

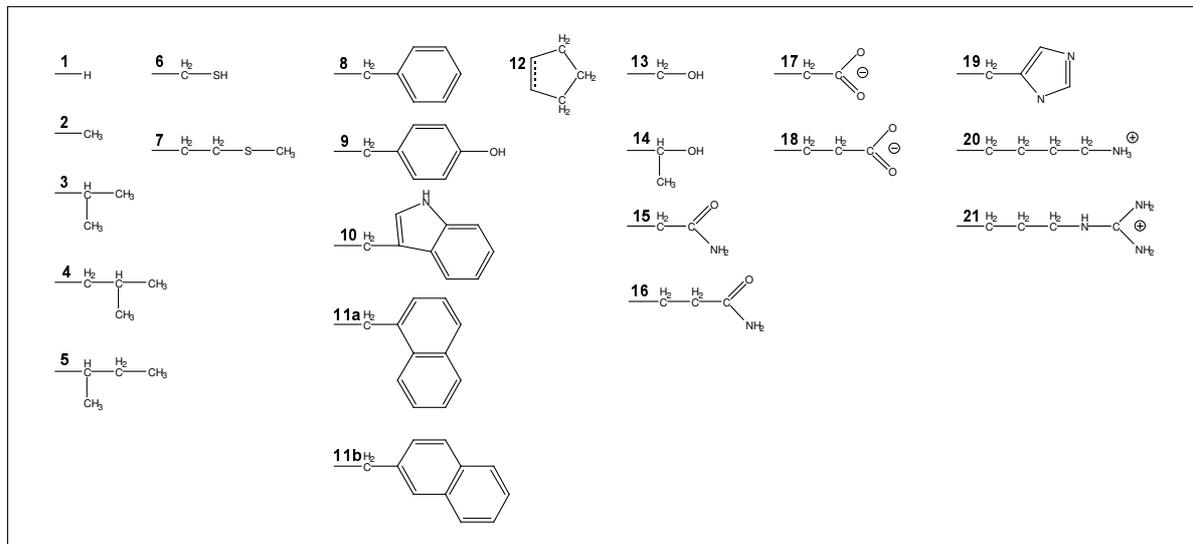
## 6 Anhang

### 6.1 Liste der verwendeten Abkürzungen

Die verwendeten Abkürzungen richten sich nach der Empfehlung der IUPAC-IUB (Eur. J. Biochem. 1984, 138, 9). Nachstehende Abkürzungen wurden zusätzlich verwendet:

A	-	Absorption
AA	-	Amino acids
AMHP	-	antimikrobielle Hexapeptide
AMP	-	antimikrobielle Peptide
CPP	-	Cell-penetrating peptide
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNS	-	Desoxyribonucleinsäure
DPC	-	Dodecylphosphocholin
EC <sub>25</sub>	-	Effector concentration for quarter-maximum response
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	-	Enzyme-linked immuno-stimulated assay
HAPyU	-	1-(1-Pyrrolidinyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]pyridinylmethyl) pyrrolidiniumhexafluorophosphat-3-oxid
HEPES	-	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIV	-	Human-Immunschwächevirus
HPLC	-	High-performance liquid chromatography
hRBC	-	human red blood cell
IgG	-	Immunoglobulin (Gamma)
Imd	-	Immune deficiency
kAMP	-	kationische antimikrobielle Peptide
KDO	-	2-Keto-3-octulosonat
LB	-	Luria broth
LPS	-	Lipopolysaccharid
LUV	-	Large unilamellar vesicle
MALDI-TOF	-	Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
MIC	-	Minimal inhibitory concentration
mRNS	-	<i>messenger</i> Ribonucleinsäure
NCF	-	Nitrocefin
ONPG	-	<i>o</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-galactosid
PBS	-	Phosphate-buffered saline
PC	-	Phosphatidylcholin
PE	-	Phosphatidylethanolamin
PG	-	Phosphatidylglycerol
PMX	-	Polymyxin
POPC	-	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPE	-	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
POPG	-	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-(phospho-rac(1-glycerol))
PRR	-	Pattern recognition receptor
RNS	-	Ribonucleinsäure
RP-HPLC	-	reversed-phase high-performance liquid chromatography
SDS	-	Sodium dodecyl sulfate
SPU	-	self-promoted uptake
SUV	-	Small unilamellar vesicles
TFA	-	Trifluoroacetic acid
TLR	-	Toll-like receptor
<i>t</i> <sub>0</sub>	-	Totzeit
<i>t</i> <sub>R</sub>	-	Retentionszeit
TRIS	-	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	-	Teichonsäure
UV/VIS	-	Ultraviolett/Visueller Bereich
WHO	-	World Health Organization

