



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences



Masterarbeit
Master of Science

Thioether-basierte Immobilisierung und Charakterisierung von NK- Lysin-basierten antimikrobiellen Peptiden

Department Biotechnologie
Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Eingereicht von:

Marina Lesniewski



Hamburg, 11. März 2022

1 Gutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä, HAW Hamburg

2 Gutachter: Prof. Dr. Gesine Cornelissen, HAW Hamburg

Danksagung

Ich möchte mich aus ganzen Herzen für die Unterstützung und Begleitung meiner spannenden Masterarbeit bei Herr Prof. Dr. Jörg Andrä bedanken.

Außerdem bedanke ich mich für die Hilfestellung und Engagement bei dem gesamten BPA Team, insbesondere bei Lisa Michel, die mir gegenüber immer offen war und mich mit Fachwissen begleitet hat und bei Frau Prof. Dr. Cornelissen, die meine Arbeit in einer Krisen-Situation verständnisvoll unterstützt hat. Desgleichen auch bei Hans-Peter Bertelsen und Ulrich Scheffler, die mir nicht nur mit technischer und organisatorischer Unterstützung zur Seite standen. Ohne deren Beitrag hätte ich meine Arbeit nicht ausführen können. Danke auch an meine Kommilitonen, die für eine unvergessliche Zeit und gute Laune gesorgt haben. Zum Schluss richte ich meinen Dank an meinen Mann und an meine Mutter, die mir immer zur Seite standen.

Kurzfassung

Die Verwendung von medizinischen Geräten und Implantaten stellt oft eine lebensrettende Maßnahme dar und bedingt meist die prophylaktische Einnahme von Antibiotika (Costa et al., 2011). Dies steigert jedoch den Antibiotikakonsum und fördert gleichzeitig die Entwicklung von multiresistenten Stämmen mit der Folge einer nachlassenden Wirksamkeit (C. Chen & Lu, 2020; Darouiche, 2004). Deshalb beschäftigen sich Forscher mit alternativen Therapiemöglichkeiten z. B. der Immobilisierung von Oberflächen mit antimikrobiellen Peptiden (Rapsch et al., 2014). Versuche im Tiermodell zeigten bereits vergleichbare Ergebnisse mit einer Antibiotikatherapie (Tan et al., 2014).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Testung des antimikrobiellen Peptids NK-2, seinen Derivaten sowie dem vom Bienengift abstammenden Melittin. Den Anfang der Arbeit bildet die Analyse der antimikrobiellen Aktivität der Peptide mittels zweier unterschiedlicher Verfahren, dem Agardiffusions- und dem Mikrodilutionstest. Anschließend wird eine Immobilisierung von vier NK-2 Derivaten auf verschiedenen Oberflächen untersucht.

In den Aktivitätstests wird der Testorganismus *E. coli* WBB01 verwendet. Die Untersuchungen zeigen, dass das am C-Terminus nicht amidierete ALK-OH die größte Aktivität besitzt. Außerdem zeigt die Modifizierung am C- und N-Terminus der ALK-NH₂ Peptide keinen signifikanten Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität.

Die nachfolgenden Immobilisierungsversuche auf einer Polystyrol-Mikrotiterplatte Rotilabo® (Carl Roth) mittels hydrophober Wechselwirkungen sowie auf eine Harzoberfläche (SulfoLink® Coupling Resin) mittels kovalenter Thioetherbindung blieben bei allen vier Peptiden erfolglos. Auch die Verlängerung der Inkubationszeiträume während der Harzkopplung bis zu zwei Tagen sowie die Reduzierung der Harzmoleküle vor der Kopplung, führten nicht zum Erfolg.

Inhaltsverzeichnis

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
II.	ANHANGSVERZEICHNIS	II
1	EINLEITUNG.....	1
2	ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE	3
2.1	CHARAKTERISTIKA	4
2.2	SYNTHESE VON ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDEN.....	6
2.3	WIRKUNGSPRINZIP	6
2.4	RESISTENZBILDUNG.....	11
2.5	TOXIZITÄT.....	12
2.6	IMMOBILISIERUNG.....	13
2.6.1	Physikalische Immobilisierung	15
2.6.2	Chemische Immobilisierung.....	17
3	MATERIAL UND METHODEN.....	28
3.1	GERÄTE.....	28
3.2	CHEMIKALIEN	29
3.3	MATERIALIEN	31
3.4	ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE.....	32
3.5	TESTORGANISMUS.....	35
3.6	ANALYTISCHE VERFAHREN.....	35
3.6.1	Agardiffusionstest	35
3.6.2	Mikrodilutionstest.....	37
3.6.3	Tricin-SDS-PAGE	39
3.6.4	Größenausschlusschromatographie	41
3.6.5	Umkehrphasen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	43
3.7	PEPTIDIMMOBILISIERUNG AUF POLYSTYROL	45
3.8	PEPTIDIMMOBILISIERUNG AUF HARZ	46
4	ERGEBNISSE	50
4.1	EIGENSCHAFTEN DER ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDE	50

4.2	AGARDIFFUSIONSTEST	52
4.2.1	Vergleich der antimikrobiellen Peptide	53
4.2.2	Auswirkungen der C-terminalen Amidierung	57
4.2.3	Auswirkungen der Spacerpositionierung im ALK-NH ₂	58
4.2.4	Gesamtübersicht der aktiven Peptide.....	59
4.3	MIKRODILUTIONSTEST.....	60
4.4	TRICIN-SDS-PAGE	61
4.5	PEPTIDIMMOBILISIERUNG	63
4.6	RP-HPLC-ANALYSE DER ALK-PEPTIDE.....	73
5	DISKUSSION	76
6	FAZIT UND AUSBLICK.....	81
7	LITERATURVERZEICHNIS	82
8	ANHANG	I

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADT	Agardiffusionstest
AMP	Antimikrobielles Peptid
AS	Aminosäure
CFU	Koloniebildende Einheit (engl. <i>Colony Forming Unit</i>)
CV	Säulenvolumen (engl. <i>Column Volume</i>)
Da	Dalton
DTT	1,4-Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
H	Hydrophobizität
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethan-sulfonsäure
LB	Lauria-Bertani Medium
LbL	Substratschichtung (engl. <i>Layer-by-Layer</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
MDT	Mikrodilutionstest
MIC	minimale Inhibierungskonzentration (engl. <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)
MTT	3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
MW	Molekulare Masse (engl. <i>Molecular Weight</i>)
MRSA	Multiresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
μ_H	hydrophobes Moment
NaPB	Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
PG	Phosphatidylglycerol
RP-HPLC	Umkehrphasen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)

SEC	Größenausschlusschromatographie, (engl. <i>Size Exclusion Chromatography</i>)
SOP	Standardarbeitsanweisung engl. standard operating procedure
TFA	Trifluoressigsäure
TSB	Soja-Casein-Pepton-Medium (engl. <i>tryptic soy broth</i>)
VE	Vollentsalztes Wasser
WBB01	<i>Escherichia coli</i> Stamm WBB01
WCB	Arbeitszellbank (engl. <i>working cell bank</i>)

II. Anhangsverzeichnis

A.	Abbildungsverzeichnis	i
B.	Tabellenverzeichnis	v
C.	MIC-Werte	vii
D.	MATLAB Code.....	viii

1 EINLEITUNG

In der heutigen Medizin sind medizinische Geräte nicht mehr wegzudenken. Der Einsatz von Implantaten und medizinischen Produkten wie Kathetern, Herzklappen, Stents, Shunts, orthopädischen Prothesen und Materialien zur Fixierung von Knochenbrüchen steigt und stellt oft eine lebensrettende Maßnahme dar (Costa et al., 2011). Neben den physiologischen und mechanischen Anforderungen müssen die Geräte und Implantate eine keimfreie Sicherheit gewährleisten. Sollte es dennoch zu einer bakteriellen Verschleppung kommen, führt das möglicherweise zu einer Biofilmbildung und kann potenziell chronische Infektionen hervorrufen (Costa et al., 2018; Ramasamy und Lee, 2016). Infolgedessen sind ernste Verschlechterungen des Gesundheitszustandes, Entfernungen des medizinischen Produktes und weitere Komplikationen mit verlängerter Hospitalisierung nicht ausgeschlossen (Darouiche, 2004). Deshalb besteht eine dringende Notwendigkeit der Kolonisierung von Bakterien auf biomedizinische Geräte und Implantaten vorzubeugen. Derzeitige Ansätze schreiben eine Prophylaxe bzw. Behandlung mit Antibiotika und operative Eingriffe vor. Im Falle einer persistierenden Infektion muss das Gerät allerdings entfernt werden (Darouiche, 2004).

Der prophylaktische Einsatz von Antibiotika birgt jedoch ein Dilemma in sich. Durch den gesteigerten Verbrauch und der Entwicklung neuer Resistenzen in den vergangenen Jahrzehnten kam es zu einer abschwächenden Wirksamkeit und der Verbreitung multiresistenter Bakterien. Gleichzeitig schwinden die Behandlungsmöglichkeiten mit den Reserveantibiotika (Chen und Lu, 2020). Deshalb besteht ein dringender Bedarf an antimikrobiellen Breitspektrummitteln.

Aus diesen Gründen beschäftigen sich viele Forschungsgruppen mit der Beschichtung von Oberflächen mit antimikrobiellen Peptiden (Ivanov et al., 2012; Lim et al., 2013; Rapsch et al., 2014). Diese Peptide weisen ein breites Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien ebenso wie gegen Antibiotika resistente Stämme auf (Andrä et al., 2008, 2011; Costa et al., 2018). Anders als bei den Antibiotika ist die Aktivität der antimikrobiellen Peptide nicht von der Wachstumsphase

der Bakterien abhängig, was besonders wichtig in der Behandlung von Biofilmen ist (Costa et al., 2018; Füssle, 2010). Versuche im Tiermodell haben bereits erfolgreiche Implantat-Behandlungen von Infektionen gezeigt (Cole et al., 2010; Faber et al., 2005; Tan et al., 2014).

Das Ziel dieser Arbeit ist im ersten Schritt die antimikrobielle Aktivität anhand der verschiedenen Verfahren zu testen. Dazu werden der Agardiffusions- sowie der Mikrodilutionstest angewandt. Insgesamt werden 16 NK-2 Modifikationen und das vom Bienengift abstammende Melittin untersucht.

Im nächsten Schritt wird versucht vier ausgewählte Peptide mit einem terminalen Cysteinrest an verschiedene Oberflächen zu koppeln. Die vier Peptide unterscheiden sich in ihrem Sequenzaufbau. Zwei der Peptide besitzen jeweils einen C-Terminalen oder N-Terminalen Cysteinrest. Von diesen zwei besitzt das eine Peptid noch zusätzlich einen 5-atomigen Spacer zwischen dem Cysteinrest und der Sequenz. Zu den Immobilisierungsoberflächen zählen das Polystyrol einer Mikrotiterplatten sowie eine mit Spacer beschichtete Harzoberfläche.

Zur Unterstützung werden chromatographische sowie elektrophoretische Verfahren angewandt. Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (SEC) kann das für die Kopplungsreaktion störende Agens entfernt und das Ergebnis der Entsalzung mittels der Umkehrphasen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) dokumentiert werden. Die anschließende elektrophoretische Trennung mittels der Tris-Tricin-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (Tris-Tricin-SDS-PAGE) liefert eine Aussage über das Ergebnis der Kopplung.

