

## 3 Material & Methoden

### 3.1 Materialien

Die Harze für die Festphasensynthese stammten von RAPP Polymere GmbH (D). Die für die Synthese verwendeten Aminosäuren stammten von Calbiochem-NOVABIOCHEM GmbH (D). Das Uroniumsalz 1-(1-Pyrrolidinyl-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinylmethyl)pyrrolidinium-hexafluorophosphat-3-oxid (HAPyU) ist in unserer Arbeitsgruppe entsprechend der Vorschrift von Heyne und Carpino (112) synthetisiert worden. Die Lipide 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (POPE), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-(phospho-*rac*(1-glycerol)) (POPG) und Cholesterin wurden bei Avanti Polar Lipids Inc. (USA) erworben. Luria Nährmedium (Luria Broth (LB) und Calcein stammten von Fluka Chemie (D). Lösungsmittel für die HPLC kamen von J.T.Baker (D). Wenn nicht anders angegeben, wurden alle weiteren benötigten Chemikalien von SIGMA-Aldrich Chemie GmbH (D) geliefert.

### 3.2 Peptidsynthese & Charakterisierung

Alle linearen Peptide wurden per Hand nach der Strategie der Festphasensynthese synthetisiert (153,154). Die Prozedur der Harzbeladung, der Prüfung der Kupplung mittels „Kaisertest“, der Peptidbindungsknüpfung und der Peptid-Harz-Spaltung werden nachfolgend in ihren Grundzügen beschrieben.

*Ankupplung von Fmoc-Aminosäuren an Polystyrenmatrix* Für die Synthese der linearen Peptide wird das Harz (1 mg Tentagel S RAM) in getrocknetem DMF vorgequollen (ca. 10 ml DMF/g Harz). Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Harz erfolgt mittels 5 ml einer DMF/Piperidin-Lösung (20% Piperidin). Anschließend wird das Harz mindestens viermal mit DMF gewaschen. Zur Ankupplung der ersten Aminosäure werden je 0.5 mmol des Fmoc-geschützten Aminosäure-Derivates, 0.5 mmol der Kupplungsreagenz 2-(1*H*-Benzotriazole-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetra-methyluronium tetrafluoroborat (TBTU) und 1 mmol N,N-Diisopropylethylamin (DIEA) gelöst in 1.25 ml DMF zugegeben und 30 min gerührt. Abschließend wird das Harz viermal mit DMF gewaschen. Zum Abschluß der Peptidsynthese wird der N-Terminus mittels 1 ml Acetanhydrid, 3.5 ml DMF und 0.5 ml DEPEA (2.92 mmol) acetyliert.

*Abspaltung der Peptide von der Polystyrenmatrix* Das Harz wird für 4 h mit konzentrierter TFA, 0.5 g Phenol und 0.25 ml H<sub>2</sub>O behandelt. Nach der Peptid-Harz-Spaltung wird das Harz abfiltriert, mehrfach mit TFA nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum eingedunstet. Die Produkte werden aus dem eingedunsteten Filtrat mit Diethylether gefällt und nach der Filtration und Etherwäsche getrocknet.

Überprüfung der Vollständigkeit der Kupplung / „Kaisertest“ Hierbei handelt es sich um einen von Kaiser (155) eingeführten qualitativen Test auf An- bzw. Abwesenheit freier primärer Aminogruppen, der wegen der Einfachheit seiner Handhabung die während des Peptidaufbaus am Harz am häufigsten angewandte Methode zur Überprüfung der Vollständigkeit der Kupplung darstellt:

Einige dem Reaktionsgefäß entnommene Harzkugeln werden mit Ethanol gewaschen, in ein kleines Reagenzglas gegeben und mit je zwei Tropfen einer Ninhydrin-Phenol-Ethanol-Lösung und einer Pyridin-verdünnten wässrigen KCN-Lösung versetzt. Nach guter Durchmischung wird das Reagenzglas für 4-6 min in einem auf 120°C geheizten Trockenschrank gestellt. Eine dunkle Verfärbung zeigt freie Aminogruppen, also eine unvollständige Kupplung an. Bei sekundären Aminofunktionen und einigen speziellen Aminosäuren versagt der Test.

