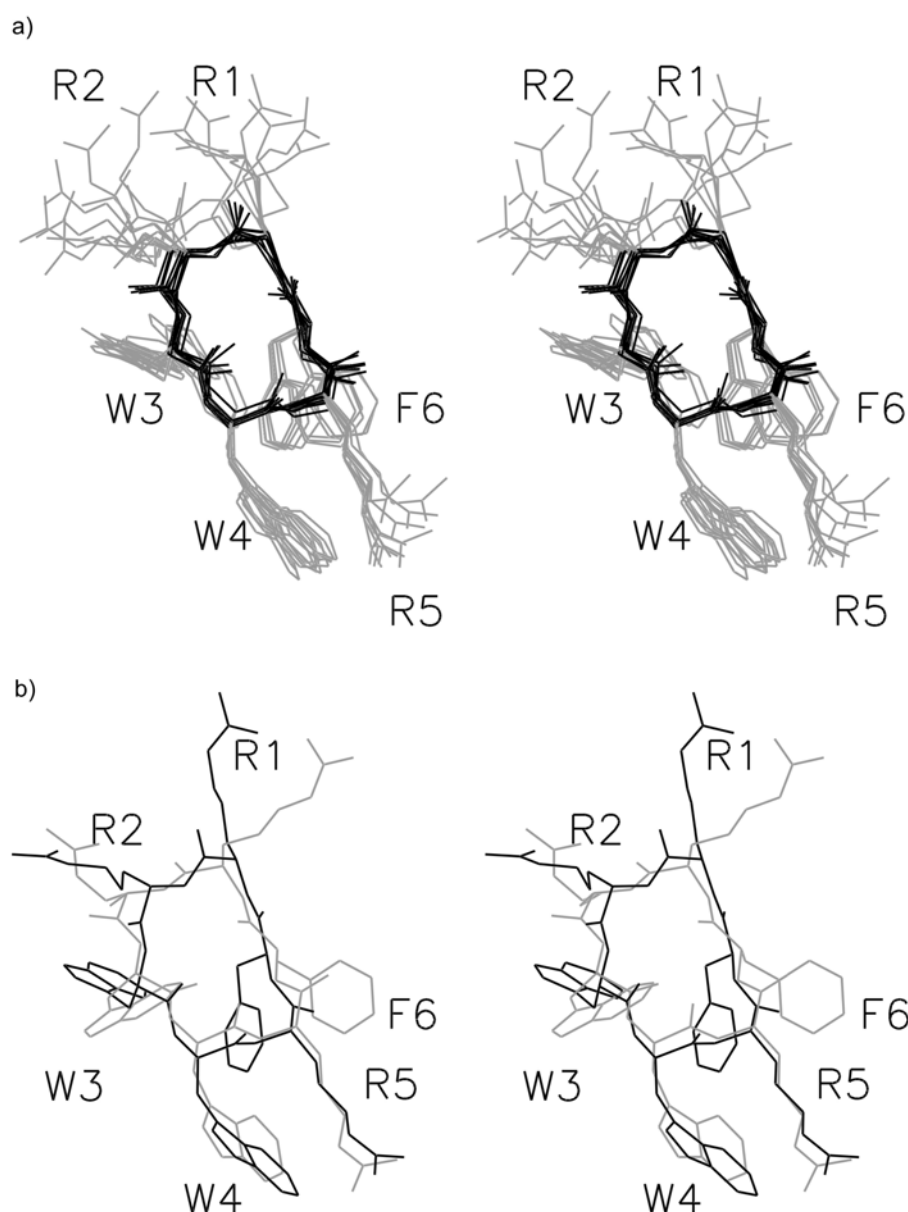
	c-RW/ H <sub>2</sub> O	c-RW/ SDS	c-RW/ DPC	c-RY	c-KW	c-RNal	c-RW2	c-RW3
<u>Abstandsgrenzen</u>								
gesamt	57	136	125	124	168	103	96	115
intraresidual	40	65	65	64	82	37	56	59
sequentiell	17	55	52	43	69	50	35	52
weitreichend	0	16	8	17	17	16	5	4
<u>Diederwinkel</u>	0	5	4	3	5	2	0	0
<u>I-Kopplungskonst.</u>	6	0	2	0	0	0	0	0
<u>Verletzungen &gt; 0,25 Å</u>	7	0	0	0	0	4	0	0
<u>RMSD</u>								
Rückgrat in Å	0,61 ± 0,20	0,15 ± 0,06	0,41 ± 0,13	0,15 ± 0,07	0,14 ± 0,10	0,39 ± 0,14	0,16 ± 0,07	0,61 ± 0,18
Schweratome in Å	1,90 ± 0,34	1,38 ± 0,30	1,94 ± 0,48	1,66 ± 0,28	0,60 ± 0,20	2,08 ± 0,55	1,40 ± 0,30	2,42 ± 0,59
<u>PDB-Kode</u>	-	1QVL	1QVK	1SKI	1SKK	1SKL	-	-

**Tabelle 5: Restraints und Ergebnisse der NMR-Strukturrechnungen.**

Aromaten der Aminosäuren W4 und F6, was eine starke Hochfeldverschiebung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Protonen von fast 2 ppm bewirkt. Eine Gruppierung der aromatischen Seitenketten auf einer Seite des Moleküls ist deutlich erkennbar.

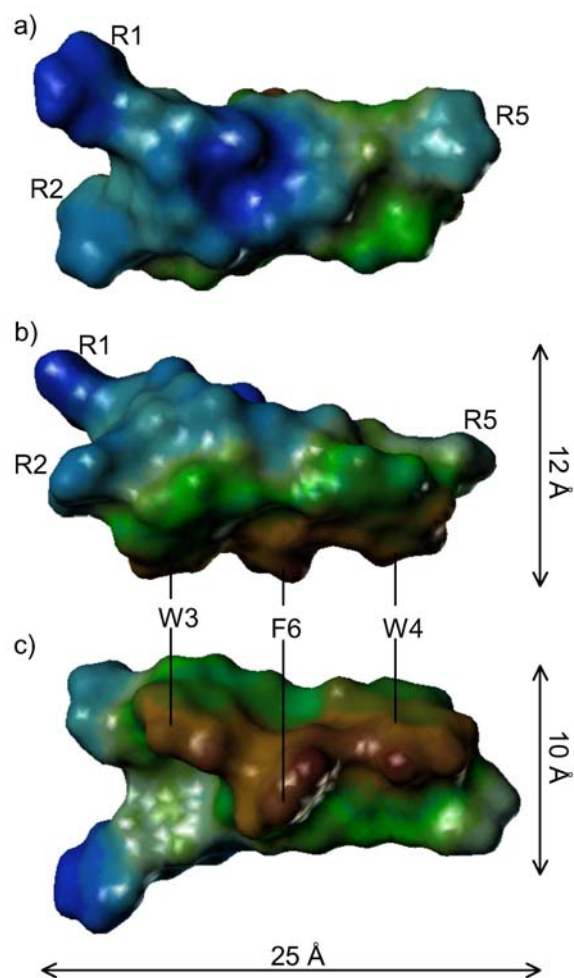
Die Struktur des c-RW gebunden an DPC-Mizellen stellte sich als sehr ähnlich im Vergleich mit der SDS-gebundenen Struktur heraus, mit einem RMSD zwischen den Schweratomen der gemittelten Strukturen von 1,7 Å. Dies war bereits aus dem NOESY-Spektrum (Abbildung 11c) ersichtlich, das nur geringe Unterschiede zwischen den Resonanzen der Peptidsignale aufwies. Erneut waren NOEs zwischen den Seitenketten in großer Zahl vorhanden, was wieder am Beispiel der Seitenkette des R5 zu den aromatischen Protonen gezeigt ist (rotes Rechteck in Abbildung 11c). Das berechnete Strukturensamble ist in Abbildung 13a gezeigt. Eine Überlagerung der beiden mizellgebundenen Strukturen ist in Abbildung 13b dargestellt.

Wie bei SDS-gebundenem c-RW zeigt sich auch bei DPC-gebundenem c-RW eine deutliche Gruppierung der aromatischen Seitenketten auf der einen Seite des Moleküls, während die andere Seite durch das Rückgrat und die Argininseitenketten gebildet wird. Dies resultiert in einer amphipathischen Struktur.



**Abbildung 13: Stereodarstellung des c-RW.** a) c-RW gebunden an DPC-Mizellen, es sind die 10 Konformere mit der niedrigsten Energie abgebildet. b) Überlagerung der Strukturen mit dem geringsten RMSD zur mittleren Struktur, grau - gebunden an SDS-Mizellen, schwarz - gebunden an DPC-Mizellen.

Abbildung 14 zeigt das lipophile Potential, aufgetragen auf die Oberfläche des DPC-gebundenen c-RW. Die hydrophobe Seite wird durch die aromatischen Aminosäuren gebildet (Abbildung 14c) und das Rückgrat auf der gegenüberliegenden Seite bildet den hydrophilen Teil des Moleküls (Abbildung 14a).



**Abbildung 14: Lipophiles Potential aufgetragen auf die Oberfläche des c-RW.** a) Sicht auf das Peptidrückgrat, b) Seitenansicht, c) Sicht auf die Aromatenseite. braun - hydrophobe Bereiche, blau - hydrophile Bereiche. Durch die Aromaten auf der einen Seite und das hydrophile Rückgrat und die Argininsideketten auf der anderen wird eine ausgeprägte amphipathische Struktur erzeugt.

### 3.1.3. Strukturen von c-RY, c-KW und c-RNal

Die Strukturen der verwandten Peptide c-RY, c-KW und c-RNal wurden lediglich gebunden an DPC-Mizellen bestimmt, um aus einem Vergleich der Strukturen mit dem Modellpeptid c-RW Rückschlüsse auf funktionell wichtige Gruppen dieser Peptide ziehen zu können. Bei c-RY und c-RNal waren die Tryptophane durch Tyrosine bzw. Naphthylalanine ersetzt, bei c-KW waren die Arginine durch Lysine ersetzt.



Es besteht eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zwischen den Strukturen des c-RY (Abbildung 15a) und des c-KW (Abbildung 15b) im Vergleich mit mizellgebundenem c-RW. In beiden Fällen bildet das Rückgrat eine  $\beta$ I-Schleife mit der i+1-Position bei Aminosäure 1 und i+2 bei Aminosäure 2. Außerdem existiert eine  $\beta$ II'-Schleife mit i+1 bei Aminosäure 4 und i+2 bei Aminosäure 5. Die Orientierung der Seitenketten ist vergleichbar mit mizellgebundenem c-RW, resultierend in einer amphipathischen Struktur. Der RMSD-Wert zwischen identischen Schweratomen der gemittelten Strukturen betrug 0,96 Å zwischen c-KW und DPC-gebundenem c-RW und 1,59 Å zwischen c-RY und DPC-gebundenem c-RW.

Das berechnete Strukturensamble für c-RNal gebunden an DPC-Mizellen ist weniger gut, aber dennoch ausreichend definiert (Abbildung 15c). Die Konformation des Rückgrates ist im Vergleich mit den vorangegangenen Strukturen dahingehend abweichend, dass die  $\beta$ -Schleifen nicht in eine der definierten Kategorien fallen. Dennoch sind die Seitenketten ähnlich orientiert, wie im Falle des DPC-gebundenen c-RW, so dass die aromatischen Seitenketten und das gegenüberliegende Rückgrat eine definierte amphipathische Struktur bilden.

Aus der Ähnlichkeit der Strukturen lässt sich generell schließen, dass durch eine Substitution bedingte Unterschiede in der Aktivität nicht auf eine veränderte Raumstruktur zurückzuführen sind. Vielmehr ist die Ursache für Aktivitätsunterschiede durch andere Eigenschaften der Seitenketten begründet, wie in Kapitel 4.1.2 genauer diskutiert wird.

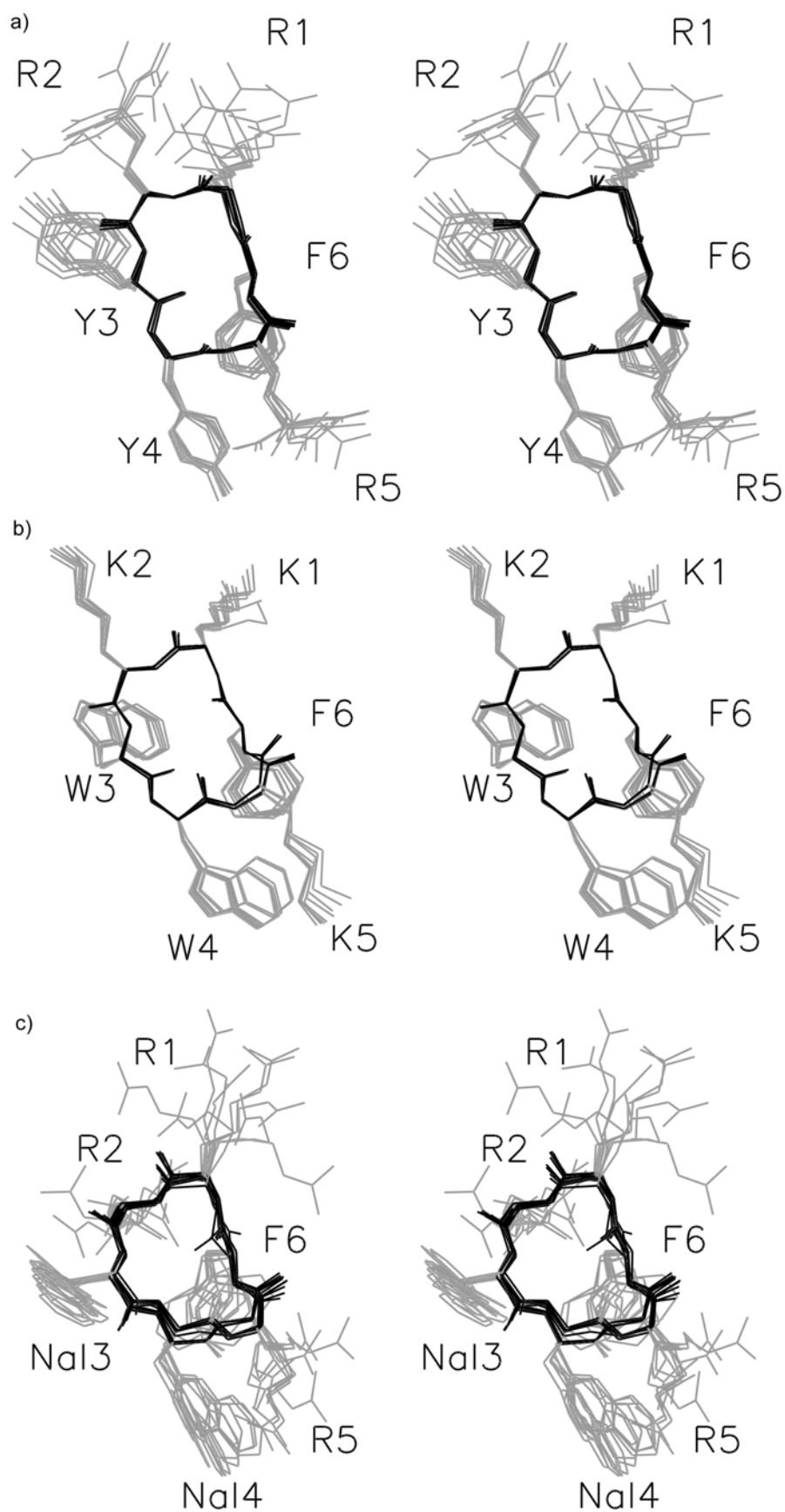


Abbildung 15: Strukturen der c-RW-Analoga gebunden an DPC. a) c-RY, b) c-KW, c) c-RNaI.