2 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE

Die antimikrobiellen Peptide zählen zu den angeborenen Abwehrsystemmechanismen des Menschen sowie vieler anderer Spezies wie Insekten, Säugetiere und Amphibien. Deren Ziel ist es den Organismus vor dem Befall von Bakterien, Viren und Parasiten und sogar vor Krebszellen zu schützen. Auf Grund ihrer therapeutischen Möglichkeiten werden diese Peptide als „new antibiotics“ bezeichnet. Jedoch ist die explizite Funktionsweise nicht komplett erforscht (Schröder-Borm et al., 2003). Bisher sind mehr als 2500 AMPs in Datenbanken hinterlegt. Diese wurden aus der Tierwelt, Bakterien, Pilze, Pflanzen und den Viren isoliert (Wang et al., 2015). Die Diversität an AMPs ist sehr groß, denn eine einzige Mutation kann die Effektivität eines jeden Peptids drastisch verändern. Die Ursache für diese breite Wirkungsweise ist auf die evolutionäre Adaptation der vorherrschenden bakteriellen Umgebung zurück zu führen (Zaslhoff, 2002).

Aus den Beobachtungen der natürlich vorkommenden Peptide und deren Funktionsbereichen entstanden viele abgeleitete antimikrobielle Derivate wie z. B. das NK-2, welches die aktive Sequenz von NK-Lysin ist und aus den Killer-Zellen von Schweinen stammt (Liepinsh et al., 1997). Auf der Suche nach Verbesserung z. B. in der Effektivität, Biokompatibilität sowie Stabilität entstanden durch den Austausch von einzelnen Aminosäuren viele modifizierte Sequenzen. (Andrä et al., 2007; Gross et al., 2013). Ein Beispiel für eine verminderte Oxidationsbereitschaft ist der Austausch der thiolgruppenhaltigen und damit zur Oxidation neigender Aminosäure Cystein durch Alanin in dem NK-2 Derivat C7A. Im Gegensatz zu Cystein besteht die Seitenkette von Alanin aus einer stabilen Methylgruppe. Trotz des Austausches behält das Peptid seine strukturellen sowie physisch-chemischen Eigenschaften (Andrä et al., 2011).

Diese Arbeit beschäftigt sich ebenfalls mit dem Peptid NK-2 sowie seinen Derivaten. Diese besitzen eine α -helikale Sekundärstruktur und einen amphipathischen Charakter. Das NK-2 zeigt eine Vorliebe für Membranen mit negativ geladenen Lipiden und ist sehr effektiv gegenüber Bakterien, Pilzen und den Parasiten wie z. B.

Trypanosoma cruzi. Gleichzeitig zeigt es geringe Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen (Andrä et al., 2004).

Neben den eher unbedenklichen Peptiden wie dem NK-2 und seinen Derivaten wurde auch das hämolysierende Peptid Melittin untersucht. Dieses AMP besitzt eine α -helikale Struktur und kommt im Bienengift vor (Habermann und Jentsch, 1967). Ohne eine besondere Selektivität, zeigt es eine große Aktivitätsbreite gegenüber verschiedenen Zellen. Mehrere Studien belegen die unspezifische Wirkung gegenüber Bakterien, Pilzen, und menschlichen Zellen (Andrä et al., 2011).

2.1 CHARAKTERISTIKA

Zur Klassifizierung von Peptiden werden häufig physikochemische Eigenschaften hinzugezogen. Dazu werden Parameter wie Größe, Sequenz, Ladung, Struktur, Hydrophobizität und Amphipathizität betrachtet (Lanig, 2012).

GRÖSSE

Die Größenangaben für die antimikrobiellen Peptide sind je nach Verfasser etwas unterschiedlich. Die gewöhnliche Länge liegt zwischen 6 bis 59 Aminosäuren (AS) oder aus 12 bis 100 AS. Dabei sind Di- und Tripeptide möglich (Brogden, 2005; Jenssen et al., 2006; Schröder-Borm et al., 2003).

SEQUENZ

Häufig kommen die folgenden basischen Aminosäuren in der Sequenz vor: Lysin (K) oder Arginin (R), die hydrophoben AS: Alanin (A), Leucin (L), Phenylalanin (F), Tryptophan (W), Isoleucin (I), Tyrosin (Y) und Valin (V). Manche Peptide beinhalten Wiederholungen der Aminosäuren. Das Verhältnis von hydrophoben zu geladenen AS kann schwanken von 1:1 auf 2:1 (Brogden, 2005).

LADUNG

Die kationischen Peptide zeichnen sich durch ihre stark positive Ladung aus. Die Gesamtladung kann von +2 bis +9 variieren. Peptide mit höherer Ladung besitzen eine stärkere Aktivität als Peptide mit einer niedrigen oder neutralen Ladung (Costa et al.,

2018; Jenssen et al., 2006). Diese Arbeit befasst sich mit Peptiden mit einer Ladung von +6 bis +12. Das Peptid mit der schwächsten positiven Ladung (+6) ist das inaktive Kontrollpeptid (NK-11).

STRUKTUR

Die meisten AMPs können nach ihrer vorherrschenden Sekundärstruktur in 4 Gruppen eingeteilt werden: α -Helix ; β -Faltblatt; gemischt vorkommende α -Helix/ β -Faltblatt und gestreckte (engl. *extended*) Struktur (Steckbeck et al., 2014).

Die Peptide müssen aber nicht von vornherein eine Sekundärstruktur haben. Beobachtungen zeigen, dass die äußere Umgebung eine Konformationsveränderung auslösen kann. Die α -helikalen AMPs liegen gewöhnlich unstrukturiert in wässriger Lösung vor und bilden erst in der Nähe von Membranen oder membranähnlicher Umgebung ihre amphipathische helikale Ordnung aus (Costa et al., 2018). Ein Beispiel ist das Peptid LL-37. Es ändert seine Struktur aus einem Zufallsknäuel (engl. *random-coil*) zu einer α -Helix-Sekundärstruktur in Anwesenheit von einem Lösungsmittel oder Lipid A. Diese Konformitätsänderung ist notwendig, um sich an die Membran anzulagern und sie zu infiltrieren (Brogden, 2005).

Die Gruppe der β -Faltblatt AMPs ist dagegen weniger flexibel. Ihre Struktur ist durch Disulfidbrücken stabilisiert und bildet somit eine starre Ordnung. Ein Beispiel dafür ist das β -Defensin. Dieses Peptid richten sich senkrecht zu der Membran aus und bildet toroidale Poren indem es sich in die Membran einschleibt (Costa et al., 2018).

Die Gruppe der gestreckten AMPs hat keine vorherrschende Sekundärstruktur. Obwohl viele dieser AMPs nicht mit der bakteriellen Membran interagieren, kann eine antimikrobielle Aktivität beobachtet werden, vorausgesetzt die Peptide schaffen es in die Zelle einzudringen, um dort mit den inneren Zellbestandteilen in Verbindung zu treten (Costa et al., 2018).

AMPHIPATHIZITÄT

Die AMPs besitzen grundsätzlich einen amphipathischen Charakter. Dieser beruht auf der unterschiedlichen Positionierung der hydrophilen und lipophilen Domänen (Steckbeck et al., 2014). Der amphiphile Charakter ermöglicht es den AMPs sich

sowohl in polarer, z. B. Wasser, als auch in unpolarer Lösung teilweise zu lösen. Für die α -helikalen Peptide kann ein hydrophobes Moment angegeben werden. Bei Peptiden mit einer anderen Sekundärstruktur ist die Hydrophobizität schwieriger zu ermitteln, auf Grund der räumlichen Trennung der hydrophilen und hydrophoben Bereiche (Brogden, 2005).

2.2 SYNTHESE VON ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDEN

Die Herstellung der Peptide kann auf unterschiedlichen Wegen ablaufen (Rapsch et al., 2014). Die Synthese der Peptide kann entweder mit Hilfe der rekombinanten DNA Technologie oder chemisch erfolgen (Rapsch et al., 2014). Ein gängiges Verfahren ist die Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Festphasenpeptidsynthese. Mit dieser Technik können Peptide ausgehend vom C-Terminus schrittweise bis zum N-Terminus synthetisiert werden. Dabei wird das Peptid aus geschützten Aminosäuren aufgebaut (Fields und Noble, 1990). Diese Methode ist wegen der hohen Produktionskosten und der begrenzten Produktionsmenge gut für den kleinen Maßstab geeignet. Für größere Maßstäbe wäre die rekombinante DNA Technologie mit anschließenden Aufreinigung in Betracht zu ziehen, wobei hier eine passende Strategie entwickelt werden muss (Rapsch et al., 2014).

2.3 WIRKUNGSPRINZIP

Die Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide, wie die positive Gesamtladung und die amphipathische Natur, ermöglichen es ihnen mit der bakteriellen Membran zu interagieren, in sie einzudringen und Poren auszubilden. Dabei spielt die elektrostatische Anziehung eine wichtige Rolle. Die Interaktion der AMPs mit der bakteriellen Membran bewirken eine Zerstörung des pH Gradienten, des osmotischen Drucks und die Inhibierung der Zellatmung. Ein Beispiel ist die Behandlung von *E. coli* mit Magainin 2. Es kommt zu einem Austritt von Kalium aus der Zelle und schließlich zum Zelltod (Brogden, 2005).

Obwohl die genauen Wirkungsweisen noch nicht in ihrer Ganzheit erforscht sind und bereits weitere Mechanismen außer der Zellwandinteraktion bekannt sind, wird

dennoch größtenteils die Plasmamembran als der zentrale Angriffspunkt verstanden (Costa et al., 2018; Zasloff, 2002).

WECHSELWIRKUNG MIT DER MEMBRAN

Die antimikrobiellen Peptide wirken in einer Abfolge von Schritten. Zuerst werden die positiv geladenen antimikrobiellen Peptide an die negativ geladene Zelloberfläche elektrostatisch angezogen. Dabei besitzen sowohl die gramnegativen als auch die grampositiven Bakterien negativ geladene Bereiche. Bei den gramnegativen Bakterien interagieren die AMPs mit den negativ geladenen Phospholipiden und Phosphatgruppen. Bei den grampositiven Bakterien dagegen mit der Teichonsäure. Im zweiten Schritt findet die Anlagerung statt. Bei gramnegativen Bakterien werden dabei zuerst die Polysaccharide durchquert bevor die äußere Plasmamembran erreicht wird. Bei grampositiven Bakterien wird die Lipoteichonsäure und Teichonsäure durchwandert bevor die AMPs an die Zytoplasmamembran treffen. Im dritten Schritt können die AMPs in die Lipiddoppelschicht einwandern. Bei einem geringen Peptid/Lipid Verhältnis lagern sich die Peptide parallel an die Doppelschicht an. Sobald das Peptid/Lipid Verhältnis steigt, ordnen sich die Peptide zusammen senkrecht an und durchqueren die Membran. Dabei werden Poren ausgebildet. Die meist verwendeten Erklärungsmodelle sind das Barrel-Stave-; das Carpet- und das Toroidal-Poren-Modell (Brogden, 2005).

BARREL-STAVE-MODELL

Nach dem Barrel-Stave-Modell fügen sich die AMPs seitlich zusammen und formen wassergefüllte Kanäle, ähnlich eines Proteinkanals (s. Abbildung 1) (Costa et al., 2018). Dabei wenden sich die hydrophoben Domänen der AMPs der fettliebenden Seite der Membran zu, während die hydrophilen Seiten das Innere der Pore bilden (Brogden, 2005).

CARPET-MODELL

Beim Carpet-Modell sammeln sich die antimikrobiellen Peptide anfangs parallel an der Zelloberfläche an. Sobald mehr Peptide zusammenkommen, zerstören sie die Membrandoppelschicht ähnlich einem Detergenz. Dabei können sich Micellen ausbilden (s. Abbildung 1) (Brogden, 2005).

TOROIDAL-POREN-MODELL

Bei dem Toroidal-Poren-Modell formen die antimikrobiellen Peptide, wie das Melittin, mit den Phospholipiden der Membran, Krümmungen aus (Brogden, 2005). Dabei richten sich die hydrophilen Bereiche der Peptide mit den hydrophilen Köpfen der Phospholipide nach innen aus. Es entstehen Poren und andere Strukturen mit starker Krümmung (s. Abbildung 1) (Costa et al., 2018). Das Toroidal-Poren-Modell unterscheidet sich von dem Barrel-Stave-Modell dadurch, dass die Peptide in der gesamten Toroidal-Pore mit den hydrophilen Köpfen der Lipide verbunden sind (Brogden, 2005).