Für die Synthese der cyclischen Peptide wird das Harz (0.75 mg Tentagel S AC) in getrocknetem Dichlormethan (DCM) vorgequollen (ca. 10 ml DCM/g Harz). Anschließend Ankupplung der ersten Aminosäure mit 1 mmol des Fmoc-geschützten Aminosäure-Derivates, 3 Äquivalenten N-methyl-Imidazol, 3 Äquivalenten N,N-Diisopropylcarbodiimid (DIPCDI) und 3 Äquivalenten DCM (jeweils auf die Maximalbeladung des Harzes bezogen) zugegeben und 3 h gerührt. Abschließend wird das Harz viermal mit DMF gewaschen. Weitere Kupplungsreaktionen erfolgen wie schon oben beschrieben, jedoch ohne die abschließende Acetylierung. Abspaltung der Peptide von der Polyester-Matrix mit 1.5 g Phenol und 13.5 ml konzentrierter TFA, jedoch ohne Wasser. Nachfolgende Filtration und Einengung wie oben schon beschrieben.

*Cyclisierung der linearen Precursorpeptide* Die „head-to-tail“ Cyclisierung wird bei Raumtemperatur in  $5 \times 10^{-4}$  molarer DMF-Lösung unter Verwendung von 1.1 Äquivalenten HAPyU und 3 Äquivalenten DIEA bezüglich des linearen Peptids durchgeführt (113,114). Bei analytischen Cyclisierungen wird das Peptid und die Kupplungsreagenz zunächst in DMF gelöst und der Start der Reaktion erfolgt dann mit der Zugabe von DIEA. Der Cyclisierungsverlauf wird über HPLC verfolgt. Dazu wird ein Aliquot des Reaktionsgemisches (50 µl) zu genau definierten Zeiten entnommen und mit der doppelten Menge 0.1%iger TFA verdünnt. Gleichzeitig wird durch das saure Medium die Cyclisierungsreaktion gestoppt. Nach Beendigung der Cyclisierungsreaktion wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in Wasser oder einem Wasser/Acetonitril-Gemisch aufgenommen und lyophilisiert.

Die Aufreinigung der Peptide geschah mit Hilfe der Umkehrphasen (reversed phase) Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC). Die Reinheit der Peptide lag bei >95% laut HPLC-Analyse (Abbildung 6). Weitere Charakterisierungen erfolgten mittels der Matrix-unterstützten Laserdesorption

/ Ionisation-Flugzeitmassenspektrometrie (Abbildung 7) (MALDI-TOF, Voyager-DE STR, Bio-Spectrometry Workstation, PerSeptive Biosystems, (USA)) (156). Chromatographische Charakterisierung wurde auf einer Shimadzu LC-10AD Gradienten-HPLC Anlage durchgeführt. Messungen fanden über eine PolyEncap-Säule 300 A-5 (250x4 mm) (Bischoff Chromatography (D)) mittels Shimadzu Dioden Array Detektor SPD-M 10A, betrieben bei 220 nm, statt. Die Probenkonzentration lag bei 1 mg/ml (Peptid/Laufmittel A). Das Injektionsvolumen betrug 20µl. Die mobilen Phasen A und B bestanden aus 0.1% Trifluoressigsäure (TFA) in demineralisiertem Wasser bzw. 0.1% TFA und 80% Acetonitril in 20% demineralisiertem Wasser (v/v). Die Flussrate war auf 1 ml/min eingestellt. Die Retentionszeiten ( $t_R$ ) der Peptide sind mittels linearer Gradienten zwischen 5-95% B über 40 min bei 37°C ermittelt worden. Die Genauigkeit der  $t_R$  lag bei  $\pm 0.25$  sec.