### 3.1.4. Strukturen von c-RW2 und c-RW3

Die untersuchten Peptide c-RW2 und c-RW3 unterscheiden sich von c-RW dadurch, dass die Sequenz derart verändert ist, dass die aromatischen Aminosäuren benachbart sind. Sie wurden untersucht, um den Einfluss der räumlichen Anordnung der Seitenketten auf die Aktivität der Peptide genauer zu untersuchen. Auch hier nahm das Rückgrat eine Konformation an, bei der jeweils zwei  $\beta$ -Schleifen ausgebildet wurden (Abbildung 16). Bei c-RW2 wurde eine

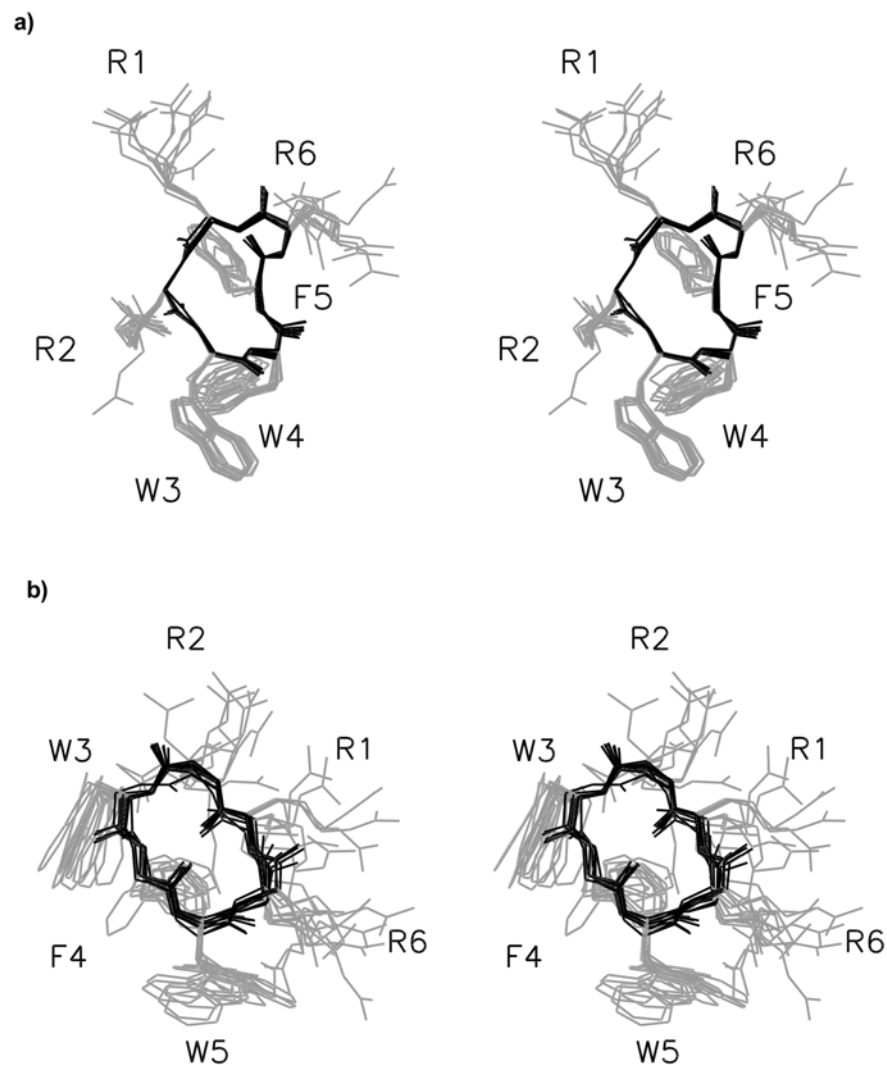
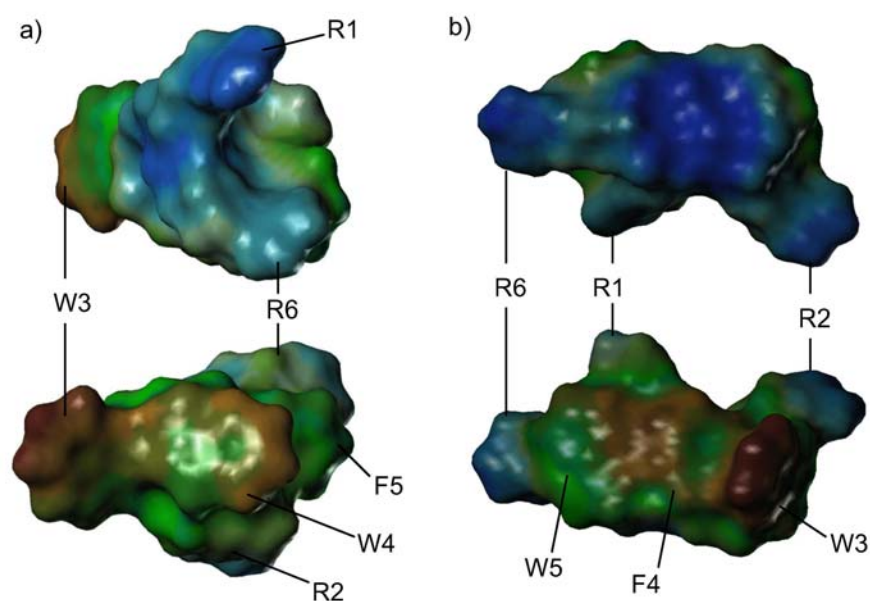


Abbildung 16: Stereodarstellung der Strukturen der c-RW-Analoga gebunden an DPC-Mizellen. a) c-RW2 b) c-RW3.

$\beta$ I-Schleife mit W3 in der i+1-Position und W4 in der i+2-Position sowie eine Schleife bei R6 und R1, die in keine der üblichen Kategorien fiel, ausgebildet. Das c-RW3-Peptid bildete Schleifen des  $\beta$ II'-Typs mit i+1 bei R2 und i+2 bei W3 sowie des  $\beta$ I-Typs mit i+1 bei W5 und i+2 bei R6 aus.

Beide Peptide wiesen im Vergleich mit c-RW weniger NOEs zwischen den Seitenketten auf. Dennoch waren die Strukturinformationen ausreichend, um die Konformation der Seitenketten zu bestimmen (Abbildung 16a). Es zeigte sich, dass bei c-RW2 die Aromaten in weniger enger, räumlicher Gruppierung auftreten, sich aber dennoch auf einer Seite der Moleküls befinden. Sie bilden mit den Argininen und dem Rückgrat als Gegenpol eine amphipathische Struktur (Abbildung 17a). Auch bei c-RW3 sind die aromatischen Seitenketten auf einer Seite des Moleküls organisiert (Abbildung 16b) und rufen dadurch eine amphipathische Struktur hervor (Abbildung 17b).

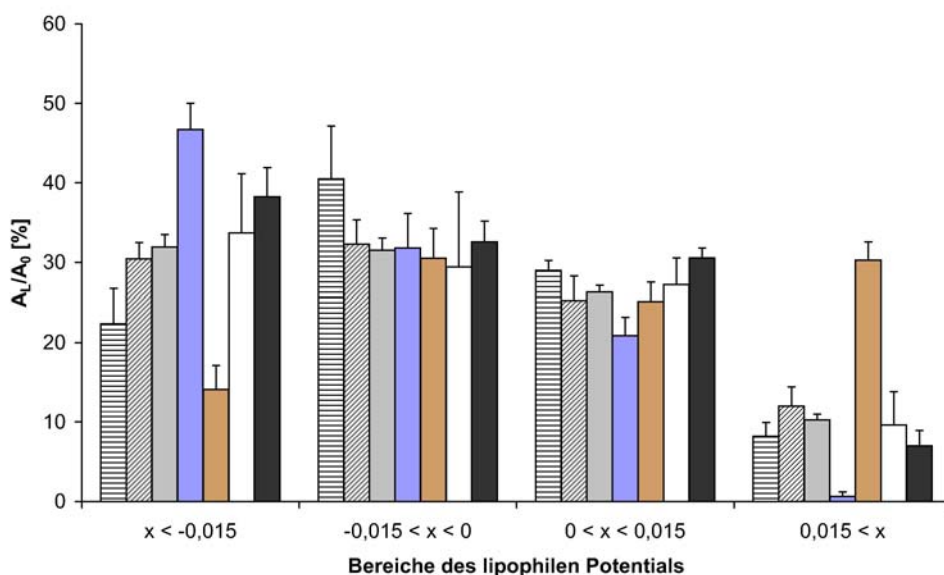
Die Peptide c-RW2 und c-RW3 haben somit außer einer amphipathischen Struktur kaum Ähnlichkeiten in der räumlichen Struktur mit c-RW. Sie weisen dennoch ähnliche antimikrobielle Aktivitäten auf wie c-RW. Die einzige Anforderung an die Konformation scheint daher die Ausbildung einer amphipathischen Struktur zu sein.



**Abbildung 17: Lipophiles Potential aufgetragen auf die Oberflächen des c-RW2 und des c-RW3.**  
Oben - Sicht auf die hydrophile Seite, unten - Sicht auf die hydrophobe Seite, a) c-RW2, b) c-RW3.

### 3.1.5. Verteilung hydrophober und hydrophiler Bereiche

Um die Rolle der amphipathischen Struktur im Hinblick auf die Aktivität der Peptide zu verstehen, wurde das lipophile Potential für alle Strukturen berechnet. Die Oberfläche wurde in Abhängigkeit dieses Potentials in vier Regionen unterteilt und der Anteil jeder Region an der Gesamtoberfläche berechnet (Abbildung 18). Für c-RW gebunden an SDS- und DPC-Mizellen und c-KW zeigte sich eine ausgewogene Verteilung hydrophiler und hydrophober Eigenschaften, wobei der Großteil der Oberfläche mäßig hydrophil und hydrophob war. Für c-RY wurde festgestellt, dass der größte Teil der Oberfläche stark hydrophil war, es fehlten aber stark hydrophobe Regionen. Eine breitere Verteilung zeigte sich für c-RNal mit Regionen mäßig hydrophiler Eigenschaften und mit Regionen starker Hydrophobizität. Für die Peptide c-RW2 und c-RW3 ergab sich ein Verhältnis, das der ausgewogenen Verteilung bei c-RW ähnelte.



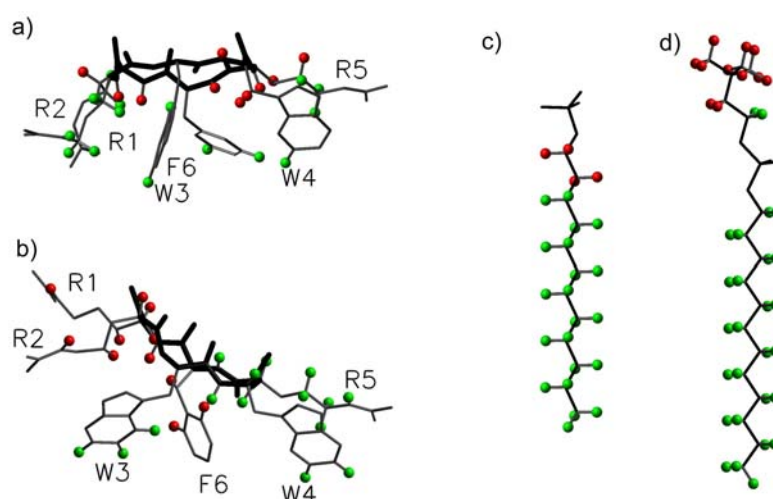
**Abbildung 18: Verteilung lipophiler und hydrophiler Regionen.** Es ist der Anteil der Oberfläche innerhalb unterschiedlicher Bereiche des lipophilen Potentials  $A_L$  an der Gesamtoberfläche  $A_0$  dargestellt für: quer gestreift - c-RW gebunden an SDS, diagonal gestreift - c-RW gebunden an DPC, grau - c-KW, blau - c-RY, braun - c-RNal, weiß - c-RW2, schwarz - c-RW3, alle gebunden an DPC. Bereiche mit lipophilem Potential  $< 0$  stehen für hydrophile Bereiche, Bereiche  $> 0$  für hydrophobe Bereiche.

Es ist auffällig, dass die geringe antimikrobielle Aktivität des c-RY mit einem insgesamt stärker hydrophilen Charakter korrelierte, aber die stärkere Hydrophobizität des c-RNal nur von einer geringen Änderung der antimikrobiellen Aktivität begleitet war.

### 3.1.6. Orientierung des c-RW in der Mizelle

Zur Bestimmung der Orientierung des c-RW in der Mizelle wurden Relaxationsexperimente unter Verwendung der wasserlöslichen paramagnetischen Verbindung, Gd-(III)-DTPA, durchgeführt. Die erhaltenen longitudinalen Relaxationszeiten ( $T_1$ ) des Peptides in Anwesenheit des Gd-(III)-DTPA wurden mit denen in Abwesenheit des Relaxationsmittels verglichen. Für Protonen, die dem Lösungsmittel und damit dem Gd-(III)-DTPA, ausgesetzt waren, konnte eine starke Abnahme der  $T_1$  erwartet werden, während Protonen in der Mizelle geschützt und nur wenig beeinflusst waren. Es wurde darauf geachtet, dass Gd-(III)-DTPA in einer Konzentration verwendet wurde, so dass die transversale Relaxationszeit ( $T_2$ ) nicht zu stark beeinflusst wurde, um Überlappungen der Signale aufgrund von Linienverbreiterung zu verhindern. Zur Skalierung der Position des Peptides innerhalb der Mizelle wurde auch die  $T_1$  der Protonen nicht-deuterierter Detergenzien untersucht (Abbildung 19c und d). Nach dem Verhältnis der  $T_1$  in Anwesenheit und Abwesenheit des Gd-(III)-DTPA können Protonen in zwei Klassen unterteilt werden (Abbildung 19a und b).

Bei SDS-gebundenem Peptid wiesen die Relaxationsdaten darauf hin, dass das Rückgrat parallel zur Wasseroberfläche orientiert war und die Seitenketten ins Mizellinnere zeigten. Die Aromaten zeigten die beste Abschirmung vor dem Relaxationsmittel.