## 6.2 Aminosäuren / Übersicht



**Abbildung I / Übersicht der Aminosäurerestgruppen und ihre Strukturklassen**

I aliphatisch: (1) Glycin (Gly/G), (2) Alanin (Ala/A), (3) Valin (Val/V), (4) Leucin

(Leu/L), (5) Isoleucin (Ile/I)

II schwefelhaltig: (6) Cystein (Cys/C), (7) Methionin (Met/M)

III aromatisch: (8) Phenylalanin (Phe/F), (9) Tyrosin (Tyr/Y), (10) Tryptophan

(Trp/W), (11a) 1-Naphtylalanin (Nal/Nal), (11b) 2-Naphtylalanin (Nal/Nal)

III Iminosäure: (12) Prolin (Pro/P)

IV neutral: (13) Serin (Ser/S), (14) Threonin (Thr/T), (15) Asparagin (Asn/N), (16)

Glutamin (Gln/Q)

V sauer: (17) Asparaginsäure (Asp/D), (18) Glutaminsäure (Glu/E)

VI basisch: (19) Histidin (His/H), (20) Lysin (Lys/K), (21) Arginin (Arg/R)

## 6.3 Lipid- / Cholesterinstrukturen

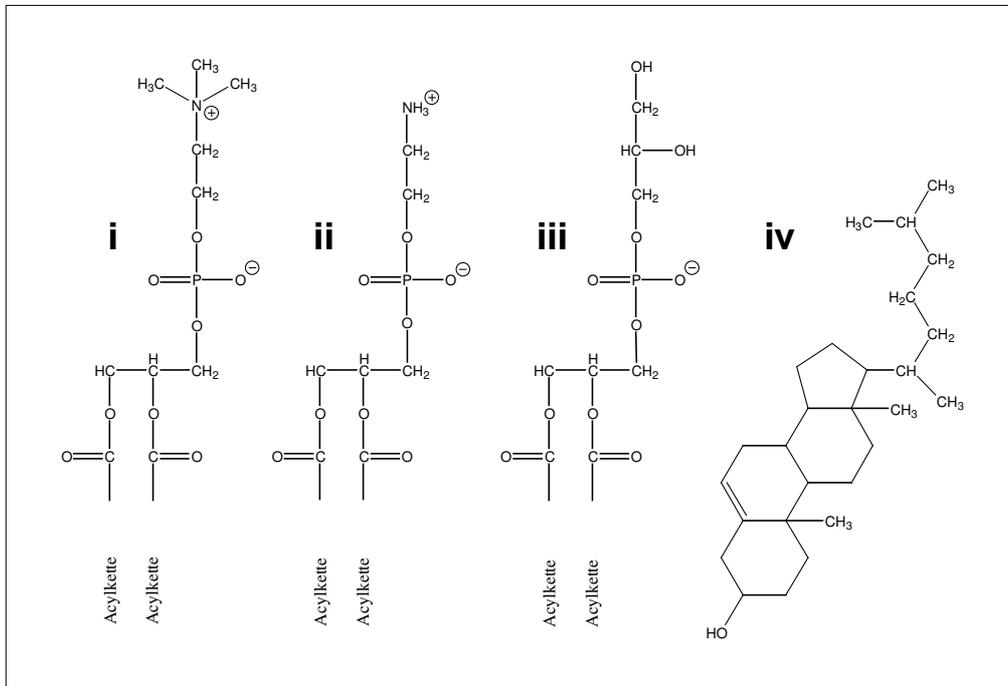
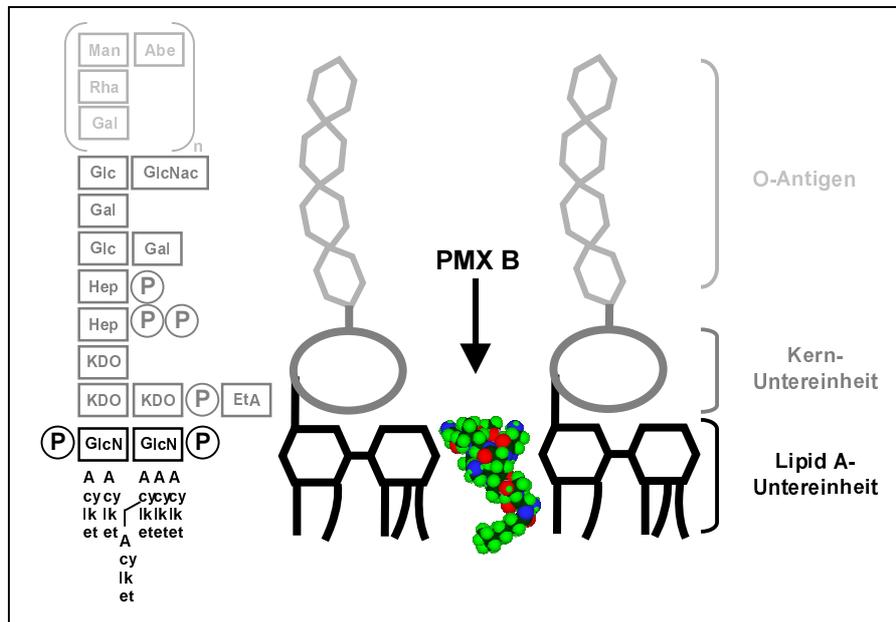


Abbildung II / Übersicht der verwendeten Membranlipide

- (i) 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC)
- (ii) 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (POPE)
- (iii) 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-(phospho-*rac*(1-glycerol)) (POPG)
- (iv) Cholesterin