Die Bestimmung der Hydrophobizitätsfaktoren für die einzelnen Peptide erfolgte aus der Berechnung des Kapazitätsfaktors ( $k'$ ;  $k' = t_R/t_0 - 1$ ). Um die  $\log k_w$ -Werte für alle Peptide berechnen zu können, wurden die Werte für  $t_R$  unter isokratischen Bedingungen bei Acetonitrilkonzentrationen von 25-55% (v/v) bei 37°C unter Verwendung der schon oben genannten Solvenzien und Geräte ermittelt. Die Kapazitätsfaktoren wurden als Funktion der Acetonitrilkonzentration aufgetragen. In Relation zu der Acetonitrilkonzentration war der Anstieg der  $\log k'$ -Werte nahezu linear ( $r^2 > 0.99$ ). Folgerichtig konnten die  $k'$ -Werte auf 100% Wassergehalt extrapoliert werden, woraus sich die Werte für  $\log k_w$  wie schon beschrieben ableiten lassen (118,127).

### 3.3 Biologische Untersuchungen

#### 3.3.1 Antimikrobielle Aktivität

Anhand der beiden Zelllinien von Gram-negativen *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) und der Gram-positiven *Bacillus subtilis* (PY22) wurde die antimikrobielle Aktivität ermittelt. Bakterien wurden bei 37°C in Nährlösung (LB) wachsen gelassen. Zellen zum Animpfen wurden der mid-log Phase entnommen ( $OD_{600} = 0.4 \pm 0.1$ ). Aliquots der Zellsuspension wurden in die Vertiefungen einer „96-well“-Mikrotiterplatte, die Peptidlösungen unterschiedlicher Konzentrationen enthielten, pipettiert. Die endgültige Zellzahl in einer Vertiefung betrug  $2.5 \times 10^5$  Zellen. Der Konzentrationsbereich der Peptide reichte von 0.06 bis 125 µM. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert (Schüttler auf 180 rpm). Absorption ist bei 590 nm (Microplate Autoreader EL 311, Bio-Tek Instruments (USA)) gelesen worden. Die minimale Hemmkonzentration (MIC) des Zellwachstums ist die geringste Konzentration, bei welcher keine Veränderung der optischen Dichte ersichtlich ist.

### 3.3.2 Zellpermeabilisierungsversuch

Die Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran Gram-negativer Zellen wurde mittels der von Angus (148) und Lehrer (149) entwickelten Methoden kontrolliert. Zellen von *Escherichia coli* (K12 und ML-35p) wurden in LB Medium bei 37°C bis zur mid-log Phase gezüchtet ( $OD_{550} = 0.3$ ). Anschließend sind die Zellen mit HEPES-Puffer (10 mM, 100 mM NaCl, pH 7.2) und Zentrifugation (1926 RCF, 1 min; Minizentrifuge Jouan, A14 (F)) gewaschen worden. Pellets wurden in HEPES-Puffer resuspendiert ( $OD_{550} = 0.03$ ).

Nitrocefin (NCF; (0.2 mg/ml) Oxoid Ltd. (GB)) und *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -galactosid (ONPG; (1 mg/ml) Sigma-Aldrich (S)) wurden als Vorratslösungen in Eppendorf-Gefäßen portioniert und bei -20°C gelagert. Die Permeabilisierungsversuche wurden in 96-well-Mikrotiterplatten durchgeführt, deren „Wells“ 13  $\mu$ M NCF bzw. 111  $\mu$ M ONPG und 50  $\mu$ l der Permeabilisierungssubstanz enthielten. Unmittelbar vor der Messung wurden 50  $\mu$ l der Zellsuspension ( $OD_{550} = 0.01$ ) hinzupipettiert. Enzymatische Spaltung des NCF bzw. des ONPG wurden bei 37°C mittels Lichtabsorptionsmessung bei 500 nm bzw. 420 nm (Molecular Devices, Versa<sub>max</sub> microplate Reader; SOFTmaxPro Software (USA)) kontrolliert.