**Abbildung 19: Bestimmung longitudinaler Relaxationszeiten des c-RW.** Es wurde die Orientierung des c-RW in Bezug auf die Mizelloberfläche untersucht. Es wurden  $T_1$  in Gegenwart von 0,3 mM Gd-DTPA ( $T_1^{Gd}$ ) und  $T_1$  in Abwesenheit des Gd-DTPA ( $T_1^0$ ) für Protonen bestimmt. Rote Kugeln entsprechen  $T_1^{Gd}/T_1^0 < 0,6$  (Lösungsmittel-exponiert) und grüne Kugeln  $T_1^{Gd}/T_1^0 > 0,6$  (weniger Lösungsmittel-exponiert). a) SDS-gebundenes c-RW, b) DPC-gebundenes c-RW, c) SDS (Sulfatgruppe oben), d) DPC (Cholingruppe oben).

Zur Überprüfung dieser Feststellung können auch die NOEs zwischen nicht-deuterierten Mizellen und Peptiden untersucht werden, die ebenfalls Schlüsse über die Orientierung zulassen. Es wurden NOEs zwischen Protonen der aromatischen Seitenketten und Protonen der Alkylketten des SDS beobachtet. Andere Peptidprotonen wiesen keine NOEs zu diesem Teil des Detergenz auf. Dies spricht für die festgestellte Orientierung.

Das c-RW-Peptid gebunden an DPC-Mizellen zeigte ein leicht abweichendes Verhalten, indem das Molekül ein wenig geneigt gegenüber der Mizelloberfläche war. Die Seitenketten von R1 und R2 wiesen einen Unterschied im Relaxationsverhalten auf und waren stärker dem Relaxationsmittel ausgesetzt. Die aromatischen Seitenketten waren hingegen besser abgeschirmt.

Auch hier wurden die NOEs zwischen Peptid und nicht-deuteriertem DPC untersucht, um die Ergebnisse der Relaxationsmessungen zu verifizieren. Es wurden ebenfalls NOEs zwischen Protonen der aromatischen Seitenketten und Protonen der Alkylketten des DPC beobachtet. Andere Peptidprotonen wiesen keine NOEs zu diesem Teil des Detergenz auf. Dies spricht also ebenfalls für die

festgestellte Orientierung, bei welcher der hydrophile Teil des Moleküls, gebildet durch Rückgrat und Argininseitenketten, dem Wasser zugewandt ist, während die hydrophobe Seite, gebildet durch die Aromaten, ins Mizellinnere weist.

## 3.2. Moleküldynamiksimulation

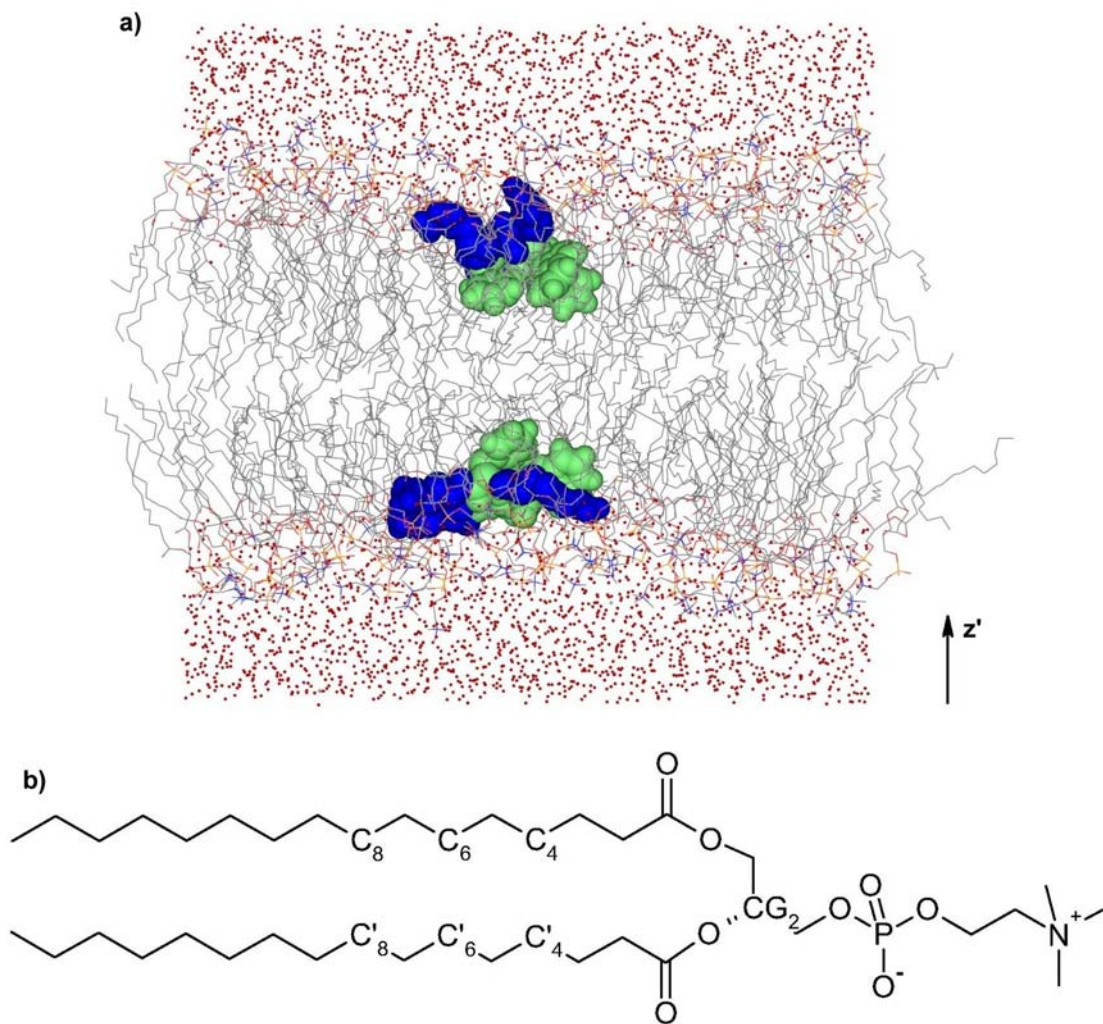
### 3.2.1. Aufbau und Äquilibration der Peptid-Membran-Simulationen

Ein wesentliches Ziel der Moleküldynamiksimulation war es, die Gültigkeit der Information über Konformation, Lokalisation und Orientierung, die aus den NMR-Untersuchungen des c-RW gebunden an Mizellen gewonnen wurde, für Lipidmembranen zu überprüfen. Hierzu wurden Membransysteme bestehend aus Lipiddoppelschichten von 128 DPPC Molekülen (Abbildung 20) über einen Zeitraum von mehr als 100 ns simuliert (exakte Simulationszeiten siehe Tabelle 6). Die Zahl der Peptide, die in der Membran eingebettet waren, betrug 0, 2 bzw. 12, im Folgenden als 0/128-, 2/128- bzw. 12/128-Simulation bezeichnet. Sie wurden gleichmäßig auf beide Seiten der Membran verteilt, um eine gleich-

System	$t_{\text{ges}}$ [ns]	$D^{\#}$ Peptid [ $\times 10^{-7}$ cm <sup>2</sup> /s]	$D^{\#}$ Lipid [ $\times 10^{-7}$ cm <sup>2</sup> /s]	Membr. Fläche [nm <sup>2</sup> ]	Lipid- Fläche[ nm <sup>2</sup> ] §	$S_{\text{CD}}^{\P}$	$\Delta G_{\text{max}}^{\parallel}$ [kJ/mol]	Barriere- breite ** [nm]
0/128	100	-	4,2±1,5	41,8±0,6	0,65	0,193	27,9±1.9	1,4
0/64	136	-	5,1±1,4	20,9±0,5	0,65	0,195	28,4±3.4	1,5
0/64 *	50	-	12,6±4,1	22,0±0,4	0,69	0,181	27,0±1.2	1,5
2/128	100	1,0±0,25	3,8±1,6	41,3±0,6	0,62	0,206	29,0	1,5
12/128	128	0,5±0,1	1,3±0,6	43,8±0,8	0,55	0,205	28,7±1,7	0,9
12/128*	10	8,9±6,1	3,7 ±3,5	44,3±0,4	0,56	0,194	24,8	0,7

**Tabelle 6: Eigenschaften der simulierten Membransysteme.** \* Simulationstemperatur 353 K; # lateraler Diffusionskoeffizient ; § eine Fläche von 1,4 nm<sup>2</sup> pro Peptid vorausgesetzt; ¶ Deuteriumordnungsparameter für C<sub>4</sub> und C<sub>4</sub>, Standardabweichung etwa 1 %; || Maximum der freien Enthalpie des Wassers; \*\* Breite der Freien-Enthalpie-Barriere des Wassers bei 20 kJ/mol.

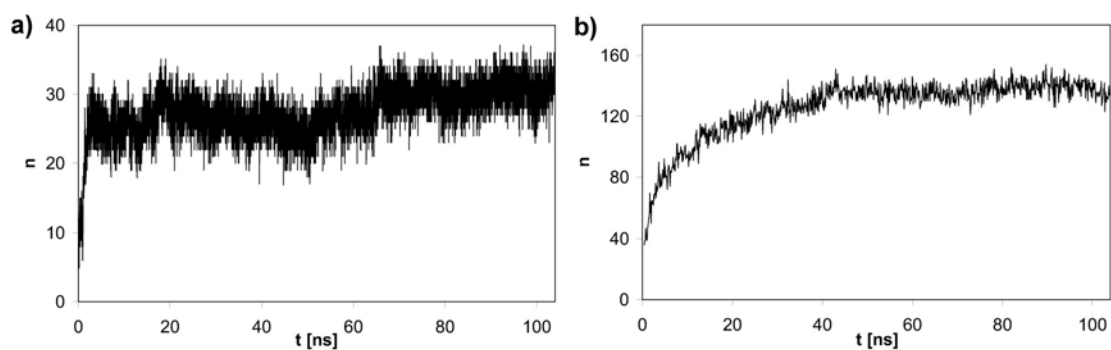




**Abbildung 20: Membransimulation.** a) 2/128-Simulation, dunkelblau - Arginine, grün - aromatische Aminosäuren, grau - DPPC-Acylketten, rot - Wassermoleküle. b) DPPC-Molekül mit der verwendeten Nomenklatur.

mäßige Ausdehnung beider Membranseiten zu gewährleisten. Bei einem natürlichen Membransystem ist die einseitige Ausdehnung einer Membran möglich, sie würde in einer Krümmung der Oberfläche resultieren. Bei den hier verwendeten periodischen Randbedingungen („periodic boundary conditions“) ist eine solche Krümmung nicht möglich, die Membran muss daher beidseitig expandiert werden.

Als Startstruktur wurde die DPC-gebundene Konformation gewählt und es wurden Simulationen jeweils mit und ohne Verwendung der Distanzgrenzen durchgeführt, um deren Einfluss abschätzen zu können.



**Abbildung 21: Peptid-Lipid-Wasserstoffbrücken.** Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen  $n$  im Verlauf der Simulationen zwischen Peptiden und Lipiden für a) die 2/128-Simulation, b) die 12/128-Simulation.

Bei der 2/128-Simulation wurden die Peptide unter der Verwendung des Programms „HOLE“ [142] direkt in die Lipid-Wasser-Grenzfläche, wie durch die NMR-Daten bestimmt, eingesetzt. Dies hatte eine schnelle Äquilibration des Systems zur Folge, was sich durch ein rasches Konvergieren der Lipidquerschnittsfläche, der Deuteriumordnungsparameter und der Zahl der Peptid-Lipid-Wasserstoffbrücken äußerte (Abbildung 21a). Nach 8 ns wurde das System als äquilibriert betrachtet und die nachfolgenden Daten zur Auswertung herangezogen.

Die 12/128-Simulationszelle wurde konstruiert, indem aus der 2/128-Zelle Wasser und Chloridionen entfernt wurden und 5 Peptide auf jeder Seite über der Membran im Vakuum platziert wurden. Es wurden Wasser und Ionen jenseits der Peptide hinzugefügt und die Zelle bis zu einer Dichte von  $1 \text{ g/cm}^3$  komprimiert. Die Äquilibration dauerte entsprechend länger (Abbildung 21b). Es wurden daher nur die Daten nach 28 ns Simulation zur Auswertung der 12/128-Simulation verwendet.

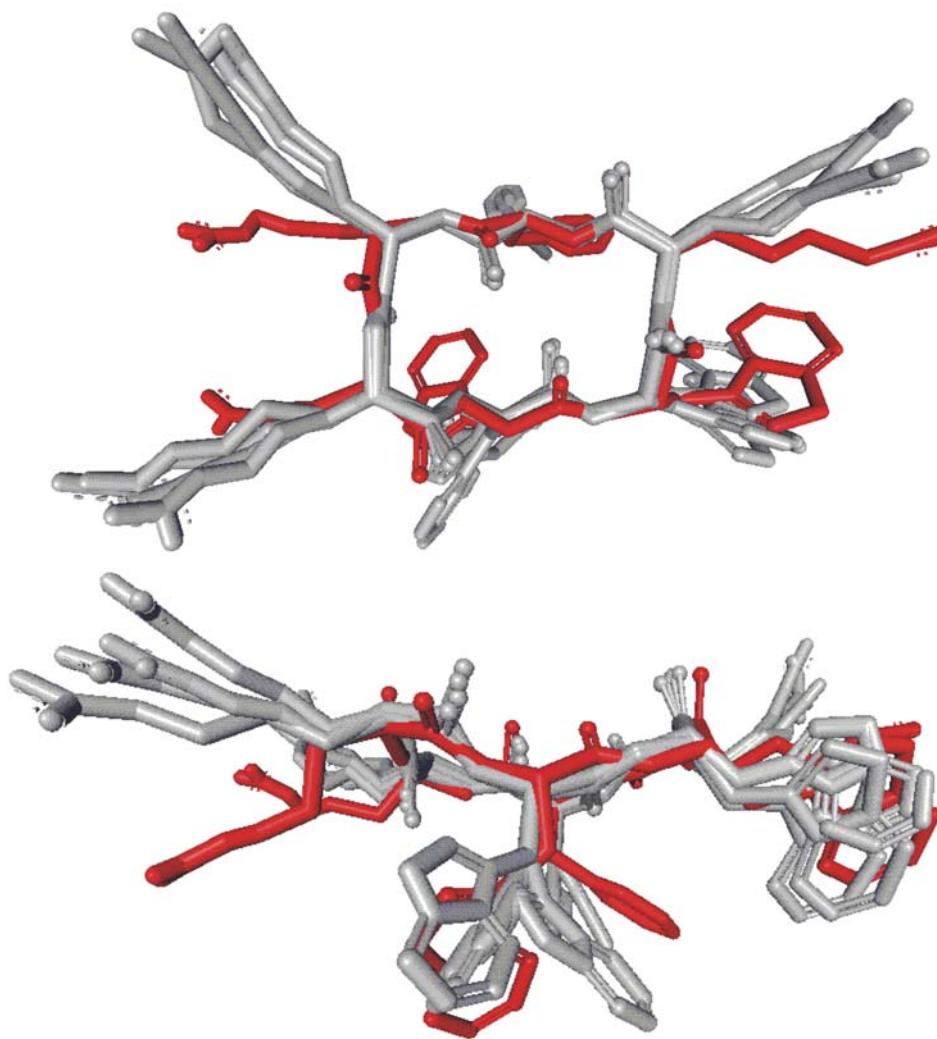
### 3.2.2. Peptidstruktur

Zur Analyse der Struktur der Peptide wurden die Koordinaten in regelmäßigen Abständen hinsichtlich des RMSD der Konformationen untereinander und im Vergleich mit den NMR-Strukturen ausgewertet (Tabelle 7). Es zeigte

sich, dass die Strukturen der Simulationen denen der NMR-Untersuchungen sehr ähnlich waren, unabhängig von der Verwendung der NMR-Abstandsgrenzen (Abbildung 22). Das Rückgrat bildete die  $\beta$ -Schleifen an den selben Positionen wie in der NMR-Struktur aus. Leichte Abweichungen waren in der Konformation der Seitenketten zu erkennen, zum Beispiel existierten für F6 zwei unterschiedliche Rotamere, während in der NMR-Struktur nur eine Orientierung in Richtung R5 zu finden war. Dennoch war die Orientierung der Seitenketten ähnlich, so dass auch hier eine Gruppierung der aromatischen Seitenketten auf der einen Seite des Moleküls resultierte. Die andere Seite wurde erneut durch das Rückgrat und die Argininseitenketten gebildet, was dem Peptid eine ausgeprägte amphipathische Struktur gab. Die Tatsache, dass die Strukturen unter Verwendung und unter Ausschluss der Abstandsgrenzen der NMR-Struktur nahezu identisch waren, zeigte, dass die Struktur durch die Interaktion mit der Membran stabilisiert wurde und nicht nur durch die Abstandsgrenzen induziert wurde.