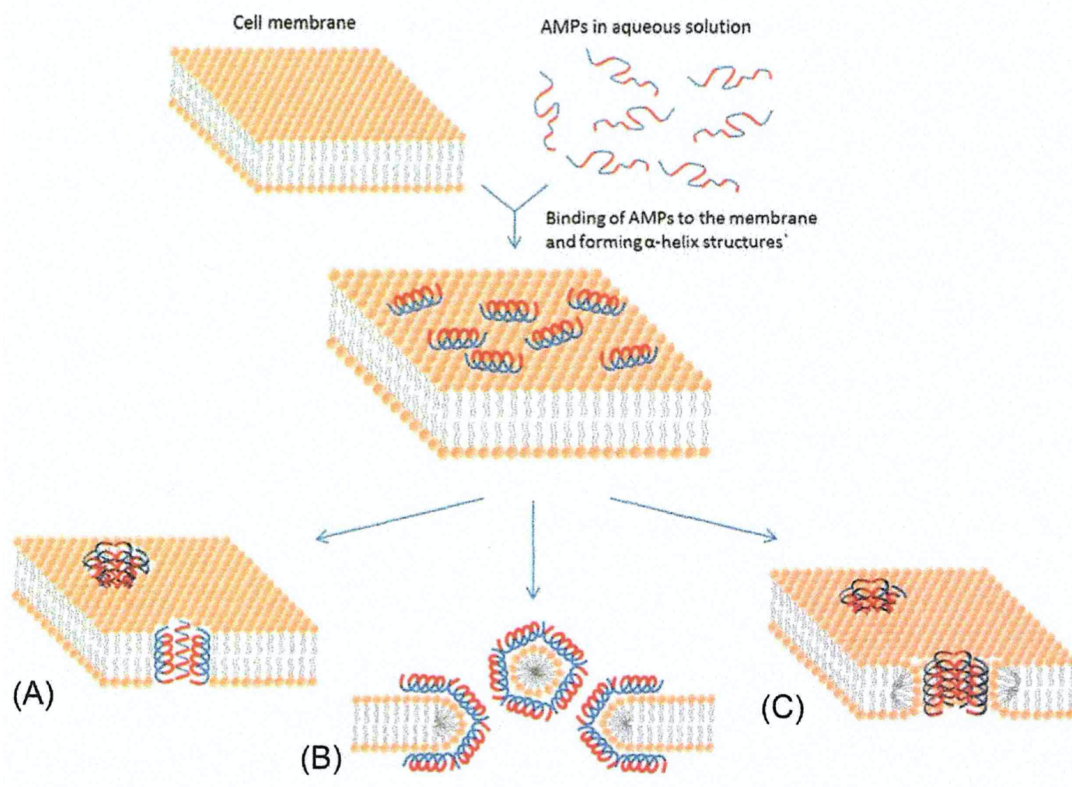


Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei meist verwendeten Wirkungsmechanismen der antimikrobiellen Peptiden: (A) Barrel-Stave Modell, (B) Carpet Modell und (C) Toroidal-Poren-Modell. Die hydrophoben Teile der AMPs sind in blau und die hydrophilen in rot dargestellt. Quelle: Costa et al., 2018.

Die drei vorgestellten Modelle sind nicht als getrennte Abläufe zu betrachten, sondern vielmehr ein miteinander verbundenes Konzept (Brogden, 2005).

WECHSELWIRKUNGEN MIT ZELLBESTANDTEILEN

Inzwischen sind zu den drei Aktivitätsmodellen weitere Erklärungen und Beobachtungen hinzugekommen. Die AMPs können neben der Zellmembran auch andere Zielorte haben. Die AMPs können über die Zelloberfläche, über Interaktionen von Membranproteine oder nach der Einwanderung in das Zytoplasma auf intrazelluläre Bestandteile einwirken (Brogden, 2005; Steckbeck et al., 2014). Brogden beschreibt detaillierter auf welche Art die AMPs ihre Wirkung entfalten können: Ausflockung der intrazellulären Bestandteile; Veränderung der Septenbildung der Zytoplasmamembran; Hemmung der Zellwandsynthese z. B. durch Freisetzung von Autolysin; Bindung an Nukleinsäure und Hemmung der Nukleinsäuresynthese z. B. Inhibition der RNA Polymerase; Hemmung der Proteinsynthese z. B. durch Bindung an Ribosomen und Inhibierung der Enzyme (s. Abbildung 2) (Brogden, 2005; Costa et al., 2018; Powers und Hancock, 2003). Neben dieser Aufzählung können die AMPs die zellwandabbauenden Hydrolasen aktivieren und damit ebenfalls einen fatalen Prozess anstoßen (Zaslouff, 2002).

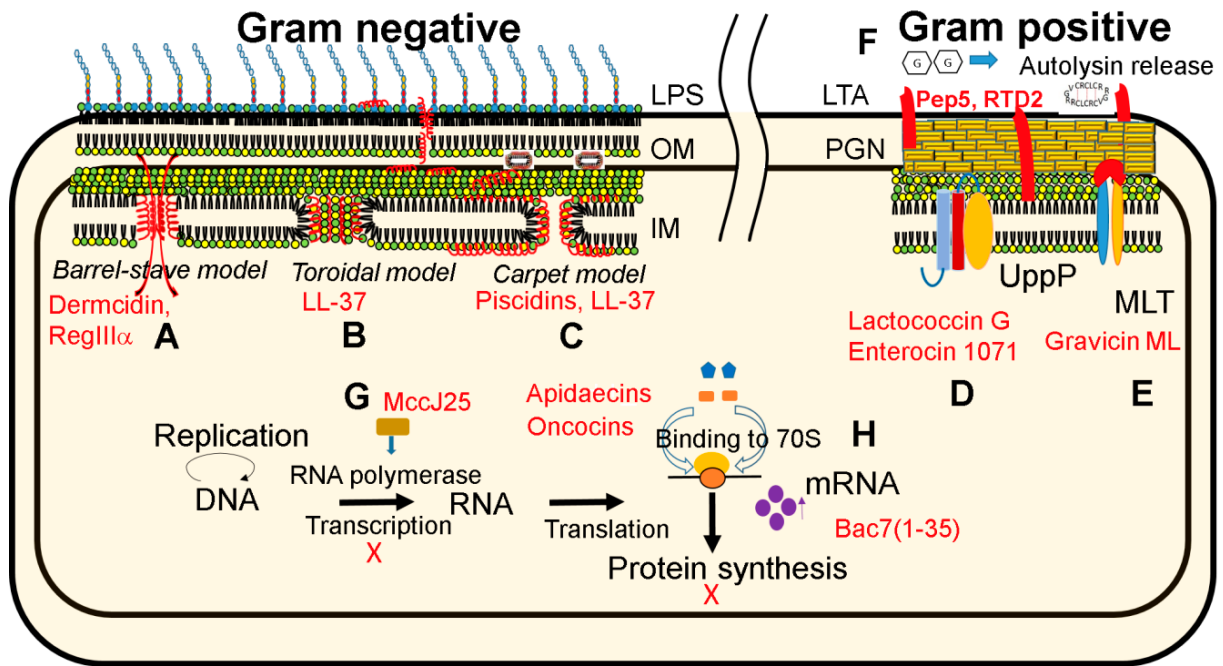


Abbildung 2: Derzeitig beobachtete Wirkungsorte von antimikrobiellen Peptiden mit der gramnegativen und der grampositiven Membran sowie mit anderen Zellbestandteilen. Die AMPs sind in rot dargestellt. (A) Ausbildung eines Membrankanals z. B. Dermicidin; (B) Ausbau einer torroidalen Pore z. B. LL-37; (C) Darstellung des Carpet Modells z. B. Piscidin; (D) rezeptorvermittelte Bindung an das membranbildende Enzym z. B. Lactococcin G; (E) Anlagerung an den Maltoserezeptor z. B. von Gravicin ML; (F) Freisetzung von Autolysin durch RTD2; (G) Inhibierung der RNA-Polymerase durch MccJ25; (H) Störung der Proteinsynthese durch Apidaecin. Definition der Abkürzungen: (OM) äußere Membran; (IM) innere Membran; (PGN) Peptidoglykan; (LTA) Lipoteichonsäure; (LPS) Lipopolysaccharide; (MLT) Maltosetransporter. Quelle: Wang et al., 2015.

Die antibakterielle Wirkung von AMPs kann jedoch von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Andrä et al. nennt dabei die Peptidkonzentration und spekuliert, dass das alleinige Durchdringen in die Membran für einen Zelltod unzureichend sein könnte und weitere Peptide notwendig sind. In seinen in-vitro Experimenten mit künstlichen Membranen zeigt er, dass die Ausformung von kleinen Membranläsionen bereits bei niedrigen Peptidkonzentrationen passiert, jedoch für ein Zelltod viel höhere Konzentrationen notwendig sind (Andrä et al., 2011).

Aber auch bakterielle Zellbestandteile beeinflussen die antimikrobielle Wirkung. Beispielweise können Cholesterol, Membranproteine, Lipoteichonsäure, Carotinoide und Lipid II die antibakterielle Aktivität abschwächen indem sie z. B. den Zugang zu

der bakteriellen Membran behindern, eine Stabilität verleihen oder in Wechselwirkung mit dem Peptid treten (Andrä et al., 2011; Zasloff, 2002).

Obwohl es bereits viele Erkenntnisse und Forschungen im Bereich der Wirkungsprinzipien von AMPs gibt, bedarf es dennoch weiterer Arbeiten, um die genauen Mechanismen zu erforschen (Costa et al., 2018). Auch die Frage warum manche Bakterien gegenüber bestimmten antimikrobiellen Peptiden empfindlicher sind, ist trotz zahlreicher Forschungen ungeklärt (Zasloff, 2002).

2.4 RESISTENZBILDUNG

Obwohl eine Resistenzbildung gegenüber den AMPs eher unwahrscheinlich ist, gibt es dennoch grampositive und gramnegative Bakterien, die eine Widerstandsfähigkeit besitzen (Costa et al., 2018; Teixeira et al., 2020; Zasloff, 2002). Ausgehend von der Wirkungsweise der AMPs kann abgeleitet werden, dass eine bakterielle Membran ohne negative Ladung oder mit einer sehr schwachen negativen Ladungsdichte eine bessere Verteidigungsposition besitzt (Andrä et al., 2011; M. Li et al., 2007). Ein Beispiel sind die Species *Morganella* und *Serratia*, die auf Grund einer schwachen Ladungsdichte eine Resistenz besitzen (Zasloff, 2002). Auch Versuche mit dem Mikroorganismus *Staphylococcus aureus* von Andrä et al. zeigen die Abhängigkeit der Resistenz von der Membranladung. Normalerweise besteht die Membran von *Staphylococcus aureus* zu einem Drittel aus dem kationischen lysyl-Phosphatidylglycerol (lysyl-PG), welches ihm die Resistenz verleiht. Versuche zeigen, dass Mutationen im Gen oder die Hemmung des verantwortlichen Membranproteins die zuvor existierende Resistenz gegenüber der AMPs deutlich herabsetzt (Andrä et al., 2011).

Andere Verteidigungsstrategien gegenüber den AMPs, sind die Sekretion von Proteasen und die damit einhergehende Zerstörung der Peptide z. B. im Falle der *Porphyromonas gingivalis* oder das Vorhandensein von Adhäsinen und Lektinen, wodurch die Bakterien einen Biofilm aufbauen und z. B. auf Kunststoffoberflächen persistieren können (Abdolhosseini et al., 2012; Höpfner, 2002; Zasloff, 2002).