## 6.4 Chemische Struktur von einem Lipopolysaccharid



**Abbildung III / Chemische Struktur eines Lipopolysaccharides** Dargestellt ist ein Lipopolysaccharidmolekül mit seinen drei Domänen Lipid A, Kernzone (welche häufig noch in innere und äußere Kernzonen gegliedert wird) und O-Antigen. Die Lipid A-Untereinheit besteht aus einem kurzen Rückgratkonstrukt aus zwei Glucosamineinheiten. An das Rückgrat sind mehrere Acylketten kovalent geknüpft, welche das gesamte Molekül in der Lipiddoppelschicht verankern. An die Lipid A-Domäne schließt sich die Kernzonendomäne an, welche aus verzweigten Polysacchariden und den nur bei Gram-negativen Bakterien vorkommenden Hep- und KDO-Zucker besteht. An die Kernzone ist das O-Antigen kovalent gebunden, welches aus sich wiederholenden Hexoseeinheiten besteht und so Kohlenhydratketten ausbildet. Die Acylkette des Polymyxin B interagiert mit den Acylketten der Phospholipide (Pfeil) und kann sich so in die Lipiddoppelschicht setzen. (Abe, Abequose; EtA, Ethanolamin; Gal, Galactose; Glc, Glucose; GlcNac, N-acetylglucosamin; Hep, Heptose; KDO, 2-keto-3-desoxyoctonsäure; Man, Mannose; P, Phosphatgruppen; Rha, Rhamnose).