System	Zahl der Strukturen	RMSD, Rückgrat [Å]	RMSD, Schweratome [Å]	RMSD zur NMR-Struktur, Rückgrat [Å]	RMSD zur NMR-Struktur, Schweratome [Å]
NMR *	10	0,41 ± 0,13	1,94 ± 0,48	-	-
2/128 #	40	0,57 ± 0,057	2,98 ± 0,22	0,45	2,25
2/128 §	160	0,57 ± 0,051	2,53 ± 0,40	0,44	1,97
12/128 #	96	0,60 ± 0,21	2,86 ± 0,62	0,43	2,00
12/128 §	168	0,55 ± 0,21	2,83 ± 0,65	0,44	2,12

**Tabelle 7: Vergleich der Strukturen aus der Simulation mit den NMR-Strukturen.** \* NMR-Struktur gebunden an DPC-Mizellen, # Simulation mit Abstandsgrenzen, § Simulation ohne Abstandsgrenzen.

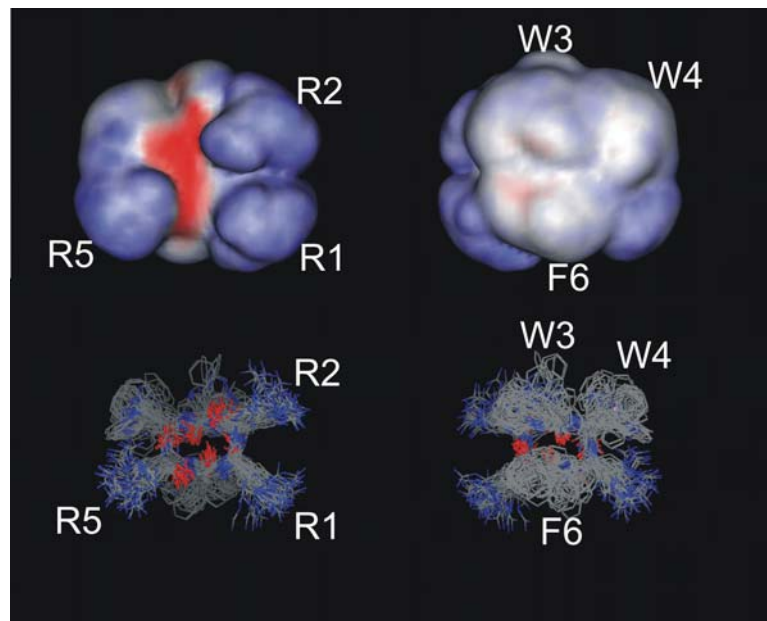


**Abbildung 22: Vergleich der NMR- und MD-Strukturen.** Es sind die NMR-Struktur (rot) und die Durchschnittsstrukturen der Moleküldynamik der 2-128 und der 12/128-Simulation jeweils mit und ohne Abstandsgrenzen (grau) überlagert, oben - Sicht auf das Rückgrat, unten - Seitenansicht.

Um die effektive Form des Peptides zu verdeutlichen, wurde die Oberfläche über ein Ensemble von Peptiden berechnet (Abbildung 23). Dieses Ensemble bestand aus je 108 Konformationen der 12 Peptide der 12/128-Simulation. Es zeigte eine halbkugelähnliche Struktur, deren flache Seite durch die hydrophile Rückgratregion gebildet wurde. Die gewölbte Seite wurde durch die hydrophobe Aromatenseite gebildet.

Die Normale der Rückgratebene war in der 2/128-Simulation um  $20^\circ \pm 8^\circ$  bzw.  $15^\circ \pm 7^\circ$  gegen die Normale der Membranebene geneigt. Dabei war die Schleife bei R1 und R2 stärker dem Wasser exponiert als die Schleife bei W4 und R5. Dies ist im Einklang mit den Relaxationsexperimenten an DPC-gebundenem

c-RW und kann dadurch erklärt werden, dass die R1-R2-Seite hydrophiler ist als die W4-R5-Seite.



**Abbildung 23: Peptidstrukturen der 12/128-Simulation.** Es wurde die Oberfläche (oben) über ein Ensemble (unten) der Strukturen der 12/128-Simulation berechnet. Es entstand eine Halbkugel mit der flachen Seite (links) gebildet durch Rückgrat und Argininseitenketten, rot - negatives elektrostatisches Potential, blau - positives elektrostatisches Potential. Die runde Seite wurde durch die unpolaren Aromaten gebildet (rechts).

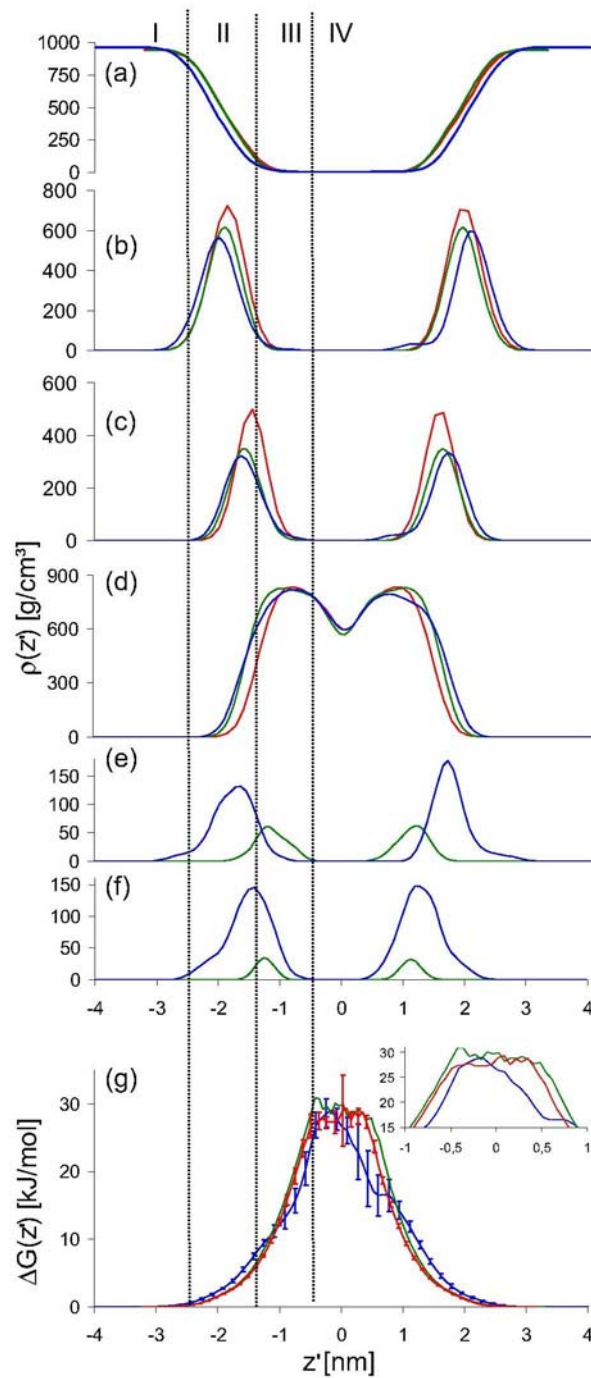
### 3.2.3. Partielle Dichten

Um die Lokalisation bestimmter Moleküle oder deren Teile innerhalb eines Membransystems zu veranschaulichen, wird üblicherweise ihre partielle Dichte entlang der Normalen der Membranebene  $z'$  aufgetragen. Anhand einer solchen Darstellung kann eine Membran in vier Regionen eingeteilt werden.

- I. die gestörte Wasserregion, in der die Wassermoleküle eine bevorzugte Orientierung aufweisen.
- II. die Membran-Wasser-Grenzschicht, die sich von der Region, in der Wasser und Lipide gleiche Dichten haben, bis zur Region mit einer Wasserdichte nahe Null erstreckt.
- III. die Region der geordneten Lipidketten, in der die Dichte der Lipidacylketten ihr Maximum erreicht.

IV. die Region der ungeordneten Lipidacylketten, in der die Lipiddichte ein Minimum erreicht.

Die Peptide befanden sich an der Membran-Wasser-Grenzfläche, wie in Abbildung 24 gezeigt. Die Orientierung der Peptide, die aus den NMR-Experimenten erhalten wurde, bestätigte sich in den Simulationen. Die Peptide der 12/128 Simulation zeigten nach der Äquilibration eine ähnliche Position und Orientierung, wie die Peptide der 2/128-Simulation, die zu Beginn der Rechnung in der Membran positioniert wurden. Der Kern aus aromatischen Aminosäureseitenketten befand sich tiefer in der Membran als das Rückgrat und die Argininseitenketten. Es ist bekannt, dass das Indol sein Minimum der freien Enthalpie ungefähr 1 nm entfernt von der Membranzentralebene erreicht [150], was ungefähr der hier bestimmten Platzierung entspricht. Die Argininseitenketten waren leicht aufwärts orientiert, was unter dem Begriff „Schnorcheln“ bekannt ist. Auf diese Weise konnten die Guanidinogruppen mit den Lipidkopfgruppen polare Wechselwirkungen eingehen, während der aliphatische Teil der Argininseitenketten näher am hydrophoben Kern der Membran lokalisiert war. Dieser Effekt war in der 12/128-Simulation stärker ausgeprägt und kann als Sättigung der Grenzflächen mit Guanidinogruppen interpretiert werden. Die Argininseitenketten suchten also vermehrt den Kontakt zum Wasser (siehe Kapitel 4.1.1).



**Abbildung 24: Partielle Dichten und Freie-Enthalpie-Barriere des Wassers.** Es sind partielle Dichten und Energiebarrieren entlang der Membrannormalen  $z'$  aufgetragen. Rot - 0/128-Simulation; grün - 2/128-Simulation; blau - 12/128-Simulation. Partielle Dichte: a) Wasser; b) Phosphocholin; c) Glycerol; d) Acylketten; e) Arginine; f) aromatische Aminosäuren; g) Freie-Enthalpie-Barriere des Wassers mit Standardabweichungen für 0/128- und 12/128-Simulation, g) rechts oben - Vergrößerung des Maximums. Die Membran kann in vier Teile unterteilt werden: I: gestörte Wasserregion, II: Membran-Wasser-Grenzschicht, III: Region der geordneten Lipidketten; IV: Region der ungeordneten Lipidketten.

### 3.2.4. Freie Enthalpie des Wassers

Durchdringt ein Wassermolekül eine Membran, so muss es eine Energiebarriere überwinden. Diese Energiebarriere lässt sich als freie Enthalpie mittels der Beziehung

$$\Delta G(z) = -kT \ln \rho_{\text{water}}(z')$$

als Funktion der partiellen Dichte des Wassers entlang der Normalen der Membranebene  $\rho_{\text{water}}(z')$  aus der Simulation ableiten, wobei  $k$  die Boltzmannkonstante und  $T$  die Simulationstemperatur ist (Abbildung 24g). Die Tatsache, dass der Fehler am Mittelpunkt der Membran deutlich zunahm, lässt sich auf die geringe Dichte des Wassers im Inneren der Membran zurückführen. Während der gesamten Simulation wurden nur wenige Passagen von Wassermolekülen durch die Membran beobachtet, was einen relativ hohen Fehler zur Folge hatte. Bei der 0/128-Simulation lag das Maximum bei  $27,9 \pm 1,8$  kJ/mol, was gut mit anderen Werten von 26 kJ/mol [151] vergleichbar ist. Das Maximum für die 12/128-Simulation ist mit  $28,7 \pm 1,7$  kJ/mol dem Maximum der 0/128-Simulation sehr ähnlich, dennoch ist die Form der Barriere sehr unterschiedlich. Während es sich bei der 0/128-Simulation bei diesem Maximum eher um ein Plateau handelte, hatte das Maximum bei der 12/128-Simulation eher eine Peakform. Die Breite auf einer Höhe von 20 kJ/mol hatte um 0,5 nm abgenommen (Tabelle 6). Es trat also mehr Wasser im hydrophoben Teil der Membran auf. Bei der 2/128-Simulation hatte die Breite bei 20 kJ/mol um 0,1 nm zugenommen. Diese geringe Zunahme hatte ihre Ursache in einem generellen Anschwellen der Membran, worauf später eingegangen wird (Kapitel 4.2.2).