Trotz dieser Beispiele werden wenige Resistenzen beobachtet. Zum einen, weil die AMPs direkt mit der Membran interagieren. Um das zu verhindern, müsste das Bakterium seine Membranzusammensetzung oder Anordnung komplett ändern, was eher schwierig erscheint. Zum anderen, im Falle der Sekretion von Proteasen, wäre ein Erkennungsepitop notwendig, um das „richtige“ Peptid zu verdauen. Ein solches Epitop besitzen die meisten AMPs nicht. Zudem kommt hinzu, dass im Falle einer bakteriellen Infektion der Organismus verschiedene antimikrobielle Peptide zur Verfügung hat. Damit wird das Überleben der Bakterien und somit auch die Resistenzbildung erschwert (Zaslouff, 2002).

Im Vergleich mit Antibiotika kommt die Resistenzentwicklung gegenüber den AMPs viel seltener vor (Costa et al., 2018). Ein Beispiel ist das antimikrobielle Peptid Protegrin-1. Nach 11 Subkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* oder 18 Subkulturen von Methicillin-Resistenten *Staphylococcus aureus* bei einer halben minimalen Inhibierungskonzentration (MIC) von Protegrin-1 konnte keine Resistenz festgestellt werden. Dagegen stieg unter gleichen Bedingungen die Resistenz gegenüber dem Gentamycin um das 190-fache und gegenüber dem Breitbandantibiotikum Norfloxacin um das zehnfache (Steinberg et al., 1997). Damit bergen die AMPs ein großes Potenzial in der therapeutischen und medizinischen Anwendung in sich.

2.5 TOXIZITÄT

Genauso wie bei vielen Medikamenten entfalten die AMPs ihre Hauptwirkung an der Biomembran (Byrne und Iwata, 2002). Die Membran der Bakterien unterscheidet sich jedoch im Aufbau und Zusammensetzung von der Plasmamembran der Eukaryonten. Die Membranphospholipide der bakteriellen Membran sind mit ihren negativ geladenen Teilen nach außen ausgerichtet, während die Phospholipide der pflanzlichen und tierischen Membran mit den negativ geladenen Gruppen nach innen zeigen. Dadurch besitzt die pflanzliche oder tierische Plasmamembran nach außen hin keine Ladung (Costa et al., 2018). Die geringere Anziehungsfähigkeit begründet die niedrigere Toxizität der AMPs gegenüber der eukaryotischen Membran (Andrä et al., 2011; Costa et al., 2018). Die Abbildung 3 veranschaulicht diesen Zusammenhang.

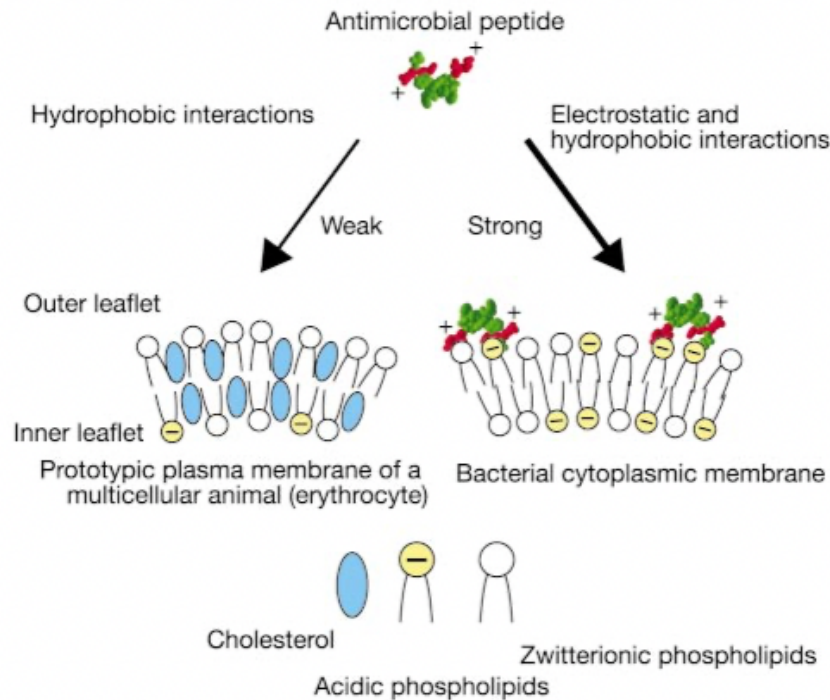


Abbildung 3: Darstellung einer bakteriellen Membran (rechts) und einer multizellulären Species z. B. Oberfläche eines Erythrozyten (links), welche in Wechselwirkung mit einem AMP tritt. Quelle: Zasloff, 2002.

Allerdings gibt es bei der großen Vielfalt der antimikrobiellen Peptide einige, die eine hohe Zelltoxizität aufweisen. Die Untersuchung mit Arenicin (Isoform 1) aus dem Wattwurm zeigt, dass das Arenicin vielmehr über hydrophobe Interaktionen als über elektrostatische Wechselwirkungen aktiv ist. Damit lässt sich die Zytotoxizität gegenüber den Eukaryoten erklären. Die Vorliebe für hydrophobe Interaktionen kann auf den natürlichen Lebensraum mit hohen Salzkonzentrationen des Wattwurmes zurückgeführt werden. (Andrä et al., 2008).

2.6 IMMOBILISIERUNG

Obwohl die antimikrobiellen Peptide vielversprechende Eigenschaften haben, gibt es ebenso wie bei herkömmlichen Medikamenten unerwünschte Aspekte. Diese sind: Neigung zu Instabilität; potenzielle Toxizität oder Langzeittoxizität in der systematischen Anwendung; Effektivität laut Tiermodellen erst bei einer hohen Dosis, welche sich bereits in der Nähe der toxischen Dosis befindet; hohe Produktionskosten und die Tendenz Aggregate zu bilden (Chen und Lu, 2020; Zasloff, 2002). Aus diesen

Gründen konnten viele der aussichtsreichen AMPs die klinischen Studien nicht passieren bzw. deren Nutzung wurde auf die lokale Anwendung beschränkt (Costa et al., 2018). Umso wichtiger ist es, ein genaues Verständnis von den Auswirkungen auf den menschlichen Körper zu erlangen (Chen und Lu, 2020).

Im Gegensatz zu den Schwierigkeiten für eine systemische in-vivo Anwendung, könnte eine kovalente Immobilisierung der AMPs auf einem Biomaterial diese Hindernisse überwinden und potenziell eine Anwendung bei der Beschichtung von Implantaten, Prothesen, Linsen etc. finden (Cole et al., 2010; Costa et al., 2018; Faber et al., 2005; Tan et al., 2014). Zudem gibt es Erkenntnisse, dass abgesehen von der langsameren Aktivitätsrate die immobilisierten Peptide keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität zu den gelösten Peptide haben (Xiang et al., 2014).

WIRKUNGSVERGLEICH DER CHEMISCH IMMOBILISIERTEN PEPTIDE

Im Gegensatz zu gelösten und frei beweglichen Peptiden, bleiben die kovalent immobilisierten Peptide an einer Stelle gebunden. Daher besitzen nur solche antimikrobielle Peptide das Potential, eine Anwendung in der kovalenten Immobilisierung zu finden, deren Wirkungsmechanismus insbesondere gegenüber der bakteriellen Membran ausgerichtet ist (Bagheri et al., 2012; Costa et al., 2018; Rapsch et al., 2014). Zwei Beispiele bestätigen, dass AMPs mit intrazellulären Zielorten einen starken Aktivitätsverlust erleiden. Das antimikrobielle Peptid Buforin 2 würde in seiner freien Form die bakterielle Membran überqueren und auf die Nukleinsäure einwirken. Ebenso würde das Tritrpticin in seiner frei beweglichen Form neben der Membran auch mit intrazellulären Bestandteilen interagieren. Bei kovalenter Immobilisierung verlor das Buforin 2 seine Effektivität gegenüber den Bakterien und das Tritrpticin erlitt einen starker Aktivitätsverlust. In beiden Fällen konnten die Zielorte gar nicht oder nur teilweise erreicht werden (Bagheri et al., 2012).

Ein weiterer Unterschied zu den freien Peptiden ist, dass kovalent gebundene AMPs eine hohe Dichte einer positiv geladenen Schicht ausbilden. Diese zieht die negativ geladene Bakterienmembran elektrostatisch stark an. Es kommt zu Interaktionen und führt zu einem Ungleichgewicht der bakteriellen Oberflächenladung. Daraus folgend können die inneren Schichten elektrostatisch durcheinandergebracht werden oder es kommt zur Aktivierung von autolytischen Enzymen oder gar zum Tod. (Hilpert et al.,

2009). Allerdings ist über das genaue Wirkungsprinzip der immobilisierten Peptide noch weniger bekannt als über die freien AMPs (Ivanov et al., 2012). Es kann aber behauptet werden, dass das Wirkungsprinzip selbst durch die Immobilisierung nicht beeinflusst wird (Bagheri et al., 2009).

Die beiden Immobilisierungsmethoden können in physikalische Adsorption und kovalente Immobilisierung untergliedert werden (Rapsch et al., 2014; Rostovtsev et al., 2002).

2.6.1 PHYSIKALISCHE IMMOBILISIERUNG

Die physikalische Adsorption kann in 4 Modelle (s. Abbildung 4) unterteilt werden. Dabei ist die Layer-by-Layer-Methode (LbL) eines der meist erforschten Verfahren in der physikalischen Adsorption (Costa et al., 2018).

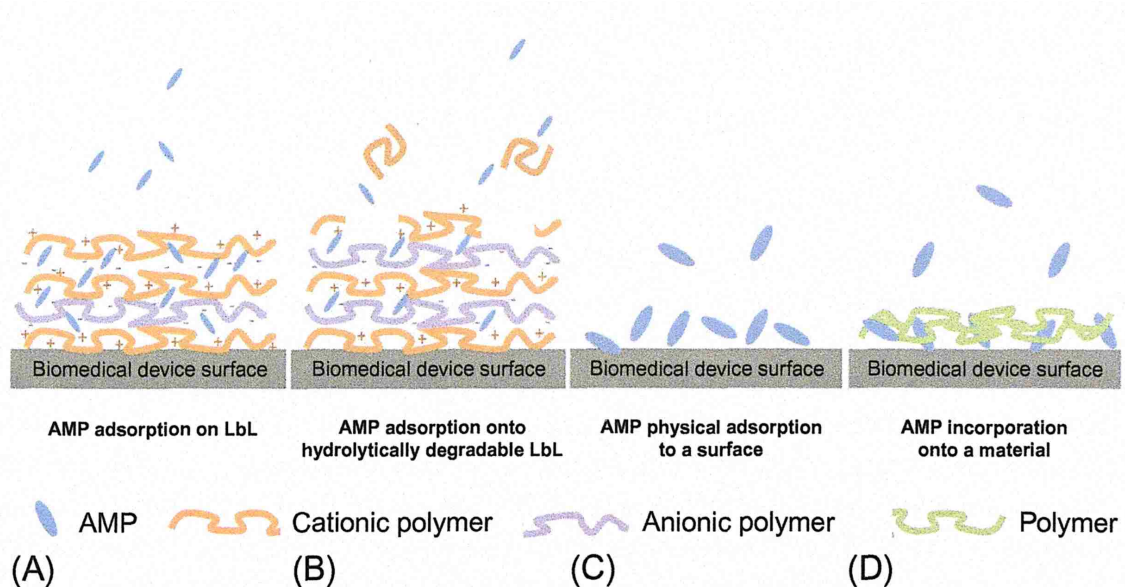


Abbildung 4: Verschiedene Möglichkeiten AMPs physikalisch auf ein Biomaterial zu adsorbieren. In (A) sind die AMPs in ein geladenes und in (B) geladenes und wasserabbaubares Polymer mittels Layer-by-Layer-Verfahren eingebunden. In (C) sind die AMPs physikalisch an ein Biomaterial adsorbiert und in (D) in ein ungeladenes Polymer eingegliedert. Quelle: Costa et al., 2018.

