

**Arginin- und tryptophanreiche antimikrobielle Peptide -  
Struktur, Funktion und Entwicklung  
nicht-peptidischer Analoga**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker Christian Appelt  
aus Eilenburg

Februar 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Oschkinat

AG NMR-unterstützte Strukturbiologie  
Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie  
Campus Berlin-Buch  
Robert-Rössle-Straße 10  
13125 Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Rück-Braun

Institut für Chemie  
Technische Universität Berlin  
Straße des 17. Juni 135  
10623 Berlin

Disputation am: 16. 05. 2006

## Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Hartmut Oshkinat danke ich für die Möglichkeit, in einem exzellenten Labor in kreativer Atmosphäre arbeiten zu dürfen, für seine Unterstützung und seine hilfreichen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Peter Schmieder für zahllose Diskussionen, seine fortwährende Unterstützung und sein nicht enden wollendes Vertrauen.

Dr. Arvid Söderhäll danke ich für die intensive Zusammenarbeit, besonders bei den Membransimulationen, und für viele wertvolle Anregungen. Seine Begeisterung für das Projekt half oft über Misserfolge hinweg.

Dr. Anna Schrey danke ich für viele wertvolle Ratschläge, für moralische Unterstützung und die Anleitung, Synthesepläne in die Tat umzusetzen.

Weitere wertvolle Beiträge und Ratschläge zur Synthese der Analoga und der Analytik kamen von Dr. Fritz Theil (Asca, Berlin), Adeeb El-Dahshan, Vivianne Uryga-Polowy (beide AG Prof. Rademann, FMP) und Christoph Böttcher (AK Prof. Rück-Braun, TU Berlin).

Mein Dank gilt auch Dr. Margitta Dathe und ihren Mitarbeitern Heike Nikolenko und Dr. Axel Wessolowski, welche die untersuchten Peptide zur Verfügung stellten, auf deren Arbeit diese Dissertation aufbaut, und die mich mit Rat und Tat unterstützten.

Dr. Frank Eisenmenger danke ich für die Unterstützung bei Computerproblemen und für die Zusammenarbeit bei den Membransimulationen.

Ich danke dem Fonds der chemischen Industrie für seine großzügige finanzielle Unterstützung in Form eines Kekulé-Stipendiums.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe „NMR-unterstützte Strukturforschung“ danke ich für eine gute Zusammenarbeit und eine angenehme Atmosphäre.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Freunden, die mich in jeder Weise unterstützten, die mir viel Verständnis in dieser Zeit entgegen brachten und die mir Selbstvertrauen gaben.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Entdeckung und Vorkommen antimikrobieller Peptide.....	2
1.2. Regulation der Biosynthese antimikrobieller Peptide .....	4
1.3. Unterteilung antimikrobieller Peptide.....	6
1.4. Wirkungsweise der antimikrobiellen Peptide .....	8
1.4.1. Membranpermeabilisierung.....	8
1.4.2. Selektivität für bakterielle Membranen .....	12
1.4.3. Resistenz gegen antimikrobielle Peptide.....	14
1.5. Arginin- und tryptophanreiche antimikrobielle Peptide.....	16
1.5.1. Interaktionen von Tryptophan und Arginin mit Membranen.....	16
1.5.2. Vorkommen in natürlichen antimikrobiellen Peptiden.....	17
1.5.3. Synthetische Bibliotheken tryptophan- und argininreicher Peptide .....	18
1.5.4. Die cyclo(RRWWRWF)-Sequenz.....	19
1.6. Geeignete Methoden zur Strukturuntersuchung an antimikrobiellen Peptiden.....	22
1.6.1. NMR-Spektroskopie .....	22
1.6.2. Moleküldynamiksimulation.....	24
1.7. Zielsetzung.....	26
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
2.1. NMR-Spektroskopie .....	27
2.2. Strukturrechnung.....	28
2.3. Membransimulationen .....	29
2.3.1. Die 0/128-Simulation .....	30
2.3.2. Die 2/128-Simulation .....	30
2.3.3. Die 12/128-Simulation .....	31
2.3.4. Simulationsbedingungen.....	31
2.3.5. Auswertung der Simulation.....	32