### 3.2.5. Lipidquerschnittsfläche

Die Oberfläche der Membran ist ein wichtiges Mittel, die Kräfte innerhalb einer Lipiddoppelschicht zu analysieren. Die Angaben in der Literatur für die Querschnittsfläche eines DPPC-Moleküls schwanken, aber  $0,64 \text{ nm}^2$  ist eine gute

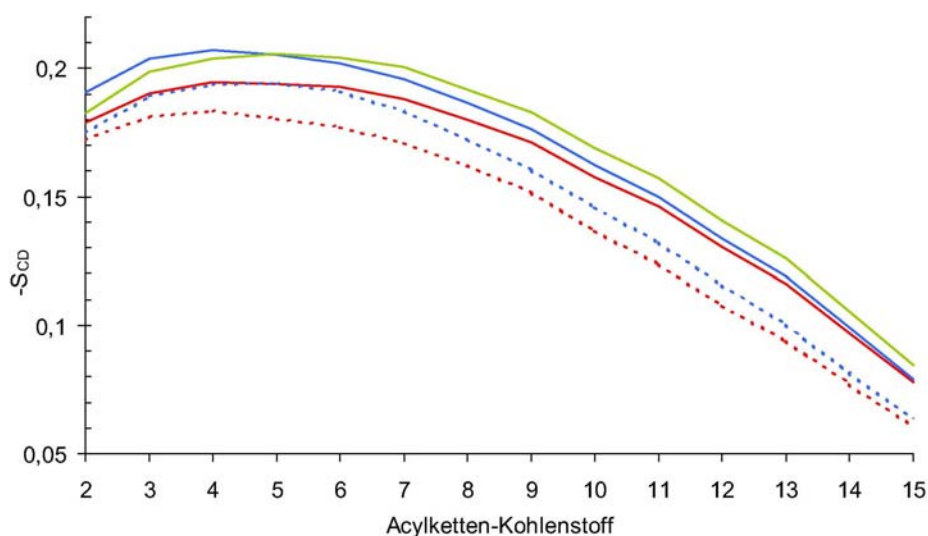


Näherung [152]. Die Werte, die von der 0/128-Simulation abgeleitet wurden (Tabelle 6), stimmten gut mit diesem Wert überein. Durch die Einführung von Peptiden in die Membranoberfläche war eine Zunahme der Gesamtoberfläche der Membran zu erwarten. Projiziert man die Peptidoberfläche auf die Membran, so nimmt diese ungefähr  $1,4 \text{ nm}^2$  ein. Würden sich die Oberflächen additiv verhalten, wäre eine Zunahme der Gesamtoberfläche der Membran um 3% für die 2/128-Simulation und um 18% für die 12/128-Simulation zu erwarten. Es zeigte sich jedoch, dass die Zunahme im Falle der 2/128-Simulation unbedeutend war und nur 5% für die 12/128-Simulation betrug (Tabelle 6). Demzufolge müssen die Lipide in Gegenwart der Peptide enger gepackt sein.

### 3.2.6. Deuteriumordnungsparameter

Um die Ordnung der Lipidacylketten zu beschreiben, verwendet man den Deuteriumordnungsparameter,  $S_{CD}$ . Dieser Parameter ist experimentell mittels Festkörper-NMR-Methoden für deuterierte Lipide zugänglich [153, 154]. Er beschreibt die Ordnung der Kohlenstoff-Deuterium-Bindung der Methylengruppen der Acylketten, wobei 0 einer isotropen Orientierung entspricht. Er lässt sich aber auch aus den Simulationen ableiten [155] und kann mit experimentellen Werten verglichen werden.

In der Nähe der Kopfgruppen ist dieser relativ hoch, was einem hohen Ordnungsgrad der Lipide durch ihre gleichförmige Ausrichtung in dieser Region entspricht. Diese Ordnung nimmt ab, je weiter man sich der Mitte der Membran annähert. In Gegenwart des c-RW war dieser Ordnungsparameter in der Region der geordneten Lipidacylketten (Abbildung 25) leicht erhöht. Dies mag auf den ersten Blick überraschend erscheinen, ist aber sinnvoll, bedenkt man, dass das System dichter gepackt war, was sich aus der Lipidquerschnittsfläche ergab. Die einzige Möglichkeit für die Lipide, ihren Querschnitt zu verringern, ist, sich stärker auszurichten und enger zu packen. Hauptsächlich die ersten 8-9 Methylengruppen waren davon betroffen, während der innere Teil der Membran weniger beeinflusst wurde.



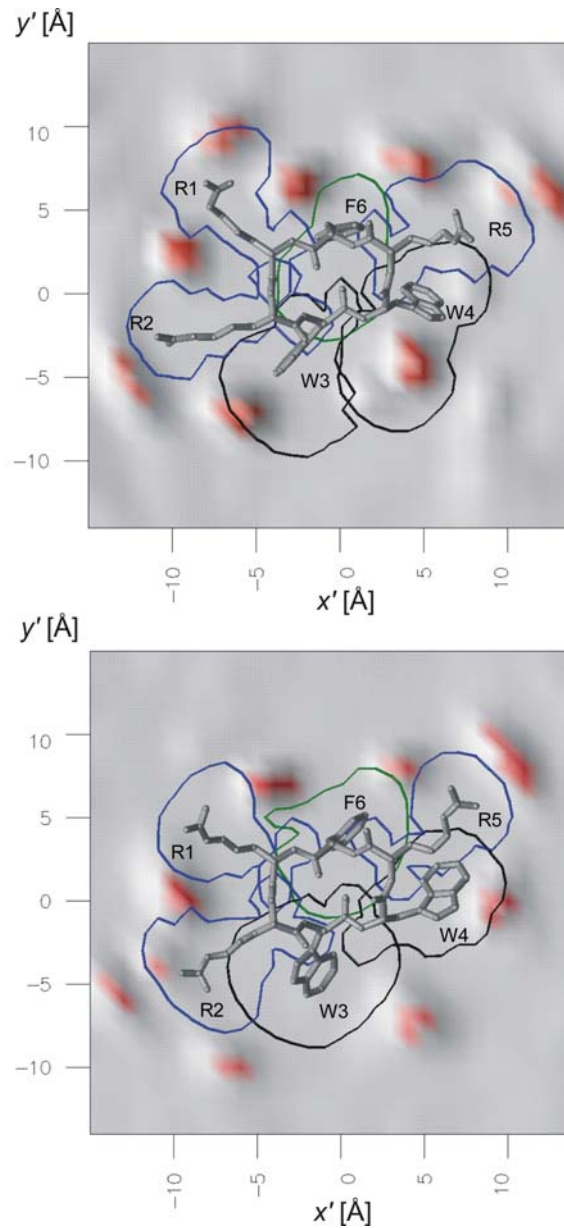
**Abbildung 25: Deuteriumordnungsparameter der DPPC-Acylketten.** rot - 0/128-Simulation; grün - 2/128-Simulation; blau - 12/128-Simulation; durchgezogene Linie - Simulationstemperatur 323 K; gestrichelte Linie - Simulationstemperatur 353 K. In Gegenwart der Peptide ist der Deuteriumordnungsparameter im oberen Teil der Acylketten um 0,01 erhöht. Eine Erhöhung der Temperatur bewirkt eine Reduktion der Ordnung in der 0/128- und 12/128-Simulation.

Da die Simulationstemperatur mit 323 K nah der Übergangstemperatur von der Gelphase zur flüssigkristallinen Phase bei 314,6 K lag, wurde eine weitere Simulation bei 353 K durchgeführt. Die erhöhte Simulationstemperatur beeinflusste die 0/128- und die 12/128-Simulation in ähnlicher Art und Weise, so dass der Ordnungsparameter um 0,01 Einheiten anstieg. Damit ist gezeigt, dass die Veränderung der Ordnungsparameter in Gegenwart der Peptide generelle Gültigkeit besitzt und nicht nur durch eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur hervorgerufen wurde.

### 3.2.7. Räumliche Organisation von Peptiden, Lipiden und Wasser

Um eine Vorstellung von der Organisation und Topologie der Lipide um ein Peptid zu erhalten, wurde das 2/128-System durch ein speziell angefertigtes Programm analysiert, welches im Methodenteil genauer beschrieben ist. Abbildung 26 zeigt die Population der Lipide um ein Peptid. Beide Peptide binden ungefähr acht Lipidmoleküle. Für diese Bindung sind in erster Linie die

Guanidinogruppen der Argininseitenketten verantwortlich. Auch an der Seitenkette des W4 ist eine erhöhte Lipidpopulation erkennbar.



**Abbildung 26: Verteilung der Lipide um die Peptide der 2/128-Simulation.** Der graue und rote Hintergrund zeigt die Verteilung der  $C_{G2}$ -Atome des DPPC während der 80 ns der Simulation ohne Abstandsgrenzen in einer Trajektorie aus 8000 Konformationen. In roten Bereichen wurden mehr als 500  $C_{G2}$  pro  $\text{\AA}^2$  gezählt, dies sind also Regionen mit hoher „Lipiddichte“. Die Peptidkonformationen sind die energieminierten gemittelten Strukturen. Die Linien um einzelne Aminosäuren stellen Isopopulationslinien dar, innerhalb dieser Abgrenzung wurden mehr als 500 Aminosäureatome pro  $\text{\AA}^2$  gezählt. Blau - Arginine, Schwarz - Tryptophane, Grün - Phenylalanin. Man beachte, dass eine Argininseitenkette von etwa drei Lipiden umgeben ist.

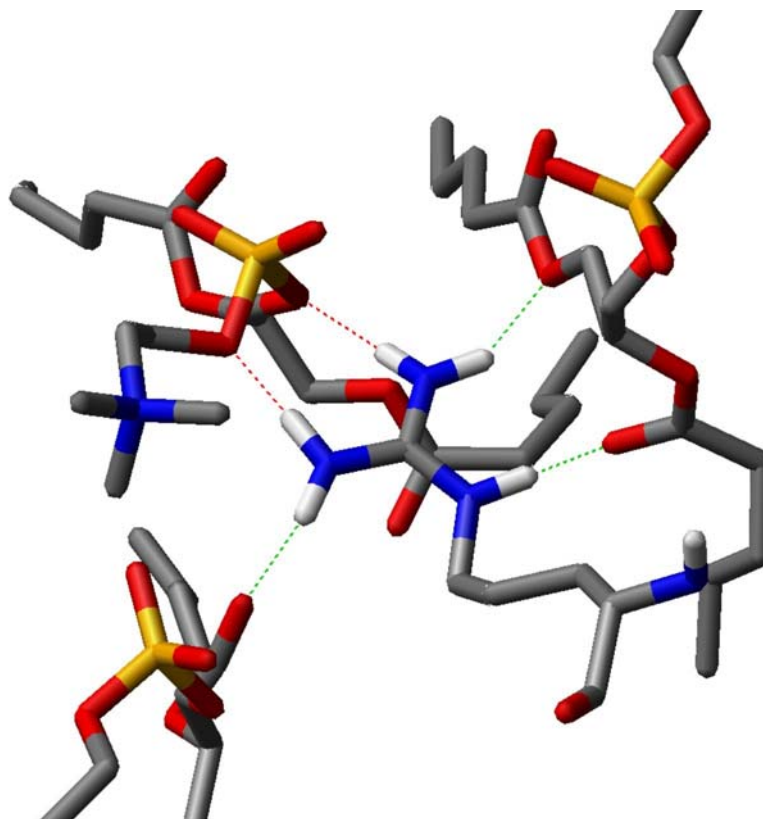
## ERGEBNISSE

		Acylester- sauerstoff	Phosphat- sauerstoff	Wasser	gesamt
0/128-System	Wasser #	$2,4 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$	-	-
2/128-System	Peptid *	$8,4 \pm 1,4$	$5,6 \pm 1,2$	$2,7 \pm 0,9$	$16,7 \pm 1,5$
	Argininseitenketten *	$6,0 \pm 1,3$	$5,2 \pm 1,3$	$1,2 \pm 0,9$	$12,4 \pm 1,2$
	Wasser #	$2,3 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	-	-
12/128-System	Peptid *	$4,8 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,7$	$15,5 \pm 0,5$
	Argininseitenketten *	$3,2 \pm 0,4$	$5,6 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,5$	$11,6 \pm 0,5$
	Wasser #	$2,0 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$	-	-

**Tabelle 8: Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen von Peptiden und Wasser zu Lipiden und Wasser.** # berechnet pro Lipid; \* berechnet pro Peptid.

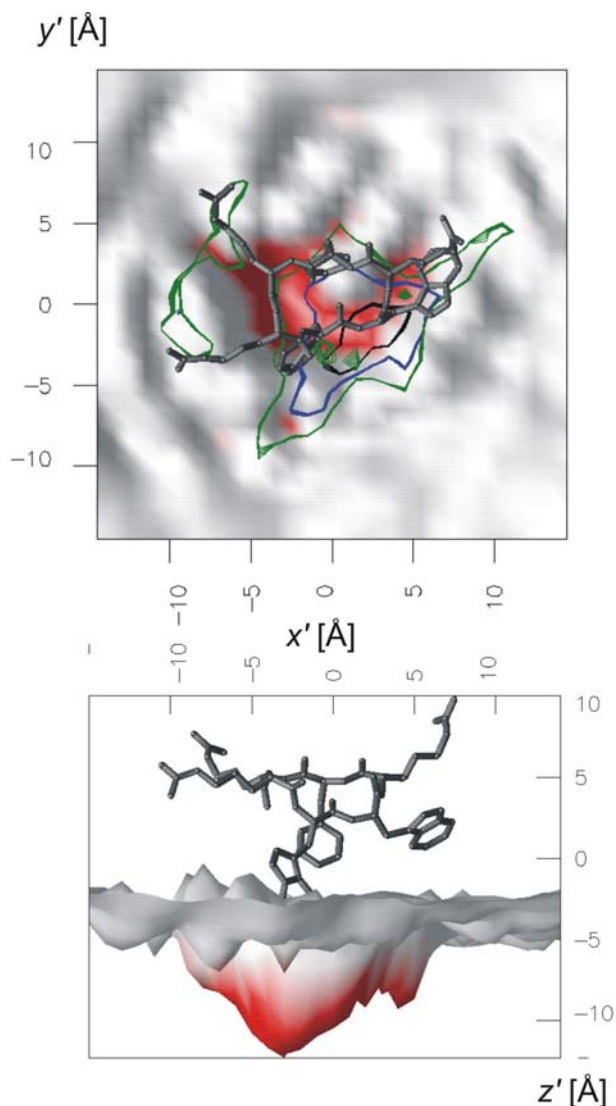
Des Weiteren sind diese Lipide auf bestimmte Orte beschränkt, das heißt sie bilden nicht einfach eine unspezifische Schicht von Lipiden, die gegen das Peptid gepresst werden. Außerdem wurde die Verteilung der Wasserstoffbrückenbindungen untersucht (Tabelle 8). Die Argininseitenketten stellen die Mehrheit der Wasserstoffbrücken, die vom Peptid mit den Lipiden gebildet werden. In der 2/128-Simulation wurden die meisten Wasserstoffbrücken zu den Acylestergruppen des DPPC (den Sauerstoffatomen des Glycerols und der Acylketten) und dem Sauerstoff der Phosphatgruppen ausgebildet. Zur Verdeutlichung ist ein solcher Komplex in Abbildung 27 dargestellt.

Die Geometrie der Guanidinogruppen erlaubt die Bildung von zwei Wasserstoffbrücken zu demselben Lipid, was zur Stabilität des Komplexes beiträgt. Bei höherer Peptidkonzentration (12/128-System) ist die Möglichkeit, Wasserstoffbrücken zum Acylester zu bilden, jedoch reduziert. Dies wird teilweise durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen kompensiert. Dennoch war die Gesamtzahl der Wasserstoffbrücken des Peptides reduziert, da die Zahl der inter- und intramolekularen Peptid-Peptid-Wasserstoffbrücken konstant bei 1,5 blieb. Ebenfalls reduziert war die Zahl der Wasserstoffbrücken von Lipiden zu Wasser, was als Verlust an Hydratwasser interpretiert werden kann. Anscheinend stört die große Zahl von Wasserstoffbrückendonoren der Guanidine die Membran-Wasser-Grenzfläche.