DIE BEDEUTUNG DER VIELSCHICHTIGKEIT

Die verschiedenen Adsorptionsarten unterscheiden sich in der Beschaffenheit des Polymers wie wasserabbaubares, geladenes oder ungeladenes Polymer und in der Anzahl der Schichten. Etienne et al. untersuchte diesen Aspekt und betont die Vorteile

einer vielschichtigen Anwendung auf die antimikrobielle Effektivität. Sie stellt fest, dass die Verwendung eines multischichtigen Films, in dem Fall 10 polyelektrolytische Schichten von Defensin, zu einer 99 %igen Wachstumsminde rung von *E. coli* führt. Außerdem können verschiedene AMP Arten kombiniert, die antimikrobielle Bandbreite erhöht und die Resistenzbildung gesenkt werden. Dagegen führt die Verwendung von einer oder wenigen Schichten zu einer Verwendung von geringeren Mengen an AMPs durch die Sättigung und damit zu einer geringeren Effektivität (Etienne et al., 2004).

STABILITÄT

Ein weiterer untersuchter Aspekt ist die Stabilität. Shukla et al. untersuchte die Stabilität und die Effektivität der immobilisierten hydrolytisch abbaubaren LbL-Polymeren. Nach der Immobilisierung von Ponericin G1 in einen polyelektrolytischen, wasserabbaubaren, multischichtigen Film beobachtete sie die Freisetzung von AMPs. Die Profile reichen von einem linearen bis zum explosionsartigen Abgang (Shukla et al., 2010). Die hydrolytisch abbaubaren LbL-Filme konnten eine bakterielle Besiedelung mit *Staphylococcus aureus* verhindern und können möglicherweise in der medizinischen Anwendungen für die Beschichtung von Implantaten und Bandagen Anwendung finden (Shukla et al., 2010).

Andere Adsorptionsstrategien zeigen in der Stabilität ein anderes Bild. Im Gegensatz zu den beschichteten, hydrolytisch abbaubaren LbL-Polymeren beobachtete Ivanov et al. bei einer direkten Adsorption auf eine Oberfläche (Silikon und Gold) keine Dissipation von antimikrobiellen Peptiden ohne physikalische Einwirkung z. B. durch Waschen. Offenbar bilden die Peptide eine starre, horizontale und einschichtige Struktur (Ivanov et al., 2012). Auch der Stabilitätstest von Etienne et al. mit den polyelektrolytischen Schichten zeigt eine Stabilität für mehr als 2 Wochen in Anwesenheit von Körperflüssigkeiten (Etienne et al., 2004).

Obwohl die physikalische Adsorption erfolgreich untersucht worden ist, gibt es Hindernisse, die eine Anwendung als Biomaterial auf medizinischen Geräten erschweren. Eine AMP-Freisetzung könnte die antimikrobielle Aktivität schwächen sowie Bedingungen für eine Resistenzentwicklung schaffen. Zudem ist die Langzeitstabilität von solchen beschichteten Geräten wenig bekannt (Costa et al., 2018).

2.6.2 CHEMISCHE IMMOBILISIERUNG

Eine andere Immobilisierungsstrategie ist die kovalente Bindung von AMPs. Im Vergleich zu den physikalisch adsorbierten System kann die kovalente Bindung die Toxizität verringern und die Langzeitstabilität erhöhen (Costa et al., 2011).

Bereits 1977 und 1995 wurden Peptide erfolgreich an eine Oberfläche immobilisiert (Haynie et al., 1995; LaPorte et al., 1977). Haynie et al. koppelte AMPs auf Harzpartikel ohne einen Aktivitätsverlust gegenüber grampositiven sowie gramnegativen Bakterien zu haben. Dabei wurde Magainin und andere synthetisch hergestellte amphipathische Peptide auf Polyamidharz immobilisiert. Durch die Verwendung eines sehr kurzen Abstandhalters von 2 und 6 Kohlenstoffatomen war das Eindringen in die bakterielle Zelle unwahrscheinlich, sodass die bloße Interaktion mit der bakteriellen Oberfläche für den letalen Ausgang ausreichend war (Haynie et al., 1995).

IMMOBILISIERUNG IM TIERMODELL

Später kam eine erfolgreiche Anwendung im Tiermodell hinzu. Dabei wurden bei Kaninchen AMP-beschichtete Implantate eingesetzt und mit Antibiotikabehandlung verglichen. Zwei Forscherteams zeigen mit Antibiotikaprophylaxe bzw. Therapie mit Gentamycin vergleichbare Ergebnisse. Die Behandlung von einer Hornhautentzündung mit einem immobilisierten Titanimplantat bzw. die Therapie einer multiresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Osteomyelitis mit einem immobilisierten Kalziumphosphat Zement brachte ähnliche Resultate wie eine Antibiotikabehandlung (Faber et al., 2005; Tan et al., 2014). Eine weitere Arbeit, bei der die AMPs auf Kontaktlinsen (Silikon-Hydrogel-Oberfläche) immobilisiert wurden, bestätigt ebenfalls die Effektivität in Tiermodell. Demnach konnte das Auftreten sowie die Schwere der Infektion mit grampositiven und gramnegativen Bakterien vermindert werden (Cole et al., 2010).

Jedoch um einen Überblick über die kovalente Immobilisierung zu bekommen, werden nachfolgend verschiedene Aspekte wie die verwendeten Beschichtungsmaterialien, Bindungsarten, Verwendung von Spacer, Orientierung der Peptide, Peptidkonzentration, Biokompatibilität und Stabilität immobilisierter Systeme

aufgeführt. Bei den Untersuchungen und Auswirkungen auf die antimikrobielle Aktivität und Effektivität kamen die Forscherteams teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen.

IMMOBILISIERUNGSMATERIALIEN

Derzeit kann eine Vielfalt an bereits erforschten Beschichtungsmaterialien beobachtet werden. Dazu gehören: Polymere, Harze, Metalle z. B. Gold oder Titan, Glas, Zement und Hydrogel- bzw. Silikon-Hydrogel-Oberflächen (Bagheri et al., 2009; J. Chen et al., 2018; R. Chen et al., 2012; Cole et al., 2010; Faber et al., 2005; Godoy-Gallardo et al., 2014; Haynie et al., 1995; Humblot et al., 2009; Ivanov et al., 2012). Bei dem Polymermaterial lassen sich diverse Arbeiten finden, die das Polymer in Form von langen „Polymebürsten“ anwenden (s. Abbildung 5). Die Autoren betonen, dass durch die Verwendung solcher Polymerbürsten-

beschichtungen (engl. *polymer brush coating*) eine höhere antimikrobielle Aktivität erzielt werden konnte (Appendini und Hotchkiss, 2001; Bagheri et al., 2009; Cho et al., 2007; Glinel et al., 2009; Godoy-Gallardo et al., 2015; Ivanov et al., 2012; Qi et al., 2011). Zusätzlich besitzen Polymerbürsten auch diverse Vorteile als Beschichtungsoberfläche. Sie zeigen stabile chemische und mechanische Eigenschaften, gute Bioverträglichkeit und gute Anti-Haft-Eigenschaften, welches die Ausbildung von Biofilmen hemmt (Gao et al., 2011; Xiang et al., 2014).

Auch der Einfluss von Harzoberfläche wurde von Hilpert et al. auf die antimikrobielle Aktivität der Peptide untersucht. Bei diesem Material kann davon ausgegangen werden, dass es die antimikrobielle Aktivität nicht beeinflusst. Eine größere Bedeutung wird jedoch anderen Faktoren wie der Bindungsstrategie zugeschrieben (Hilpert et al., 2009; Rapsch et al., 2014).

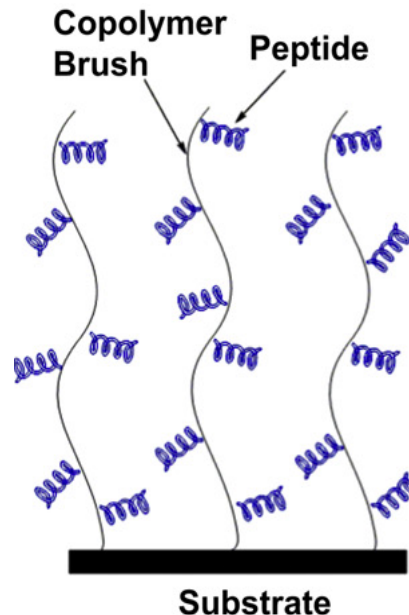


Abbildung 5: Skizze einer Peptid-immobilisierung auf „polymer brushes“. Quelle: Gao et al., 2011.

2.6.2.1 BINDUNGSSTRATEGIE

Ein weiterer Aspekt der kovalenten Immobilisierung ist die Bindungsart. Die antimikrobiellen Peptide können über diverse Bindungsgruppen verknüpft werden (Chen et al., 2018; Costa et al., 2015; Godoy-Gallardo et al., 2015; Li et al., 2011; Rostovtsev et al., 2002; Xiang et al., 2014). Der chemische Vorgang, bei dem das Peptid kovalent mit seiner reaktiven Gruppe an die Funktionsgruppe der Oberfläche gekoppelt wird, wird als Cross-Linking bezeichnet. Damit wird das Peptid über einen Linker an die Oberfläche gebunden. Dieses gibt dem Peptid eine Bewegungsfreiheit, die mittels eines eingebauten Abstandshalters engl. *Spacers* noch verstärkt werden kann (Costa et al., 2015; Ivanov et al., 2012). Neben der Verknüpfung der Peptide über einen Linker, wurde auch der Effekt einer sogenannten engl. *zero-length* Immobilisierung von Ivanov et al. untersucht. Schlussfolgernd erschwert die kovalente *zero-length*-Immobilisierung die Beweglichkeit der Peptide und senkte das Potenzial der bakteriziden Wirkung. In einem Vergleich lag die Sterberate von *E. coli*. bei einer direkten Immobilisierung bei ca. 34 % und bei der Verwendung eines Linkers bei ca. 82 %. Denn ausgehend von den meist verwendeten Membrantheorien in Kapitel 2.3 müssen die Peptide eine Konformitätsänderung durchführen, um ihre antibakterielle Aktivität ausüben zu können (Ivanov et al., 2012).

BINDUNGSARTEN

Die kovalente Bindung des Peptids an die Oberfläche kann über diverse Funktionsgruppen und andere Wege realisiert werden. Zum einen können Peptide sich über ihre Amide- oder Carboxylgruppen mittels Carbodiimid Kopplung zufällig anlagern (Humblot et al., 2009; Willcox et al., 2008). Wobei neben der zufälligen Anlagerung die Peptide auch direkt auf das gewünschte Material z. B. Harz oder Cellulose synthetisiert werden (z. B. mittels Festphasenpeptidsynthese) können. Dies ist der einfachste Weg Peptide kontrolliert mit der beabsichtigten Orientierung zu binden (Bagheri et al., 2009; Costa et al., 2018; Hilpert et al., 2009).

Eine andere Möglichkeit ist die Anbindung zuvor synthetisierter Peptide. Dabei wird das Peptid mit einer reaktiven Gruppe synthetisiert und dann durch eine chemische Reaktion auf eine funktionalisierte Oberfläche verankert. Bei solcher Strategie wird meist zusätzlich die Aminosäure Cystein eingebaut. Cystein enthält eine Thiolgruppe

und bietet die Möglichkeit eine Disulfidbrücke mit einer anderen Thiol-, Maleimide- oder Epoxidegruppe auszubilden (s. Abbildung 5) (Costa et al., 2011, 2015; Glinel et al., 2009; Godoy-Gallardo et al., 2015; Lim et al., 2013; Xiang et al., 2014).