## 6.5 Zusammenfassung / Summary

### 6.5.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Struktur-Wirkungsbeziehungen von R-/W-reichen antimikrobiellen Hexapeptiden, welche von der Sequenz RRWWRF abgeleitet waren. Studien an Gram-positiven und –negativen Bakterien haben gezeigt, dass die cyclischen Analoga im Vergleich zu den linearen Peptiden eine hohe antimikrobielle Aktivität besaßen bei gleichzeitiger moderater Lyse der Erythrocyten. Farbstofffreisetzungsversuche aus Liposomen, welche die Lipidkomposition der Cytoplasmamembran der jeweiligen Zellspezies repräsentierten, zeigten, dass die Peptide in der Lage waren, neutrale und stark negativ geladene Lipiddoppelschichten zu permeabilisieren. Diese Befunde korrelierten mit den Ergebnissen aus den biologischen und biophysikalischen Untersuchungen, und es konnte geschlussfolgert werden, dass die antimikrobiellen Aktivitäten gegen *Bacillus subtilis* und die Hämolyse aufgrund von Peptid-Membraninteraktionen zu Stande kamen.

Obwohl eine hohe Aktivität gegen Gram-negative Bakterien beobachtet werden konnte, zeigten Permeabilisierungsstudien an entsprechenden Liposomen keine Lyse durch die Peptide. Ergebnisse der Permeabilisierungsstudien *in vivo* ließen erkennen, dass es zu einer Permeabilisierung der äußeren und nur in sehr geringem Umfang der inneren Membran kommt.

Alle Ergebnisse zusammengenommen zeigten deutlich, dass die antimikrobielle Aktivität der untersuchten Peptide Struktur determinanten folgt. Dabei ist die Ausbildung einer amphipathischen Struktur, wie sie durch NMR-Messungen bestätigt wurde, essentiell für die antimikrobielle Wirkung.

### 6.5.2 Summary

In the present thesis the structure-function relationships of R-/W-rich antimicrobial hexapeptides that were derived from the lead sequence RRWWRF were investigated. Studies revealed that cyclic analogues were more active against Gram-positive and Gram-negative bacteria than the corresponding linear analogues, but displayed at the same time only moderate haemolytic activity. Dye release experiments with liposomes representing the phospholipid composition of the target bilayer of each cell species demonstrated permeabilizing activity of the hexapeptides towards neutral and highly negatively charged phospholipid bilayers. From the correlations with the data from the biological and biophysical experiments it is concluded that the observed antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* and the haemolytic effect are based on peptide membrane interactions.

Even though very high antimicrobial activity against Gram-negative cells was observed, no permeabilization of the corresponding liposomes by the peptides could be demonstrated. Permeability

studies *in vivo* showed strong permeabilization of the outer and only weak permeabilization of the inner membrane.

Taken together the studies indicate that antimicrobial activity is strongly determined by peptide structure. Furthermore, the formation of an amphipathic structure, as revealed by NMR-studies, is essential for the antimicrobial activity of the hexapeptide analogues.

## 6.6 Publikationen

### 6.6.1 Artikel

Wessolowski, A., Bienert, M., Dathe, M. "Antimicrobial activity of arginine- and tryptophan-rich hexapeptides: the effects of aromatic clusters, D-amino acid substitution and cyclization" (eingereicht bei The Journal of Peptide Research)

Appelt, C., Wessolowski, A., Dathe, M., Schmieder, P. „Structure of the antimicrobial hexapeptide cycloRRWWRF and its analogues in solution and bound to detergent micells“ (Manuskript in Vorbereitung)

### 6.6.2 Symposiumsbeiträge

Wessolowski, A., Nikolenko, H., Bienert, M., Dathe, M. „Arginine- & tryptophan-rich hexapeptides: cyclization results in high antimicrobial activity“, 9<sup>th</sup> Graduate Students´ Symposium Berlin, 26. June 2003 (Posterpreis)