**Abbildung 27: Eine Argininseitenkette im Komplex mit drei Lipidmolekülen.** Gezeigt ist R2 eines Peptides aus der 2/128-Simulation. Rote Linien - Wasserstoffbrücken zum Phosphat-Sauerstoff des DPPC; grüne Linien - Wasserstoffbrücken zum Acylester-Sauerstoff des DPPC. Ein Lipidmolekül kann durch zwei Wasserstoffbrücken gebunden werden, was den Komplex stabilisiert.

Eine weitere Populationsanalyse beschreibt die Kavität, die das Peptid in der Membran bildete. Dazu wurde die Population einzelner Kohlenstoffatome der Acylketten um ein Peptid aufgetragen (Abbildung 28). Kohlenstoffatome in der Nähe der Lipidkopfgruppen können den Raum unter bzw. über dem Peptid nicht erreichen, was zu einer kegelförmigen Kavität führt. Dieser Defekt erstreckt sich bis etwa zum C<sub>8</sub> der Acylketten, resultierend in einer Kompression der oberen Bereiche der Acylketten. Die Methylengruppen am Ende der Acylketten können ungestört ein beinahe normales Volumen einnehmen. Diese ungleiche Kompression kommt der Induktion einer Krümmung gleich.



**Abbildung 28: Die durch das Peptid gebildete Kavität.** Der Mittelwert der  $z'$ -Koordinaten der äußersten Lipidatome (der 2/128-Simulation) in jeder Rasterzelle (Größe  $1 \text{ \AA}$ ) wurde berechnet und als grau-rote-Fläche abgebildet. Oben - Sicht auf die Membran; es sind die Isopopulationslinien für C4-C'4 - grün, C6-C'6 - blau und C8-C'8 - schwarz gezeigt, innerhalb dieser Linien wurden weniger als 100 Atome pro  $\text{\AA}^2$  gezählt. Unten - Seitenansicht, das Peptid wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit in  $z'$ -Richtung nach oben verschoben. Für eine Positionsangabe siehe Abbildung 24.

### 3.2.8. Laterale Diffusion

Der laterale Diffusionskoeffizient  $D$  der Lipide ist ein Maß für deren Beweglichkeit innerhalb der Doppelschicht. Dieser Koeffizient wurde nach einem Standardverfahren ermittelt, er ist die Steigung einer Geraden, die an die mittlere quadratische Verschiebung (MSD, mean square displacement) der Lipidmoleküle

angepasst wurde. Vor der Auswertung wurden die relativen Bewegungen der individuellen Lipideinzelschichten korrigiert. Zwar sind Diffusionskoeffizienten immer abhängig von der betrachteten Zeitskala, aber die erhaltenen Diffusionskoeffizienten (Zeitskala 1-3 ns) der Lipide (Tabelle 6) stimmen gut mit experimentellen Daten für kurze Zeitskalen überein. In der 12/128-Simulation war der Diffusionskoeffizient auf ein Drittel verringert, in der 2/128-Simulation nur gering beeinflusst. Bemerkenswert ist, dass die Diffusionskoeffizienten des c-RW selbst in beiden Simulationen gleich waren, was für die Ausbildung ähnlicher Peptid-Lipid-Komplexe spricht. Diese Aggregate wurden bereits besprochen (Abbildung 26 und Abbildung 27).

### **3.3. Design und Synthese analoger Verbindungen**

#### **3.3.1. Aktivitätskriterien für arginin- und tryptophanreiche Peptide**

Die ausführliche strukturelle Charakterisierung durch NMR-Spektroskopie und Moleküldynamiksimulationen, in Verbindung mit vorangegangenen Studien an arginin- und tryptophanreichen antimikrobiellen Peptiden [94, 95, 99], erlaubt es, wesentliche Kriterien für eine antimikrobielle Aktivität zu identifizieren. Sie seien hier nur kurz benannt und werden später eingehender diskutiert (Kapitel 4.1.2).

Ein wichtiger funktioneller Bestandteil dieser Peptide sind die Guanidino-Funktionen der Argininseitenketten, da sie besonders geeignet sind, mit Lipiden in Wechselwirkung zu treten. Dies folgt sowohl aus den Ergebnissen der Moleküldynamiksimulation (Abbildung 26, Abbildung 27 und Tabelle 8) als auch aus den biologischen Studien (Tabelle 4) [99]. Nach den Daten von Strom *et al.* [95] werden hierfür mindesten drei Guanidine benötigt.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil sind die Indole der Tryptophane, da sie den Peptiden die nötige Hydrophobizität verleihen, um mit der Membran zu interagieren. Dies folgt aus der Tatsache, dass c-RY, das Tyrosin-substituierte

Peptid, trotz ähnlicher Raumstruktur (Abbildung 15) keine nennenswerte antimikrobielle Aktivität aufweist (Tabelle 4) [99]. Die Studien von Strom *et al.* [95] zeigen, dass dem Phenylalanin keine besondere Bedeutung zukommt und durch ein Tryptophan ersetzt werden kann. Daraus folgt, dass 2-3 Indole für die Aktivität benötigt werden.

Da die Zyklisierung des Rückgrates zu einer Verstärkung der antimikrobiellen Aktivität führt (Tabelle 3), scheint es von Bedeutung zu sein, ein Grundgerüst zu wählen, das nicht zu viel Flexibilität der funktionellen Gruppen zulässt. Dieses Grundgerüst muss keine definierte Raumstruktur vorgeben, solange eine amphipathische Struktur, induziert durch Membranbindung, eingenommen werden kann (Kapitel 3.1.2 und 3.1.4).

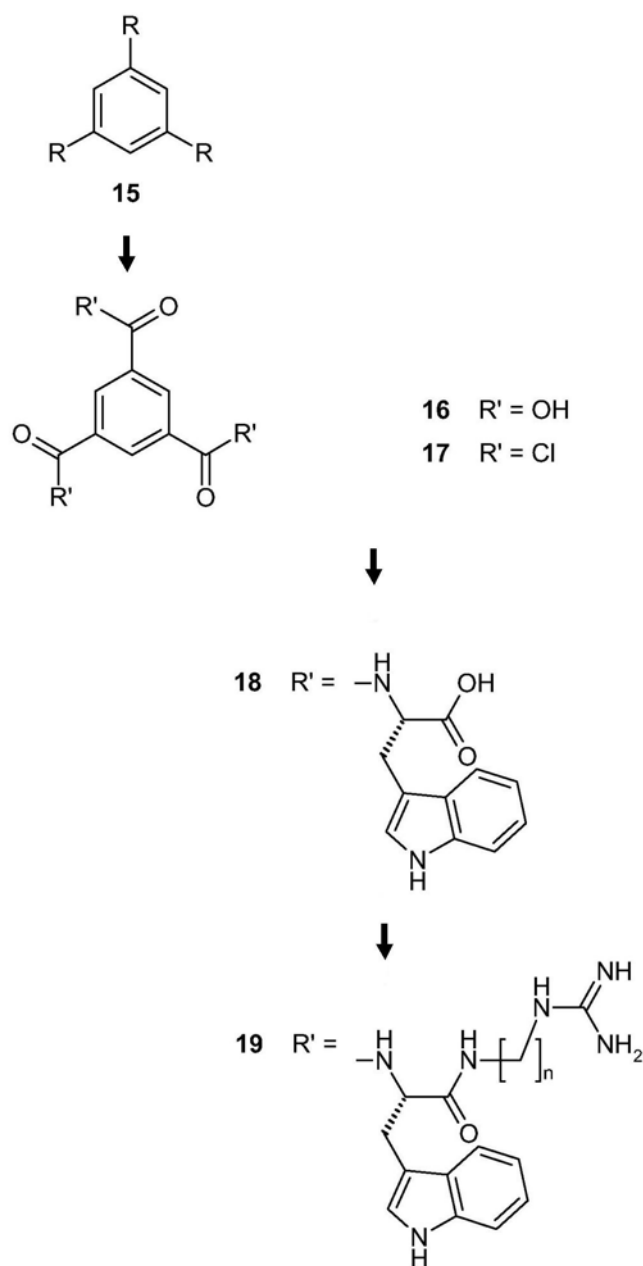
### 3.3.2. Design der Analoga

Als Voraussetzungen für eine antimikrobielle Aktivität wurde das Vorhandensein folgender Gruppen angenommen: drei Guanidinogruppen, drei Indole und ein Grundgerüst, das die Beweglichkeit der Gruppen zwar einschränkt, aber dennoch eine Bildung einer amphipathischen Struktur erlaubt. Um zu überprüfen, inwiefern diese Aussage zutreffend ist, sollte eine Modellsubstanz entworfen und synthetisiert werden, die diesen Kriterien entspricht. Da die Wahl dieser Verbindung frei war, empfahl es sich, nach möglichst einfachen und gut beschriebenen Synthesewegen zu suchen und dies in den Entwurf der Verbindung einfließen zu lassen.

In die gewünschte Verbindung sollten jeweils drei Indole und drei Guanidine eingeführt werden. Es war daher günstig, eine Ausgangsverbindung zu wählen, die eine gleichzeitige Einführung dieser Gruppen ermöglichte, zum Beispiel über eine  $C_3$ -Symmetrie verfügt. Ein 1,3,5-trisubstituiertes Benzol **15** ist ein solches, einfaches Beispiel (Abbildung 29). Ein einfacher Weg, an dieses Gerüst die funktionellen Einheiten zu knüpfen, bestand in der Bildung einer Amidbindung. Die 1,3,5-Benzoltricarbonsäure **16** (Trimesinsäure) eignete sich hierfür als



Ausgangsverbindung. Sie war bereits als Säurechlorid **17** (TMACl) in aktivierter Form kommerziell erhältlich.

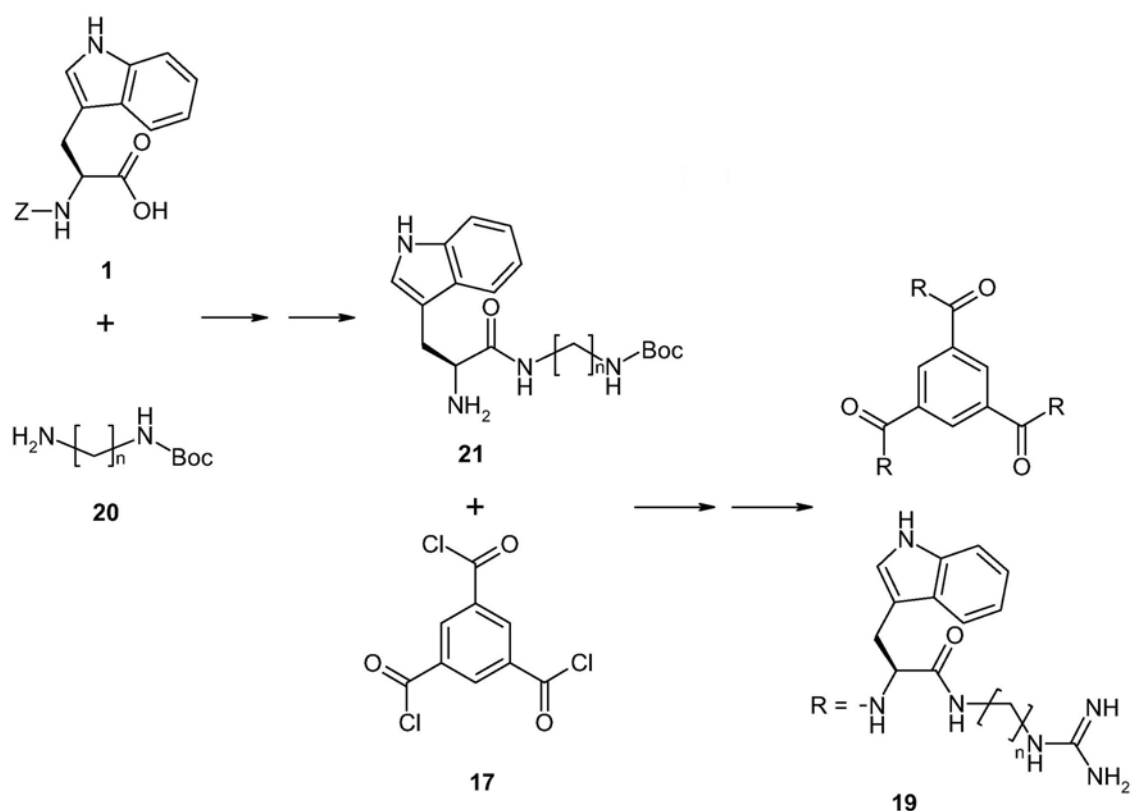


**Abbildung 29: Design analoger antimikrobieller Verbindungen.** Um drei Gruppen in einem Reaktionsschritt einzuführen, wird ein 1,3,5-trisubstituiertes Benzol **15** als Grundgerüst gewählt. Um die funktionellen Gruppen über Amidbindungen einführen zu können, muß es sich bei dem Grundgerüst um Trimesinsäure **16** handeln. Als Ausgangsverbindung dient das Trimesinsäurechlorid **17**. Indole werden als Tryptophane eingeführt (**18**). Über einen Aminoalkyl-Linker wird das Guanidin eingeführt (**19**).

Um die Bildung einer amphipathischen Struktur mit einem hydrophoben Kern aus Indolen zu ermöglichen, war es günstig, die Indole relativ nah am Grundgerüst zu halten. Es wurde somit als nächstes ein substituiertes Indol benötigt, das über eine Aminofunktion an die Trimesinsäure gekoppelt werden konnte. Mit Tryptophan bzw. Tryptamin sind solche Verbindungen ebenfalls kommerziell erhältlich. Das Tryptophan war hier besser geeignet (ergibt **18**), da anschließend die Guanidine über einen entsprechenden Linker an die Carboxylfunktion gekuppelt werden konnten (ergibt **19**).