Neben der thiolbasierten Bindung sind auch andere bekannt. Dazu gehören die Silanisierung, die Immobilisierung auf einer Allyl-Glycidyl-Etherbasis oder die Huisgen 1,3-dipolar Cycloaddition (Godoy-Gallardo et al., 2014, 2015; Rostovtsev et al., 2002; Xiang et al., 2014). In diesem Fall trägt das antimikrobielle Peptid eine Alkin- oder eine Azidgruppe und verbindet sich entsprechend mit einer Azid- bzw. Alkinmodifizierten Oberfläche (s. Abbildung 5) (Chen et al., 2018; Li et al., 2011; Wang et al., 2014).

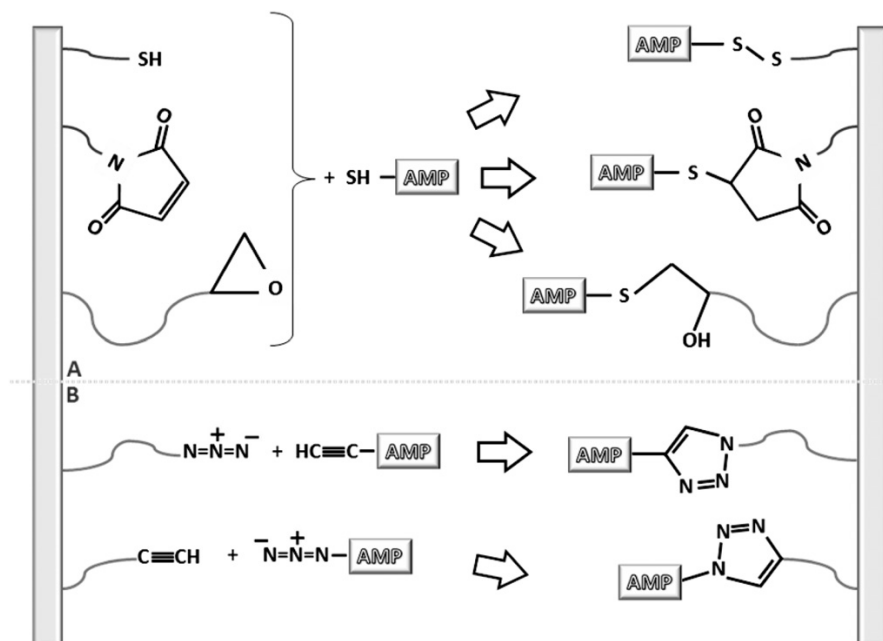


Abbildung 5: Beispiele für eine kovalente Immobilisierung von antimikrobiellen Peptiden. In (A) tragen die AMPs eine Thiolgruppe (Cystein meist als Thiol donor) für eine kovalente Bindung an Thiol-, Maleimide- oder Epoxidbasierte Oberfläche. In (B) ist die Immobilisierung mittels Huisgen Cycloaddition von Alkin-tragendem Peptid auf eine Azidbasierte Oberfläche und umgekehrt dargestellt. Quelle: Costa et al., 2011.

Über den direkten Einfluss der Bindungsstrategie auf die antimikrobielle Aktivität sind sich die beiden Forscherteams Hilpert et al. und Rapsch et al. einig. Dennoch ist es nicht der ausschlaggebendste Faktor und weitere Aspekte sollten in Betracht gezogen werden (Hilpert et al., 2009; Rapsch et al., 2014). Ein weiterer Faktor, der ebenso wie die Bindungsstrategie die antimikrobielle Aktivität beeinflusst, ist der Spacer (Hilpert et al., 2009).

2.6.2.2 SPACER

Ein Spacer verleiht dem Peptid mehr Flexibilität und kann das Eindringen in die bakterielle Zellwand ermöglichen (Ivanov et al., 2012).

In vielen Arbeiten wird Polyethylenglykol (PEG) als Spacer mit unterschiedlichsten Längen und teilweise zusätzlichen Modifikationen verwendet (Bagheri et al., 2009; Cho et al., 2007; Costa et al., 2015; Ivanov et al., 2012; Lim et al., 2013; Qi et al., 2011). Dabei kann beobachtet werden, dass die Länge des Spacers einen Einfluss auf die Effektivität der Peptide hat. Ein längerer Spacer zeigt stärkere antimikrobielle Wirksamkeit als ein kürzerer. Ebenfalls ist die antimikrobielle Effektivität mit einem Polymerspacer im Gegensatz zu einer direkten Kopplung höher (Bagheri et al., 2009; Costa et al., 2015). Verglichen jedoch mit den freien Peptiden zeigen PEG-konjugierte AMPs eine geringere Aktivität (Cho et al., 2007; Qi et al., 2011). Einen Einfluss auf die bakterielle Adhäsion konnte nicht nachgewiesen werden (Wei et al., 2003).

Es finden sich Angaben zum Molekulargewicht der PEG-Spacer, die zwischen 3000 Da und 5000 Da schwanken (Appendini und Hotchkiss, 2001; Bagheri et al., 2009; Wei et al., 2003). Der Polymerspacer besitzt diverse Vorteile. Er zeigt stabile chemische und mechanische Eigenschaften, gute Bioverträglichkeit und kann unspezifische Peptidbindungen vermeiden (Cho et al., 2007; Qi et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass der Abstand zwischen dem antimikrobiellen Peptid und der bakteriellen Oberfläche sowie die benötigte Flexibilität für die Effektivität entscheidend ist (Bagheri et al., 2009). Auch die Sekundärstruktur kann eine essentielle Rolle spielen. Die Immobilisierung von β -Faltblatt AMPs, führte zu einer kritisch verminderten antimikrobiellen Aktivität (Cho et al., 2007).

2.6.2.3 ORIENTIERUNG

Ein weiterer Aspekt der kovalenten Immobilisierung ist die Platzierung in einer bestimmten Richtung. Dabei gibt es Berichte über eine C-terminale, N-terminale und seitlich-terminale Immobilisierung (Chen et al., 2012; Gao et al., 2011; Godoy-Gallardo et al., 2015; Hilpert et al., 2009; Wang et al., 2014). Andere Studien berichten über eine zufällige oder ungeordnete Orientierung der AMPs, die ebenfalls antimikrobielle

Aktivität zeigen. Dennoch ist es schwierig die Orientierungstechniken von den verschiedenen Studien miteinander zu vergleichen, da diese unterschiedliche AMPs, AMP-Konzentrationen, Testbakterien sowie weitere Modifikationen wie den Einsatz von Spacer verwenden (Costa et al., 2018; Dutta et al., 2013; Qi et al., 2011; Tan et al., 2014).

Dennoch finden sich Arbeiten, in denen gezielt eine C- und N-terminale Orientierung unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurde (Bagheri et al., 2012; Chen et al., 2012; Costa et al., 2015; Hilpert et al., 2009). Zwei von den Studien arbeiten mit „head-to-tail“ amphipathischen Peptiden, während Hilpert et al. und Bagheri et al. strukturabhängige, amphipathische Peptide benutzen (Costa et al., 2015). Dabei kommen die Teams zu gegensätzlichen Ergebnissen, was auf die Verwendung verschiedener Peptide zurückgeführt werden könnte.

Bagheri et al. bringt seine Ergebnisse der C- und N-terminalen Orientierung mit dem Wirkungsprinzip der Peptide in Verbindung. Damit ist die antimikrobielle Aktivität eines porenbildenden Peptids Melittin stark von der Orientierung abhängig. Somit zeigt eine C-terminale Immobilisierung (mit dem hydrophoben Teil nach außen) viel höhere Aktivität als eine N-terminale. Seine Interpretation, dass das Wirkungsprinzip für die Wahl der Orientierung eine Rolle spielt, bestätigt auch ein anderes Beispiel. Das „Carpet“-formende Peptid KLAL zeigt gegenüber der C- und N-Terminierung keinen Aktivitätsunterschied, da seine hydrophoben und polaren Reste über das gesamte Peptid verteilt sind (s. Abbildung 6) (Bagheri et al., 2012).

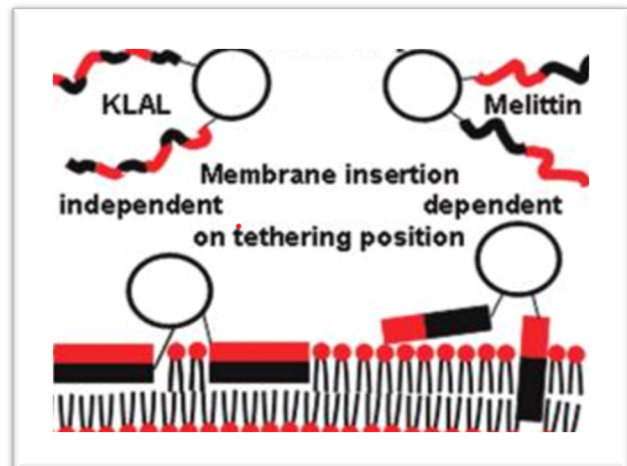


Abbildung 6: Dargestellt sind zwei kovalent immobilisierte Peptide mit unterschiedlicher Amphipathizitätsverteilung in der N- und C-terminalen Orientierung. Schwarze Peptidbereiche sind hydrophob, rote kationisch.
Quelle: Bagheri et al., 2012.

Hilpert et al. widmete sich der Verteilung der polaren Bereiche im Peptid. Er beschreibt, dass Peptide, deren kationischen Reste in der Nähe des Linkers lokalisiert sind, eine stärkere

Aktivität zeigen als Peptide, deren kationischen Gruppen in der Mitte oder auf beiden Enden des Peptides angeordnet sind. Obwohl die kationischen Reste für die elektrostatische Anziehung eine wichtige Rolle spielen, sollte gemäß Hilpert et al. eine gewisse Schwelle nicht überschritten werden. Denn ein zu hoher Anteil an polaren Resten könnte eine Reduktion der antimikrobiellen Aktivität nach sich ziehen (Hilpert et al., 2009).

Die beiden anderen Arbeiten, die sich ebenfalls mit der Auswirkung der Orientierung immobilisierter Peptide beschäftigen, beschreiben andere Resultate. Chen et al. benutzt das von Melittin und Protamin abgeleitete Peptid Melimine, welches im Gegensatz zu Melittin, keine klare Polaritätsverteilung besitzt. Die Windungen seiner α -helikalen Struktur sind auf einer Seite polar und auf der anderen Seite unpolar. Außerdem agiert das Peptid primär durch seine kationischen Bereiche (Rasul et al., 2010). Damit zeigt eine N-terminale Immobilisierung mit einem kationischen C-Terminus eine höhere antimikrobielle Aktivität im Gegensatz zu einer Immobilisierung, bei der die hydrophoben Reste nach außen ragen (Chen et al., 2012). Auch eine weitere Arbeit mit „head-to-tail“ amphipathischen Peptid beschreibt die gleiche Beobachtung. Die Immobilisierung von Dhvar5 mit dem N-Terminus (und einem kationischen C-Terminus) zeigt ebenfalls eine höhere antimikrobielle Aktivität (Costa et al., 2015).

In Anbetracht der unterschiedlichen Ergebnisse ist es schwierig eine allgemein gültige Aussage zu treffen. Vielmehr konnte verdeutlicht werden, dass es hier weiterer Forschung bedarf. Außerdem gibt es neben der Orientierung weitere Faktoren, die die antimikrobielle Aktivität beeinflussen können. Ein weiter zu betrachtendem Parameter ist die Konzentration der Peptide.