### 3.3.3 Hämolytischer Test

Die hämolytische Aktivität der Peptide wurde unter Verwendung humaner roter Blutkörperchen (hRBK, AB Rhpos.; Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes, Berlin) bestimmt. Für die Versuche sind die Erythrocyten mit einem Puffer (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7,4 mit HCl) 4-5 mal gewaschen worden, bei Zentrifugation von 4 min und 2000 g bei 4°C. Endkonzentration der Zellen war  $1.9 \times 10^9$  per ml. Die Zellsuspensionen (200  $\mu$ l) und verschiedene Mengen an Peptidvorratslösungen und Puffer wurden in einem Eppendorf-Gefäß zusammenpipettiert und ergaben ein Gesamtvolumen von 1500  $\mu$ l. Die Suspensionen, welche  $2.5 \times 10^8$  Zellen/ml enthielten, wurden für 30 min unter ständigem leichtem Schütteln bei 37°C (EPPENDORF Thermomixer 5436 (D);  $11 \times 100 \text{ min}^{-1}$ ) inkubiert. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (2000g bei 4°C für 5 min) worden waren, sind 200  $\mu$ l des Überstandes mit 2300  $\mu$ l einer 0.5%igen  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung versetzt worden. Anschließend ist die Absorption (A) bei einer Wellenlänge von 540 nm in einer 10 mm Küvette unter Verwendung eines Spektrophotometers (JASCO V-550 UV/VIS Spectrophotometer (D)) gemessen worden. Null Hämolyse (Leerwert) und 100% Hämolyse (Kontrolle) wurden bestimmt, indem Überstände (200  $\mu$ l) nach der Zentrifugation entweder mit 2300  $\mu$ l Puffer bzw.  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung versetzt wurden. Formel zur Berechnung der Hämolyse in Prozent:

$$\text{Hämolyse (\%)} = (A - A_0) / (A_{100} - A_0) \times 100$$

$A_{100}$  ist der Wert vor der Zentrifugation,  $A$  ist der Wert nach der Zentrifugation und  $A_0$  ist der Null-Wert (nur Puffer und hRBK)

### 3.4 Biophysikalische Untersuchungen

#### 3.4.1 Circular dichroismus Messungen

Durch das Lösen und Vortexen von getrocknetem Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate, SDS) in Puffer (10 mM TRIS, 154 mM NaF, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) sind Mizellen präpariert worden. Kleine unilamellare Vesikel (Small unilamellar vesicle, SUV) wurden präpariert, indem getrocknetes Lipid (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-(phospho-rac(1-glycerol))), POPG) in TRIS-Puffer (s.o.) gelöst und gevortext wurde. Endkonzentration lag bei 20-40 mM. Die Suspension ist für 20-25 min mittels eines Titanspitzen-Ultraschallgerätes beschallt worden (unter Stickstoff in einem Eisbad). Feine Partikel des Titans wurden durch Zentrifugation entfernt. Die Größenbestimmung der Vesikel erfolgte wie weiter unten beschrieben und bestätigte einen Hauptanteil (> 95%) an Vesikeln mit einem mittleren Durchmesser von  $23 \pm 5$  nm.

Vorratslösungen der Peptide wurden durch das Lösen von Proben in TRIS-Puffer (s.o.) erstellt. Die Peptidlösungen wurden mit Puffer-, Mizellen- oder SUV-Lösungen vermischt, so dass die erwünschte Peptidkonzentration und Lösungskomposition erreicht wurde. CD-Messungen erfolgten mit einem J720 Spektropolarimeter (Jasco (D)), zwischen 195 und 260 nm bei Raumtemperatur. Grundsätzlich wurden zwanzig CD-Scans akkumuliert, gemittelt und für jede Probe geglättet. Differentielle Streuung der Mizellen oder SUVs wurden durch das Abziehen der Lipidspektren der korrespondierenden peptidfreien Suspension eliminiert.

#### 3.4.2 Bindungsuntersuchungen

Für die Bindungsuntersuchungen wurde ein modifizierter enzymgebundener Immunoassay (ELISA) nach Erich *et al.* (134) und Bantoch *et al.* (137) etabliert. Die Messungen wurden in Mikrotiterplatten (Nunc Covalink (D)) durchgeführt, welche zuvor mit Lipid A (0.025 µg/Vertiefung) von *Escherichia coli* (K12, D31m4; List Biological Laboratories Inc. (USA)) mittels Evaporation beschichtet worden waren. Nach dem dreimaligen Waschen der Mikrotiterplatten mit Waschlösung (150 µl, 0.01 M Phosphatpuffer, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4, „Phosphate-buffered saline“ (PBS); 0.05% Tween