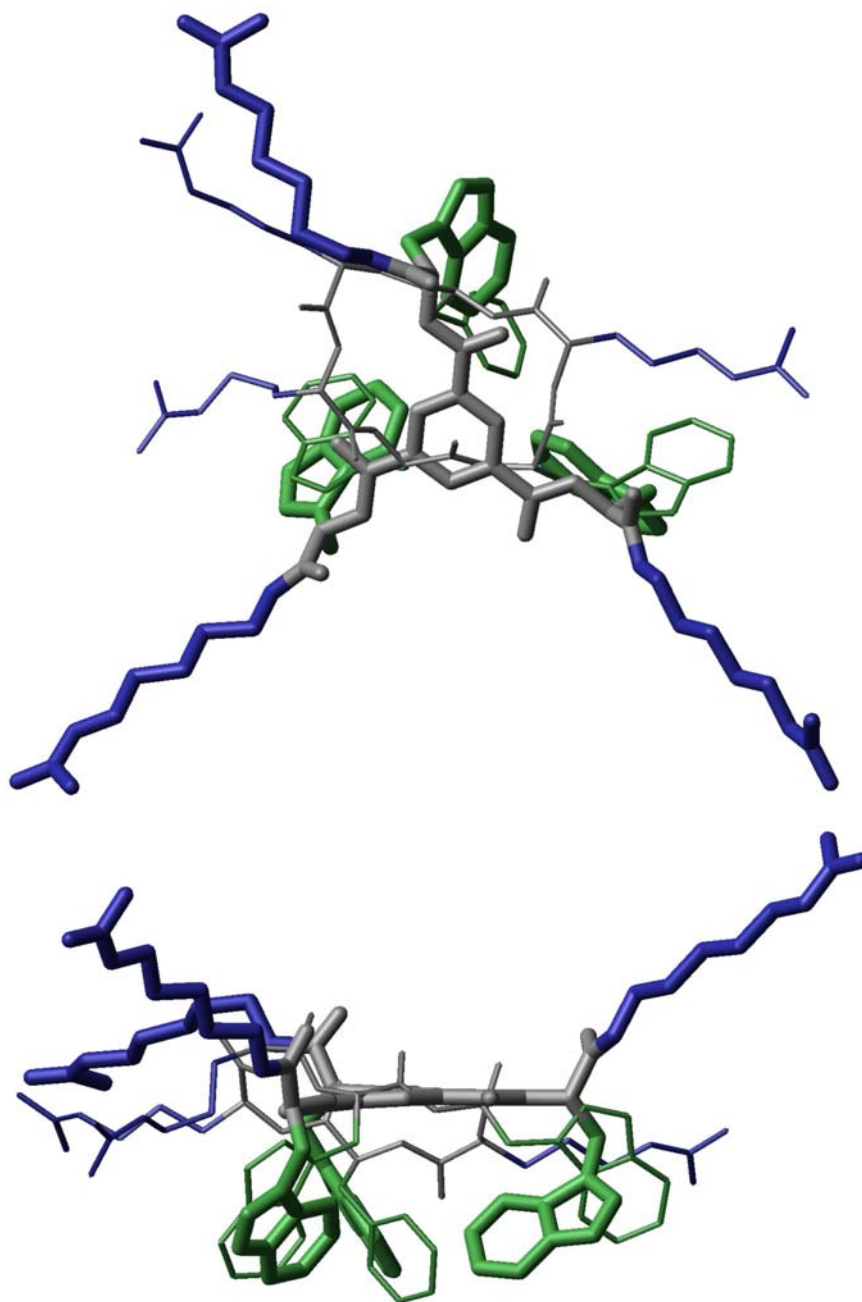
Guanidine sind mittels 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin aus primären Aminen leicht zugänglich [156]. Es empfahl sich daher, zuerst am Ende der Verknüpfung eine freie Aminofunktion zu erzeugen und diese in ein Guanidin zu überführen. Das erforderliche Verbindungsstück war somit ein Alkyldiamin bzw. sein einseitig geschütztes Derivat, welches ebenfalls kommerziell erhältlich ist.

Da die Einführung dieser funktionellen Gruppen an den drei Carboxylfunktionen der Trimesinsäure gleichzeitig erfolgte, resultierte ein Molekül, das wie erwünscht über jeweils drei dieser Gruppen verfügte. Es war aus synthetischen Gründen jedoch sinnvoll, zuerst das Konstrukt aus Indol und mono-geschütztem Alkyldiamin (**21**, Abbildung 30) zu synthetisieren und dieses dann an das Grundgerüst **17** zu koppeln. Damit wird zum einen eine mögliche Racemisierung umgangen, wie sie bei einer C-terminalen Peptidsynthese auftreten kann. Zum anderen wird somit die Zahl der erforderlichen Dreifachkupplungen am Grundgerüst reduziert und daher die Synthese der gewünschten Verbindung **19** vereinfacht.



**Abbildung 30: Syntheschema der Analoga.** In der Synthese werden erst Z-L-Tryptophan **1** und der Aminoalkyl-Linker **20** verknüpft (zu **21**). Trimesinsäurechlorid wird mit **21** umgesetzt und anschließend werden die Guanidine eingeführt, um **19** zu erhalten.

Bei der entworfenen Verbindung entspricht das Grundgerüst größenordnungsmäßig dem Peptidrückgrat des c-RW (Abbildung 31). Das erlaubt den Indolen einen hydrophoben Kern zu bilden, der über ähnliche Abmessungen verfügt wie der hydrophobe Kern des c-RW. Inwiefern die Guanidine der Analoga einen ähnlichen Aktionsradius haben, hängt von der Länge der Linker ab. Mit Pentyl-Linkern ist eine etwas größere Reichweite der Guanidine als bei den Peptiden zu erwarten.



**Abbildung 31: Vergleich zwischen c-RW mit einem entworfenen Analogon.** Dünn - c-RW gebunden an DPC-Mizellen; dick - entworfenes Analogon mit Pentyl-Linker (CAB4). Blau - Argininseitenketten bzw. Guanidine und Linker; grün - aromatische Seitenketten; grau - Rückgrat bzw. Grundgerüst. Oben - Sicht auf Grundgerüst bzw. Peptidrückgrat, unten - Seitenansicht. Die modellierte Struktur des Analogons beruht auf der Annahme, dass die Indole einen hydrophoben Kern bilden und auf einer Seite des Moleküls organisiert sind. Das Modell wurde mit Hilfe von Sybyl6.9 erstellt.

### 3.3.3. Synthese der Analoga

Es wurden zwei Sätze analoger Verbindungen synthetisiert, die sich in der Länge der Alkylkette des verwendeten Diamins unterschieden. Bei dem ersten Satz wurde ein Boc-geschütztes 1,2-Diaminoethan verwendet, so dass es sich um einen Ethylenlinker handelte. Die Kupplung von *Z*-L-Tryptophan **1** erfolgte durch Aktivierung der Carboxylfunktion wie in einer herkömmlichen Peptidsynthese. Anschließend wurde die *Z*-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung abgespalten und **3** in guter Ausbeute erhalten (Abbildung 32).

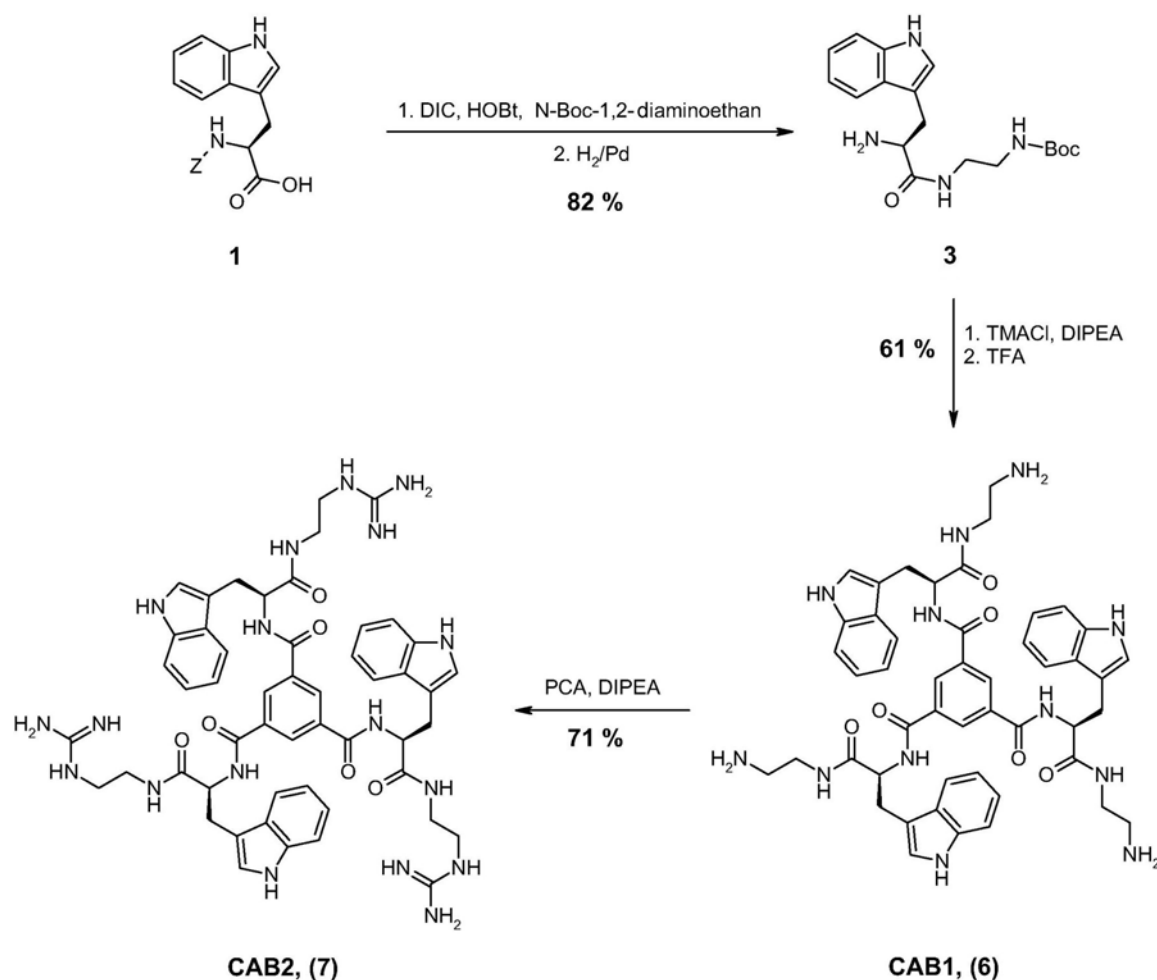


Abbildung 32: Synthese von CAB1 und CAB2. TMACl - Trimesinsäurechlorid **17**, PCA - 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin.

Diese Verbindung wurde unter Verwendung von Trimesinsäurechlorid **17** an das Grundgerüst gekuppelt. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen mittels Trifluoressigsäure und Ausfällen aus wässriger alkalischer Lösung wurde **CAB1 (6)** in guter Ausbeute erhalten. Die Überführung dieses Triamins in das entsprechende Triguanidin **CAB2 (7)** erfolgte mittels *1H*-Pyrazol-1-carboxamidin. Die Reinigung durch präparative HPLC lieferte **CAB2** in guter Ausbeute.

Eine zweite Reihe analoger Verbindungen beinhaltet ein 1,5-Diaminopentan als Linker. Die Verbindung **10** wurde von der Firma Asca (Berlin) zur Verfügung gestellt, die Synthese von **10** ist aber der Vollständigkeit halber aufgeführt [149]. Sie wurde auf einem ähnlichen Weg wie **3** aus *Z*-L-Tryptophan und *N*-Boc-1,5-diaminopentan synthetisiert, allerdings war die Ausbeute geringer (Abbildung 33).

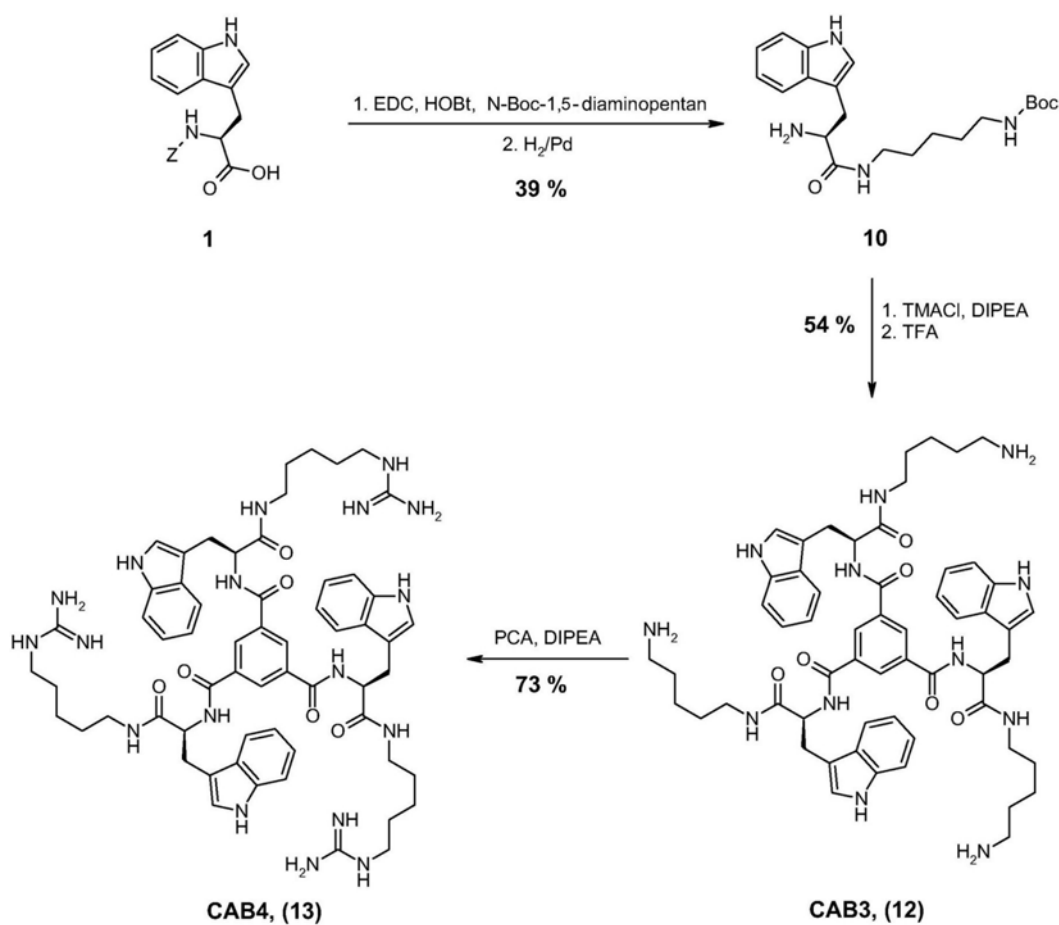


Abbildung 33: Synthese von CAB3 und CAB4. TMACl - Trimesinsäurechlorid **17**, PCA - *1H*-Pyrazol-1-carboxamidin.

Die Verbindung **10** wurde unter Verwendung von Trimesinsäurechlorid **17** an das Grundgerüst gekuppelt. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen mittels Trifluoressigsäure und Ausfällen aus wässriger alkalischer Lösung wurde **CAB3 (12)** in guter Ausbeute erhalten. Die Überführung dieses Triamins in das entsprechende Triguanidin **CAB4 (13)** erfolgte mittels 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin. Die Reinigung durch präparative HPLC lieferte **CAB4** in guter Ausbeute.

Um sicherzustellen, dass eine antimikrobielle Aktivität durch das Verknüpfen von jeweils drei funktionellen Gruppen (Indolen und Guanidinen bzw. Aminen) hervorgerufen wird und nicht durch mögliche toxische Eigenschaften des Tryptophanyl-*N*-1,2-diaminoethans **8** bzw. des Tryptophanyl-*N*-1,5-diaminopentans **14** (Abbildung 34) entsteht, wurden diese Verbindungen ebenfalls aus den Vorstufen **3** und **10** durch Boc-Abspaltung mittels TFA synthetisiert. Eine Synthese der entsprechenden Guanidine konnte aus diesen Vorstufen nicht erreicht werden, da dies eine andere Schutzgruppenstrategie verlangte. In den biologischen Tests zeigte sich, dass diese Verbindungen als Kontrollen ausreichend sind.