2.6.2.4 KONZENTRATION

Obwohl es sehr naheliegend ist, dass die Konzentration der antimikrobiellen Peptide die Effektivität beeinflussen kann, fehlt bei vielen Arbeiten eine exakte quantitative Analyse. Zudem haben die Forscher Schwierigkeiten eine präzise Methode zur Konzentrationsbestimmung der immobilisierten Peptide zu finden. Aus diesen Gründen behelfen sie sich mit einer ungefähren Schätzung (Costa et al., 2018; Gao et

al., 2011; Holmberg et al., 2013; Qi et al., 2011; Wang et al., 2014; Xiang et al., 2014). Auch die gemessene Konzentrationsangabe von Lim et al. beinhaltet eine 25%-ige Messunsicherheit (Lim et al., 2013). Die zwei meistbenutzten Methoden zur Konzentrationsabschätzung der immobilisierten Peptiden sind die Ablesung der Filmdicke und die Fluoreszenzmessung (Costa et al., 2018; Gao et al., 2011; Tan et al., 2014; Wang et al., 2014). Eine andere Möglichkeit ist die HPLC-Messung. Dabei werden ungebundene und gelöste AMPs analysiert und in Bezug zu den immobilisierten AMPs gesetzt (Qi et al., 2011; Xiang et al., 2014).

Obwohl die Bestimmung der Peptidkonzentration wichtig ist, scheint es nach der Meinung mancher Autoren, nicht der meist kritische Parameter für die antimikrobielle Aktivität zu sein (Bagheri et al., 2009; Chen et al., 2012). Die Arbeit von Bagheri et al. beschreibt die Auswirkungen von unterschiedlichen immobilisierten Peptiddichten und Spacerlängen. Dabei konnte eine höhere Dichte der gebundenen Peptide die Verwendung der kürzeren Spacer und damit die geschwächte antimikrobielle Aktivität nicht ausgleichen. Ein Grund dafür könnte die verringerte Erreichbarkeit der bakteriellen Membran durch den kürzeren Spacer sein (Bagheri et al., 2009; Costa et al., 2018).

Dennoch sollte das Thema der antimikrobiellen Peptidkonzentration nicht vernachlässigt werden. Die Untersuchung von Humblot et al. zeigt bei einer geringen Magainin I-Konzentration einen eher bakteriostatischen als bakteriziden Effekt, da ein multipler Angriff auf die bakterielle Zellmembran durch die geringe Konzentration nicht möglich war (Humblot et al., 2009). Auch andere Arbeiten beschreiben eine konzentrationsabhängige Wirkung (Dutta et al., 2013; Godoy-Gallardo et al., 2014; Li et al., 2011). Dabei beobachtete Dutta et al. bei der Immobilisierung von Melimin an Kontaktlinsen eine konzentrationsabhängige Aktivität bis zu einer Schwelle von $3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Eine Überschreitung dieses Grenzwertes brachte keine höhere Aktivität mit sich (Dutta et al., 2013).

Dieses Kapitel verdeutlicht, dass die Zugänglichkeit der reaktiven Gruppen sowie ein Grenzwert in Betracht gezogen werden müssen (Bagheri et al., 2009; Costa et al., 2018; Dutta et al., 2013).

2.6.2.5 TOXIZITÄT

Die ersten Berichte über die Testung der zytotoxischen Wirkung von immobilisierten Peptiden basieren auf hämolysierenden Testverfahren (Bagheri et al., 2009; Costa et al., 2018; Hilpert et al., 2009; Lim et al., 2013). Mit diesem Verfahren untersuchten Hilpert et al. und Bagheri et al. die biokompatible Wirkung der immobilisierten Peptide. Im Vergleich zu den gelösten Peptiden konnte bei den immobilisierten Peptiden je nach Art keine bzw. geringere hämolytische Wirkung festgestellt werden (Hilpert et al., 2009). Auch Bagheri et al. konnte bei dem Vergleich mit bloßen Harzkugeln keinen Unterschied in der zytotoxischen Wirkung bei der minimalen Inhibierungskonzentration feststellen (Bagheri et al., 2009).

Neben der Hämolyse-basierenden Analyse wurde später das Portfolio ausgeweitet. Nun wurden ebenso Faktoren wie Morphologie, Adhäsion, Proliferation, Thrombozyten- sowie Komplementaktivierung in Betracht gezogen (Costa et al., 2018; Dutta et al., 2013; Gao et al., 2011; Godoy-Gallardo et al., 2015; Holmberg et al., 2013; Lim et al., 2013; Wang et al., 2014; Xiang et al., 2014). Damit kamen andere Verfahren hinzu, um die zytotoxischen Eigenschaften zu beurteilen. Diese sind der Laktatdehydrogenasetest, die Bestimmung von LIVE/DEAD Test oder die Beurteilung der Zellvitalität mittels dem 3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) (Gao et al., 2011; Godoy-Gallardo et al., 2015; Lim et al., 2013; Xiang et al., 2014). Bei dem MTT-Test findet eine kolorimetrische Reaktion statt, bei der das gelbgefärbte Tetrazoliumsalz zu blauvioletten Formazanen umgesetzt wird. Somit kann der Anteil an lebenden Zellen photometrisch erfasst werden (Gareis, 2006).

Auch unter Verwendung verschiedener Zelllinien wurde die Biokompatibilität untersucht. Zu den verwendeten Zelltypen zählen Fibroblasten, glatte Muskelzellen, osteoblastenähnliche Zellen, mesenchyme Stammzellen und monozytäre Zellen (Dutta et al., 2013; Gao et al., 2011; Godoy-Gallardo et al., 2015; Holmberg et al., 2013; Lim et al., 2013; Rapsch et al., 2014; Wang et al., 2014; Xiang et al., 2014).

Die Ergebnisse der verschiedenen Biokompatibilitätstests sind vielversprechend. Sie zeigen keine bis sehr geringe Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen. Die Versuche mit den Fibroblasten und der AMP immobilisierten Titanoberfläche bzw.

Kontaktlinsen sowie AMP-konjugierten Polymeren mit Osteoblasten und Muskelzellen zeigen keine Zytotoxizität (Dutta et al., 2013; Gao et al., 2011; Godoy-Gallardo et al., 2014; Holmberg et al., 2013; Lim et al., 2013; Xiang et al., 2014). Ebenso bestätigt der Vergleich von immobilisierten und gelösten AMPs, dass sich die zytotoxische Aktivität durch die Kopplung der Peptide deutlich verringert. Während eine geringe Menge ungebundener AMPs bereits nach 2 h humane Zellen zu 50 % zerstören, konnte bei vierfach höheren, immobilisierten antimikrobiellen Peptidkonzentration auch nach 3 Tagen kein zytotoxischer Effekt festgestellt werden (Rapsch et al., 2014). Damit eröffnet die Biokompatibilität mit den verschiedenen Zelllinien viele Anwendungsbereiche für die kovalente Immobilisierung (Costa et al., 2018).

Jedoch gibt es Berichte, die eine geringe Zytotoxizität von immobilisierten Systemen beschreiben. Dazu gehören die Versuche mit den mesenchymen Stammzellen sowie Fibroblasten (Godoy-Gallardo et al., 2014; Wang et al., 2014).

2.6.2.6 STABILITÄT

Ein weiteres Thema der kovalenten Immobilisierung widmet sich der Stabilität. Es finden sich Forschungsberichte, in denen diverse Methoden angewandt werden, um die Beständigkeit der gekoppelten Peptide zu testen. Zu derartigen Verfahren gehören unter anderem starke Waschungen, Ultraschallbeschallungen, Hitzeanwendung, pH-Wert Änderungen, Auswaschungstests und die Ermittlung der Langzeitaktivität (Appendini und Hotchkiss, 2001; Costa et al., 2018; Dutta et al., 2013; Godoy-Gallardo et al., 2015; Holmberg et al., 2013; Humblot et al., 2009; Ivanov et al., 2012; Willcox et al., 2008).

Bei der Prüfung der Hitzewiderstandsfähigkeit konnte keine Verminderung der antibakteriellen Effektivität festgestellt werden. Dabei wurden immobilisierte AMPs über einen Zyklus von 15 min bei 121° C autoklaviert. (Appendini und Hotchkiss, 2001; Dutta et al., 2013; Willcox et al., 2008). Neben dem Autoklavivorgang, unterzogen Appendini und Hotchkiss die Peptide auch einer Ofentrocknung für eine Stunde bei 200° C. Dabei behielten auf Harzpartikel immobilisierte Peptide mit einem PEG-Spacer ihre antimikrobielle Aktivität und es konnten keine Auswirkungen festgestellt werden. Darüber hinaus experimentierte die Arbeitsgruppe mit unterschiedlichen pH-Werten.

Dabei konnte die antimikrobielle Aktivität in der pH-Bandbreite von 3,5 bis 7,0 im Citratpuffer beibehalten werden. Die stärkste Aktivität wurde bei einem pH-Wert von 3,5 beobachtet. Letzteres könnte durch die höhere positive Gesamtladung ermöglicht worden sein (Appendini und Hotchkiss, 2001; Costa et al., 2018).

Auch die Robustheit gegenüber einer Ultraschallbehandlung wurde bereits untersucht. Die Stabilität demgegenüber lässt darauf schließen, dass die immobilisierten AMPs in vivo durch den Lauf der Körperflüssigkeiten sowie einer chirurgischen Maßnahme nicht beeinflusst werden würden (Holmberg et al., 2013). Ebenso wurde die Beständigkeit von immobilisierten Peptiden gegenüber einem enzymatischen Abbau begutachtet. Im Vergleich zu den ungebundenen AMPs zeigten an Gold immobilisierte Peptide eine viel höhere Widerstandsfähigkeit in Anwesenheit von Trypsin (Wadhvani et al., 2017). Auch der Vergleich mit den physikalischen adsorbierten Peptiden zeigt, dass kovalent immobilisierten Peptide in Gegenwart von Speichel nach 11 Tagen eine Freisetzungsrate von 2 % aufweisen während die Kontrollgruppe der physikalisch-adsorbierten Peptide eine 9 %-ige Ablösung zeigt (X. Chen et al., 2014).

Schließlich wurde auch eine Langzeiteffektivitätstestung durchgeführt. Humblot et al. verwendete Magainin und testete die antimikrobielle Aktivität über einen Zeitraum von sechs Monaten. Zwar konnte die maximale Aktivität auch nach einem Monat erreicht werden, sank jedoch nach sechs Monaten ab (Humblot et al., 2009). Die oben genannten Forschungsergebnisse betonen eine deutlich lange Stabilität und eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber den äußeren Einflüssen (Costa et al., 2018).

3 MATERIAL UND METHODEN

In diesem Kapitel werden die verwendeten Geräte, Chemikalien, Materialien sowie Peptide in den jeweiligen Tabellen vorgestellt. Des Weiteren werden die angewandten Analysemethoden beschrieben.

3.1 GERÄTE

Die Tabelle 1 führt alle für diese Abschlussarbeit benötigten Geräte mit dem zugehörigen Herstellerangaben auf.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
ÄKTA start Säule: HiTrap™ 5 ml Sephadex G25	Cytiva GE Healthcare
Analysenwaage 770	Kern
Autoklav VX-150	Systemec
Gefrierschrank -20° C	Miele
Heizschrank	Binder
HPLC Anlage: Primaide 1110 Pump; 1210 Auto Sampler; Primaide 1310 Column oven; Primaide 1430 Diode Array Detektor	Hitachi
HPLC Vorsäule LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm	Merk
HPLC Säule Vydac® 218TP C18, 250 x 4 mm, 5 µm	Avantor
INFINITE PLEX (Mikroplatten reader)	TECAN
Kühlschrank -8° C	Blomberg
Kolbenhubpipette (1-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	BRAND; eppendorf
Magnetrührer	Gerhardt
Magnetrührer und Heizer	Heidolph; Jahn & Kunkel

Nano Quant infinite M200 PRO	TECAN
Magnetrührer	Gerhard
Magnetrührer und Heizer	Heidolph
Multipipetten 30-300 µl	Eppendorf
pH-Meter	Sartorius
Photometer, Genesys 20	Thermo scientific
Pileusball	Roth
Rocker	Hoefer
SDS-PAGE-Apparatur	BioRad
Scanner	hp
Schüttelinkubator	GFL und Eppendorf
Sicherheitswerkbank HERA safe	Heraus Instruments
Thermomixer compact	Eppendorf
UV-Lampe	Analytik Jena
Vakuumpumpe	KNF Neuberger
Vortexer MS2 Minishaker von IKA®	Janke & Kunkel GmbH
Wasserbad	Biometra
Waage KERN 770	KERN & Sohn GmbH
Zentrifuge Minispin	Sartorius
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge 3K10	SIGMA Laborzentrifugen

3.2 CHEMIKALIEN

In der nachfolgende Tabelle 2 werden alle benötigten Chemikalien mit den verwendeten Chargen und Herstellerangaben angegeben.