20 (Polyoxethylensorbitan), Sigma-Aldrich (D)), wurden diese für 60 min bei 37°C mit den erwünschten Peptidkonzentrationen (100 µl) inkubiert. Anschließend ist die Peptidlösung durch kräftiges Schlagen der Mikrotiterplatten auf saugfähigem Papier entfernt und die Platten sind wieder dreimal gewaschen worden. Als nächstes wurden die Mikrotiterplatten mit einem monoklonalen Antikörper (100 µl, 0.5 µg / Vertiefung, Lipid A Antikörper ab8467; Abcam (GB)) bei 37°C für 60 min inkubiert, gefolgt vom Ausschlagen der Antikörperlösung und viermaligen Waschen. Dann wurden die Mikrotiterplatten mit dem zweiten Antikörper (100 µl, Ziegen-anti-Maus IgG Meerrettich-peroxidasekonjugat, Amplex<sup>®</sup>Red ELISA Kit, Molecular Probes (D)) bei 37°C für 45 min inkubiert. Abschließend erfolgte das Ausschlagen der Mikrotiterplatten und dreimaliges Waschen. Zuletzt wurden 100 µl der Amplex<sup>®</sup>Red-Reaktionslösung zupipettiert. Nach 45 min bei 37°C im Inkubator wurde die Peroxidaseaktivität mittels Fluoreszenzspektroskopie (Anregung 530-60 nm, Emission 590 nm, monochromatischer Plattenreader TECAN Safire (D)) bestimmt. Die Anwendung des Amplex<sup>®</sup>Red ELISA Kits erfolgte nach dem mitgelieferten Protokoll von Molecular Probes.

### 3.4.3 Farbstofffreisetzungsversuche

Große unilamellare Vesikel (Large unilamellar vesicle, LUV), die mit dem Fluorophor Calcein (Fluka (D)) in sich selbst quencheden Konzentrationen beladen wurden, sind wie folgt hergestellt worden:

Nachdem die zuvor getrockneten Lipide (Avanti Polar Lipids (USA)) mit Calcein-Puffer (80 mM Calcein, 10 mM TRIS, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) gevortext worden waren, ist die Suspension siebenmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Warmwasserbad wieder aufgetaut worden. Anschließend wurde sie durch Polycarbonatfilter (achtmal durch zwei gestapelte Filter der Porengröße 0.4 µm, gefolgt von zehnmal durch zwei gestapelte Filter der Porengröße 0.1 µm) mittels Extruder (Lipex Biomembranes Inc. (CDN)) extrudiert. Freies Calcein wurde mittels Gelfiltration (Sephadex G-50 / Medium; Korngröße 50-150 µm; Pharmacia Fine Chemicals (S)) entfernt. Die Lipidkonzentrationen wurden nach Böttcher et al. (157) bestimmt. Die Größenbestimmung der Vesikel erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuungsexperimente (N4 Plus, Coulter Corp. (USA)) und bestätigte einen Hauptanteil (> 99%) an Vesikeln mit einem mittleren Durchmesser von  $108 \pm 6$  nm.

10 µl der jeweiligen Lipidsuspension (25 µM) wurden in eine Quarkzuvette injiziert, welche die mittels Magnetfisch gerührte Peptid-Pufferlösung (10 mM TRIS, 0.1 mM EDTA, 154 mM NaCl, pH 7.4) enthielt und zu einem Gesamtvolumen von 2500 µl führte. Calceinfreisetzung aus den Vesikeln ist fluorometrisch durch die Messung der Zunahme der Fluoreszenz bei Zimmertemperatur überwacht worden (Anregung 490 nm, Emission 520 nm; Luminescence Spectrometer LS 50B, Perkin Elmer

(USA)). Die relative Fluoreszenzintensität korrespondierend zu 100% Calceinaustritt wurde durch die Zugabe von Triton X-100 (100  $\mu$ l, 10%ig) nach 6 min Fluoreszenzmessung ermittelt. Peptidkonzentrationen, welche 25% Calceinfreisetzung hervorriefen ( $EC_{25}$ ), wurden mittels Dosis-Wirkungskurven berechnet.