2.4.	Synthese der Analoga.....	33
2.4.1.	Chemikalien und Geräte.....	33
2.4.2.	{2-[(S)-2-Amino-3-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-propionylamino]-ethyl}- carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester (3) .....	34
2.4.3.	CAB1 - Benzol-1,3,5-tricarbonsäure- <i>tris</i> -{[(S)-1-(2- aminoethylcarbamoyl)-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-ethyl]-amid} (6) .....	36
2.4.4.	CAB2 - Benzol-1,3,5-tricarbonsäure- <i>tris</i> -{[(S)-1-(2- guanidinoethylcarbamoyl)-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-ethyl]-amid} (7) .....	37
2.4.5.	(S)-2-Amino-N-(2-aminoethyl)-3-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-propionamid (8) . .....	39
2.4.6.	{5-[(S)-2-Amino-3-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-propionylamino]-pentyl}- carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester (10) .....	40
2.4.7.	CAB3 - Benzol-1,3,5-tricarbonsäure- <i>tris</i> -{[(S)-1-(5- aminopentylcarbamoyl)-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-ethyl]-amid} (12).....	42
2.4.8.	CAB4 - Benzol-1,3,5-tricarbonsäure- <i>tris</i> -{[(S)-1-(5- guanidinopentylcarbamoyl)-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-ethyl]-amid} (13). .....	44
2.4.9.	(S)-2-Amino-N-(5-aminopentyl)-3-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-propionamid (14).....	45
2.5.	Biologische Untersuchungen.....	46
2.5.1.	Antimikrobielle Aktivität .....	46
2.5.2.	Hämolytische Aktivität .....	46
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1.	NMR-Spektroskopie .....	48
3.1.1.	Aufnahme und Zuordnung der Spektren.....	49
3.1.2.	Struktur des c-RW.....	51
3.1.3.	Strukturen von c-RY, c-KW und c-RNal.....	55
3.1.4.	Strukturen von c-RW2 und c-RW3.....	58
3.1.5.	Verteilung hydrophober und hydrophiler Bereiche.....	60
3.1.6.	Orientierung des c-RW in der Mizelle .....	61
3.2.	Moleküldynamiksimulation.....	63
3.2.1.	Aufbau und Äquilibration der Peptid-Membran-Simulationen .....	63
3.2.2.	Peptidstruktur .....	65
3.2.3.	Partielle Dichten.....	68
3.2.4.	Freie Enthalpie des Wassers.....	71
3.2.5.	Lipidquerschnittsfläche.....	71

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.2.6. Deuteriumordnungsparameter.....	72
3.2.7. Räumliche Organisation von Peptiden, Lipiden und Wasser.....	73
3.2.8. Laterale Diffusion .....	77
3.3. Design und Synthese analoger Verbindungen .....	78
3.3.1. Aktivitätskriterien für arginin- und tryptophanreiche Peptide....	78
3.3.2. Design der Analoga .....	79
3.3.3. Synthese der Analoga.....	84
3.3.4. Antimikrobielle Aktivität der Analoga .....	87
3.3.5. NMR-Spektroskopie an den Analoga .....	88
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>91</b>
4.1. Strukturuntersuchungen an c-RW und analogen Peptiden .....	92
4.1.1. Lokalisation und Orientierung des c-RW in der Membran.....	93
4.1.2. Verwandte Peptide - Beziehung zwischen Struktur und Aktivität.. .....	94
4.2. Interaktion der Peptide mit Membranen.....	97
4.2.1. Folgen der Insertion in die Membran .....	98
4.2.2. Kationen an der Membran-Wasser-Grenzfläche.....	99
4.2.3. Wasserstoffbrücken und Peptid-Lipid-Komplexe .....	101
4.3. Wirkungsweise des c-RW .....	103
4.4. Entwicklung nicht-peptidischer Analoga.....	106
<b>5. Zusammenfassung / Summary.....</b>	<b>109</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>126</b>