Wessolowski, A., Nikolenko, H., Bienert, M., Dathe, M. „Sequence- & conformation dependent antimicrobial activity of arginine- & tryptophan-rich hexapeptides“, 6<sup>th</sup> German Peptide Symposium Berlin, 23. -26. March 2003

Dathe, M., Nikolenko, H., Wessolowski, A., Schmieder, P., Beyermann, M., Bienert, M.. „The Membrane Activity and Selectivity of Linear and Cyclic Hexapeptides“, 8th Liposome Research Days Conference Berlin, 21. – 24. May 2002 (Poster Abstract erschienen in: Journal of Liposome Research (2003), Vol. 13 (1); 58)

## **6.7 Curriculum vitae**

Entfällt in der Online-Version!



## 6.8 Danksagung

Herrn Prof. M. Bienert und Frau Dr. M. Dathe möchte ich für die Möglichkeit danken, an einem sehr interessanten Thema zu arbeiten.

Herrn Prof. R. Mutzel (Freie Universität Berlin) danke ich vielmals, dass er sich bereit erklärt hat, diese Promotion zu betreuen, und für seine Unterstützung während dieser Arbeit.

Für die Unterstützung auf dem Gebiet der Peptidsynthese danke ich Herrn Dr. Beyermann, Frau H. Hans, Frau A. Klose, Herrn B. Schmikale und Frau A. Ehrlich. Für die Hilfe bei der Durchführung der HPLC-Messungen und den Spaß im Labor danke ich Frau D. Krause.

Herrn Dr. E. Krause, Herrn Dr. Schümann und Frau Lerch möchte ich für die sehr geschätzte Hilfe bei den Massenbestimmungen danken.

Der AG Siems danke für das geleistete „Laborasy!“ und die entspannte Atmosphäre. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. B. Maul für sein „offenes Ohr“ und objektive Meinung bedanken.

Den Herren Christian Appelt und Gunnar Kleinschütz danke ich für die Unterstützung bei NMR- und Connoly-Fragen.

Bei Frau Dr. J. Klose und Herrn Dr. S. Rothmund bedanke ich mich für die vielen wissenschaftlichen und auch mal weniger wissenschaftlichen Diskussionen.

Dank auch an einen Großteil der Doktoranden der AG Peptidchemie (geteiltes Leid...), wobei ich mich besonders bei unserem neutralen Schweizer S. Keller für die Korrektur des Manuskripts und die Diskussionen bedanken möchte.

Ein ganz großes „Dankeschön“ an die TA der TAs Frau Heike Nikolenko (wenngleich sie gar keine ist) für jegliche Unterstützung im Labor und ´ne ganze Menge Spaß bei der Arbeit. Ohne sie wären die Arbeiten niemals so zügig vorangekommen.

„Tack so mycket!“ in Richtung Schweden, wo ich in einer wirklich tollen Arbeitsgruppe arbeiten und so viel von Herrn Dr. L. Good, Herrn R. Dryselius, Frau A. Kulyté und Frau N. Nekhotaeva lernen durfte. Dabei nicht zu vergessen die Herren A. Floren und Dr. M. Hällbrink und seine Frau Dr. M. Lindgren für unvergessliche Tage in und um Stockholm (Skoll!).

Last but not least – meine kleine Familie, die in den letzten Monaten so viel erdulden musste und mich dennoch unterstützt hat und es immer wieder irgendwie schaffte Verständnis aufzubringen. Vielen Dank!

Sollten hier einige Namen fehlen, so geschah dies nicht aus Undankbarkeit, sondern aus reiner Faulheit.

„But, I was continually fascinated by science and those scientists who are really driven by their need to understand and the pleasure to think rather than by career requirements, competitive spirit, or political considerations. Happily, there are still a few of us left.“

Prof. H. Lehrach

## **6.9 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Weder diese noch eine andere Arbeit wurde von mir an einer anderen Universität oder Hochschule zum Zwecke der Einleitung eines Promotionsverfahrens vorgelegt.

Berlin, im April 2004