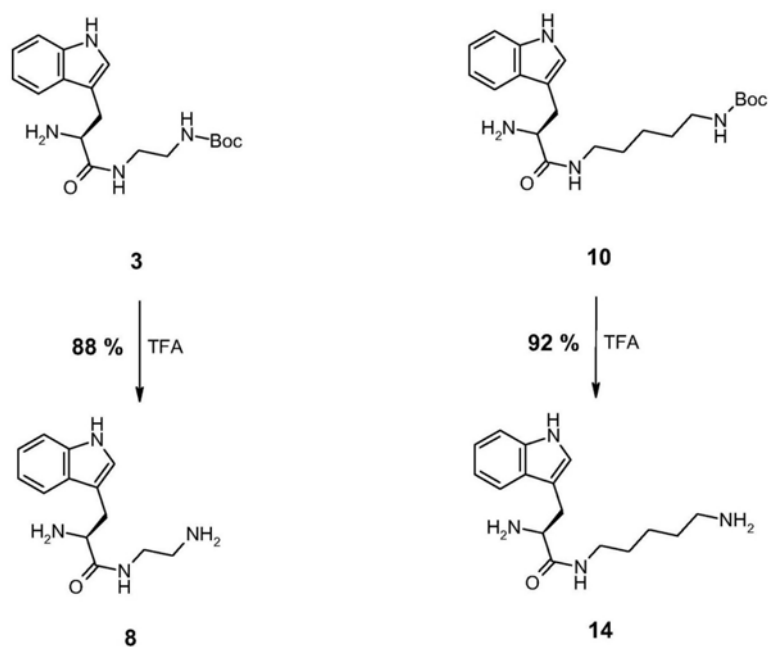


Abbildung 34: Synthese der Kontrollen **8** und **14**.

### 3.3.4. Antimikrobielle Aktivität der Analoga

Vor der Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentrationen (MIC) und den Versuchen zur Erythrozytenlyse wurden die analogen Verbindungen mittels präparativer HPLC gereinigt. Die Verbindung CAB1, CAB2 und CAB4 konnten laut HPLC-ESI-MS in reiner Form erhalten werden (Tabelle 9), CAB3 enthielt jedoch auch nach der präparativen HPLC eine Verunreinigung, deren Identität nicht geklärt werden konnte. Als Kontrollen, inwiefern einzelne Bestandteile der Verbindungen bereits eine antimikrobielle Wirkung aufweisen, wurden auch von Tryptophanyl-*N*-1,2-diaminoethan **8**, Tryptophanyl-*N*-1,5-diaminopentan **14** und Trimesinsäure **16** minimale inhibitorische Konzentration und hämolytische Aktivität bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Verbindungen CAB3 und CAB4 eine antimikrobielle Aktivität gegen gramnegative *Escherichia coli* und grampositive *Bacillus subtilis* aufwiesen (Tabelle 9), die durchaus mit der MIC des c-KW, dem Lysin-substituierten Peptid bzw. des c-RW, dem Modellpeptid, vergleichbar waren, wobei das Triguanidin CAB4 aktiver war. Es wurden in diesem Fall also die postulierten Aktivitätskriterien erfüllt. Die Aktivität ist nicht auf eine Toxizität der einzelnen Komponenten zurückführbar, da weder Trimesinsäure noch

Verbindung	Reinheit laut HPLC-ESI-MS	MIC <i>E.coli</i> [µM]	MIC <i>B. subtilis</i> [µM]	Hämolytische Aktivität bei 100 µM [%]
CAB1	97,4 %	> 125	31,3	1,2
CAB2	98,7 %	> 125	3,9	5,1
CAB3	80,3 %	62,5	31,3	0,4
CAB4	99,1 %	15,6	2,0	22,6
Tryptophanyl- <i>N</i> -1,2-diaminoethan	-	> 250	> 250	< 1
Tryptophanyl- <i>N</i> -1,5-diaminopentan	-	> 250	> 250	< 1
Trimesinsäure	-	> 250	> 250	< 1

**Tabelle 9: Minimale inhibitorische Konzentrationen und hämolytische Aktivitäten der Analoga.**



Tryptophanyl-*N*-1,5-diaminopentan eine antimikrobielle Wirkung zeigten. CAB4 zeigte auch, wie *c*-RW, die Neigung, Erythrozyten zu lysieren und damit potentiell zytotoxisch zu sein.

Überraschenderweise zeigten CAB1 und CAB2 nur gegen grampositive *B. subtilis*, nicht aber gegen gramnegative *E. coli* eine antimikrobielle Aktivität. Der Unterschied zwischen CAB2 und CAB4 besteht lediglich in der Länge der Alkylkette, an die das Guanidin gekoppelt ist. Dieser Unterschied muss daher für die Selektivität verantwortlich sein. Auch hier zeigte die Kontrolle Tryptophanyl-*N*-1,2-diaminoethan keine antimikrobielle Wirkung und die selektive Aktivität wird daher durch die Kopplung von jeweils drei funktionellen Gruppen an das Grundgerüst vermittelt. Auch bei CAB2 wurde eine moderate hämolytische Aktivität beobachtet.

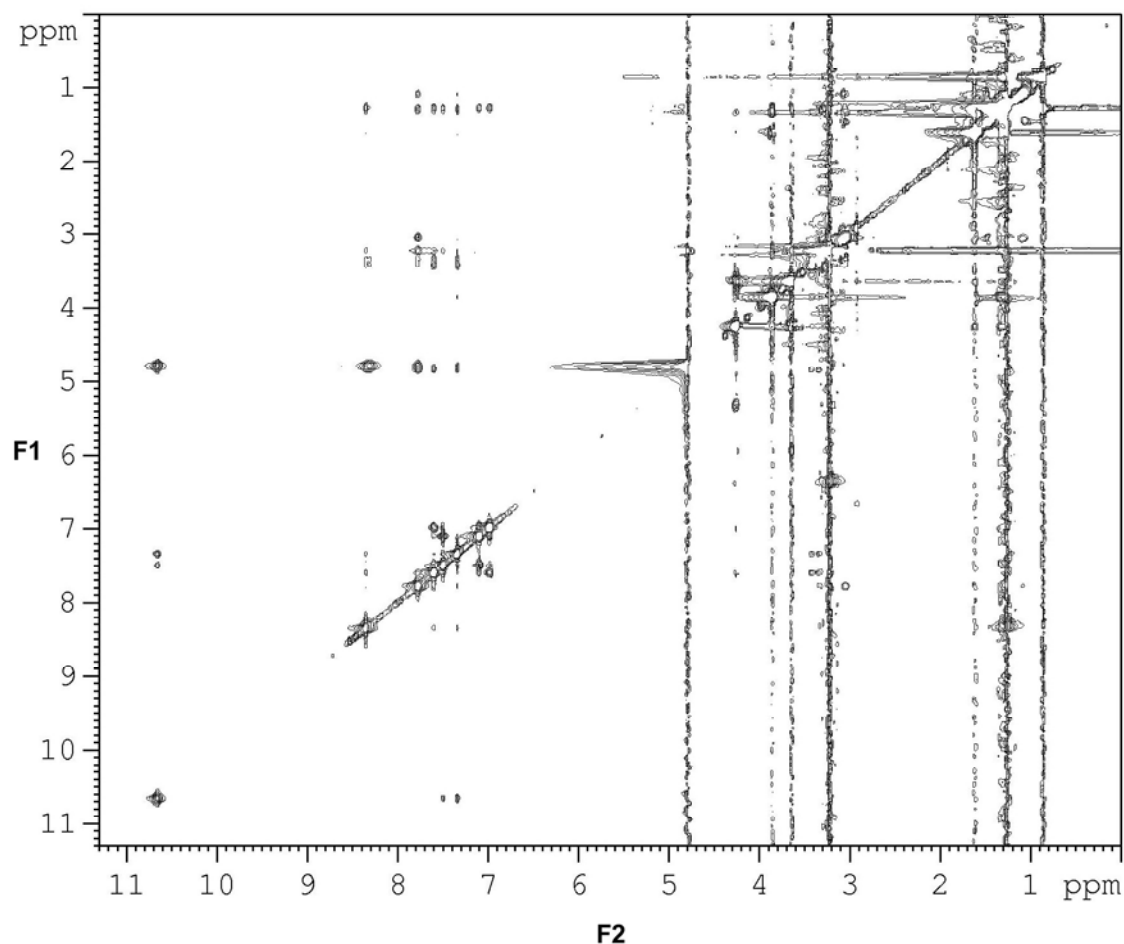
### 3.3.5. NMR-Spektroskopie an den Analoga

Auch mit den synthetisierten Analoga wurden ähnliche NMR-Experimente wie mit den Peptiden durchgeführt (Kapitel 3.1), um Strukturinformationen für diese Verbindungen zu erhalten. Es wurden für CAB1 bis CAB4 <sup>1</sup>H-TOCSY-Spektren in wässriger Lösung aufgenommen, die eine vollständige Zuordnung der Protonenresonanzen erlaubten. Es zeigte sich, dass aufgrund der Symmetrie der Verbindungen für die drei Seitenketten nur ein Signalsatz auftritt. Die einzelnen Seitenketten sind somit in den Spektren nicht zu unterscheiden. Aufgrund dieser Symmetrie ist es nicht möglich zu entscheiden, ob NOEs innerhalb einer Seitenkette oder zwischen zwei unterschiedlichen Seitenketten auftreten. Eine Strukturrechnung ist damit nicht durchführbar.

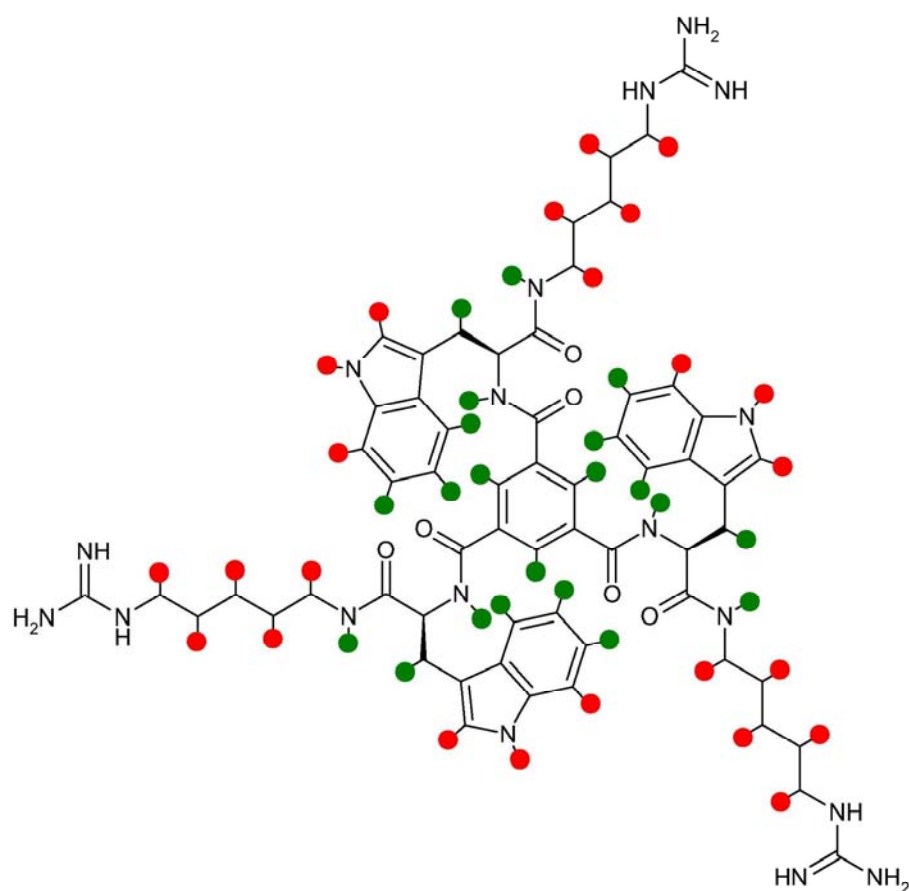
Ein NOESY-Spektrum bei einer Feldstärke von 600 MHz von CAB4 in Wasser wies keinerlei Kreuzsignale auf. Für CAB2 und CAB4 gebunden an deuterierte DPC-Mizellen wurden ebenfalls TOCSY- und NOESY-Spektren aufgenommen. Hier waren viele Kreuzsignale im NOESY vorhanden, so dass eine Mizellbindung des CAB2 und des CAB4 angenommen werden konnte. Dies wurde im Falle von CAB4 gebunden an nicht-deuterierte DPC-Mizellen durch zahlreiche

NOESY-Kreuzsignale zwischen CAB4 und Mizelle bestätigt (Abbildung 35). Ähnlich wie die Analoga in wässriger Lösung zeigten die mizellgebundenen CAB2 und CAB4 nur einen Signalsatz für alle drei Seitenketten, was erneut eine Strukturbestimmung verhinderte.

Obwohl die Raumstruktur des mizellgebundenen CAB4 nicht ermittelt werden konnte, erlaubte die Bestimmung longitudinaler Relaxationszeiten unter Verwendung von Gd-DTPA, ähnlich wie bei c-RW (Kapitel 3.1.6), einen Einblick, welche Gruppen der Verbindung dem Lösungsmittel stärker exponiert waren (Abbildung 36). Es zeigte sich, dass die Trimesinsäure sowie große Teile der Tryptophane gut abgeschirmt waren, während die Protonen um die Indol-Imino-



**Abbildung 35: NOESY des CAB4 gebunden an DPC-Mizellen.** Es traten starke NOEs zwischen Protonen des CAB4 (6-9 ppm) und Protonen der Mizell-Alkylketten (1,3 ppm) auf, die für eine Bindung des CAB4 an die Mizelle sprechen. Mischzeit 40 ms; 2,5 mM CAB4; 50 mM protoniertes DPC.



**Abbildung 36: Bestimmung longitudinaler Relaxationszeiten des CAB4.** Es wurde die Orientierung des CAB4 in Bezug auf die Mizelloberfläche untersucht. Es wurden  $T_1$  in Gegenwart von 0,3 mM Gd-DTPA ( $T_1^{Gd}$ ) und  $T_1$  in Abwesenheit des Gd-DTPA ( $T_1^0$ ) für Protonen bestimmt. Rote Kreise entsprechen  $T_1^{Gd} / T_1^0 < 0,45$  (Lösungsmittel-exponiert) und grüne Kreise  $T_1^{Gd} / T_1^0 > 0,45$  (weniger Lösungsmittel-exponiert).

gruppe sowie die aliphatischen Linker stärker Lösungsmittel-exponiert waren. Es ist daher anzunehmen, dass die Tryptophane auch bei diesen Analoga zusammen mit der Trimesinsäure einen hydrophoben Kern bilden, der dem Mizellinneren zugewandt ist.

Obwohl die NMR-Daten keine Berechnung der Raumstruktur der synthetisierten Verbindungen erlaubten, wiesen sie auf ein ähnliches Verhalten dieser Analoga bei der Wechselwirkung mit Membranen bzw. Mizellen hin, wie sie bei den Peptiden vorlag. Es wurden somit erfolgreich nicht-peptidische, aktive Analoga für die tryptophan- und argininreichen antimikrobiellen Peptide entworfen.