Tabelle 2: Auflistung der Chemikalien mit den Angaben zum Hersteller und Charge

Chemikalien	Charge	Hersteller
Acetonitril	1283341	Carl Roth
Agar-Agar Kobe I	226243001; 040292008	Carl Roth

Material und Methoden

Agarose NEEO Ultra Qualität	336248573; 489291195	Carl Roth
Borsäure	259283379	Carl Roth
Criterion Precast Gel; 16,5% Tris-Tricin/Pept.	64417551	Bio-Rad
Coomassie Brilliant Blue G-250	VG29755544	Thermo Scientific
Di-Kaliumhydrogenphosphat	456251238; 290298676	Carl Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat	43788120; 125225704	Carl Roth
D (+) – Glucose Monohydrat	438276524	Carl Roth
1,4-Dithiothreit	25029774	Carl Roth
Essigsäure 100%	087255103	Carl Roth
Ethanol		Carl Roth
Glutardialdehyd 25%	S8052503111	Sigma-Aldrich
Glycerin Rotipuran® ≥ 99,5%	336248165	Carl Roth
Hefeextrakt	191169273; 491176309	Carl Roth
HEPES	496250144	Carl Roth
L-Cystein, hydrochlorid	361308836	Carl Roth
Methanol	24750	Carl Roth
Natriumchlorid	256245766; 400162007	Carl Roth
Orange G	440296874	Carl Roth
Pepton aus Casein	027250999	Carl Roth
Pufferlösung pH 4; 7	18008013	Carl Roth
SDS ≥ 99%, Blotting Grade	480301519	Carl Roth
Spectra Multicolor low Range Protein Ladder	01065743	Thermo scientific
SulfoLink™ Company	VH312381	Thermo scientific
Trifluoressigsäure	405235011	Carl Roth
Tricin Pufferant® ≥ 99%	041299161; 151308159	Carl Roth
TRIS ≥ 99%, krist.	505236607; 409289356	Carl Roth
TRIS-hydrochlorid	030285834	Carl Roth
Trypton/Pepton aus Casein	020289292	Carl Roth
Tween 20	302189317	Carl Roth
Wasser, demineralisiert	-	Hausleitung
Wasser ROTISOLV® HPLC Grade	0010003807	Carl Roth

3.3 MATERIALIEN

Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die verwendeten Materialien. Sie umfasst alle notwendigen Komponenten für eine analytische Arbeit.

Tabelle 3: Auflistung der Materialien mit Herstellerangaben

Materialien	Hersteller
Bechergläser (5ml, 10 ml, 50 ml, 100 ml)	Simax; Vitlab
Cellulose-Nitrat filter (0,45 µm)	Sartorius
Drigalskispatel	VWR
Falcons, steril (50 ml)	Carl Roth
Glaspipetten, steril (1 ml, 5 ml, 10, 25 ml)	Nerbe plus
HPLC Glas-Reaktionsgefäße (300 µl)	Thermo scientific
Messzylinder (10 ml, 20 ml, 50 ml, 100, ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml)	Isolab; Duran; Vitlab
Mikrotiterplatten, low binding, steril	
Nylon-Membran Filter 0,45 µm	GVS
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Nerbe plus
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Nerbe plus
Rotilabor© F-Profil	Carl Roth
Rührfisch, magnetisch	-
Schikanenkolben (500 ml, 1000 ml)	Duran
Schottflaschen (50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml)	Schott
Spritzen (1 ml, 5ml, 10 ml, 20 ml)	Henke SASS Wolf; Braun
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Sartorius; Carl Roth
Sterile Kryoröhrchen (2 ml)	-
Wägeschälchen	Labsolute

3.4 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE

In dieser Arbeit wurden insgesamt 17 Peptide getestet (s. Tabelle 4). Die Peptide NK-2 und ALK-NH₂ wurden von zwei verschiedenen Herstellern bezogen. Die Peptide: NK-2, ALK-NH₂, I2W, Melittin und die vier Kopplungspeptide N28-ALK, ALK-28C, N33-ALK und ALK-33C stammen von der Firma ProteoGenix. Die restlichen AMPs: NK-2, ALK-NH₂, ALK-OH, M11L, D21K, C7A-D21K, C7A und das inaktive Kontrollpeptid NK-11 wurden im Forschungszentrum Borstel synthetisiert. Die Bezeichnung der Peptide wie z. B. C7A bedeutet, dass im NK-2 Peptid die 7-te AS Cystein durch Alanin ausgetauscht wurde. Damit wurde die Oxidationsbereitschaft des Peptids reduziert. Die vorderen Buchstaben „ALK“ definieren den Austausch von 3 AS im NK-2 Peptid: „A“ von Cystein durch Alanin an der Stelle 7, „L“ von Methionin durch Leucin an Stelle 11 und „K“ von Asparaginsäure durch Lysin an der Stelle 21. Das Peptid ALK-OH bedeutet, dass das Peptid am C-Terminus nicht amidiert ist und somit seine OH-Gruppe beibehalten hat. Alle restlichen Peptide in dieser Arbeit haben einen amidierten C-Terminus.

Die vier Kopplungspeptide haben alle eine Cystein-AS am Ende der Sequenz, während N33-ALK und ALK-33C einen zusätzlichen Spacer von fünf AS zwischen der Leitsequenz ALK und dem Cystein besitzen. Die fünf Aminosäuren sind eine Abfolge von Glycin und Serinresten. Die Buchstaben „N“ und „C“ in der Namensgebung der Peptide weisen auf den Terminus hin, an welchem die Kopplungsgruppe mit Spacer vorhanden ist. Somit besitzt das N28-ALK eine Cystein-AS am N-Terminus und das ALK-28C am C-Terminus.

Die Peptide lagen in lyophilisierter Form vor. Mittels einer Waage (KERN & Sohn GmbH) wurden die Stocklösungen von 1 mg·ml⁻¹ hergestellt. Abhängig von der Verwendung wurden für die Herstellung der Stocklösungen verschiedene Lösungsmittel verwendet. Für die Analyse der antimikrobiellen Aktivität und der Immobilisierung auf Polystyrol wurden die Peptide in 0,01 % TFA in VE-Wasser und für die Harzimmobilisierung im Kopplungspuffer (5 mM EDTA-Na und 50 mM Tris in VE-Wasser) gelöst. Daraus wurden die Verdünnungen generiert. Während der Lagerung wurden die Stocklösungen und Verdünnungen bei -20° C aufbewahrt.

Tabelle 4: Auflistung der getesteten Peptide mit dem Einbuchstabencode und der Chargennummer. Die Peptide NK-2 und ALK-NH₂ wurden von zwei unterschiedlichen Herstellern bezogen. Forschungszentrum Borstel wurde mit „FB“ abgekürzt. Alle Peptide außer ALK-OH haben einen amidierten C-Terminus. Der rote Buchstabe signalisiert den Austausch einer AS verglichen mit der Leitsequenz NK-2.

Peptid	Sequenz	Charge und Hersteller
NK-2	KILR GVCK KIMR TFLR RISK DILT GKK	B147 (FB) 767279 (ProteoGenix)
NK-11	KI S K R ILT GKK	B071 (FB) B120 (FB)
I2W	K WLR GVCK KIMR TFLR RISK DILT GKK	767282 (ProteoGenix)
C7A	KILR GV A K KIMR TFLR RISK DILT GKK	II (FB) B125 (FB)
M11L	KILR GVCK K ILR TFLR RISK DILT GKK	B096 (FB)
D21L	KILR GVCK KIMR TFLR RISK L ILT GKK	B0835 (FB)
D21K	KILR GVCK KIMR TFLR RISK K ILT GKK	B097 (FB)
C7A-D21K	KILR GV A K KIMR TFLR RISK K ILT GKK	B130 (FB)
ALK-NH ₂	KILR GV A K K ILR TFLR RISK K ILT GKK	731/1180_04/2015 (FB) 767280 (ProteoGenix)
ALK-OH	KILR GV A K K ILR TFLR RISK K ILT GKK- OH	730/1181_04/2015 (FB)
N28-ALK	C KILR GV A K K ILR TFLR RISK K ILT GKK	830537 (ProteoGenix)
ALK-28C	KILR GV A K K ILR TFLR RISK K ILT GKK C	830540 (ProteoGenix)
N33-ALK	C GSGSG KILR GV A K K ILR TFLR RISK K ILT GKK	830539 (ProteoGenix)
ALK-33C	KILR GV A K K ILR TFLR RISK K ILT GKK GSGSG C	830541 (ProteoGenix)
Melittin	GIGA VLKV LTTG LPAL ISWI KRKR QQ	767281 (ProteoGenix)

Die Zusammensetzung der Aminosäuresequenz bestimmt die Hydrophobizität (H) des Peptids. Dabei besitzt jede Aminosäure einen spezifischen Wert. Je hydrophober eine Aminosäure ist, desto negativer ist der Hydrophobizitätswert. Die Bestimmung der Hydrophobizität kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. In dieser Arbeit wird mit Hilfe der Software „SeqApp“ und dem Onlinetool ProtParam der Firma ExPASy (www.expasy.org) die Hydrophobizität bzw. die durchschnittliche Hydrophobizität

(grand average of hydrophobicity „GRAVY“) nach dem *Eisenberg consensus scale* veranschaulicht. Diese beruht auf der Betrachtung der zugänglichen hydrophoben Oberflächenbereiche (Eisenberg, 1984). Die SeqApp Software wurde während eines Masterprojekts von Kuzmicki und Rudnik (2020) entwickelt und für die Erstellung der Tabelle 18 verwendet. Die durchschnittliche Hydrophobizität (GRAVY) ist ein Wert, basierend auf der Summe der hydrophoben Einzelwerte aller Aminosäuren dividiert durch die Sequenzlänge. Dagegen beschreibt das hydrophobe Moment (μ_H) die Quantität der Amphipathizität bzw. die mittlere Vektorsumme aller Seitenketten-Hydrophobizitäten in einer α -Helix (Eisenberg et al., 1982).

3.5 TESTORGANISMUS

Die antimikrobielle Aktivität der Peptide wurde mit dem Mikroorganismus *Escherichia coli* (*E. coli*) WBB01 getestet. Für die Tests wurde zuerst eine Working cell bank von Jan Demmer (2017) und später von Marina Lesniewski (2020) verwendet. Die Herstellung der WCB wurde nach einer Standardarbeitsanweisung (SOP) „Anlegen einer Zellbank als Kryokultur“ durchgeführt. Dabei wurde aus einer über Nacht kultivierten Schikanenkolbenkultur von *E. coli* WBB01 20 ml entnommen und mit 20 ml des 50 %igen Glycerin versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in Kryoröhrchen abgefüllt. Gleichzeitig wurde die optische Dichte (OD) bei 620 nm detektiert. Die Arbeitszellbank wurde bei -80° C bis zur Verwendung gelagert.

3.6 ANALYTISCHE VERFAHREN

Für die analytische Darstellung wurden verschiedene Methoden angewandt. Zur Bestimmung der Peptidaktivität wurden der Agardiffusions- und Mikrodilutionstest durchgeführt. Des Weiteren konnte mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie die Umpufferung und mit der Tris-Tricin-SDS-PAGE sowie der RP-HPLC die Detektion realisiert werden.

3.6.1 AGARDIFFUSIONSTEST

Bereits 1991 wurde der ADT zur Bestimmung der antimikrobiellen Peptidaktivität von Lehrer beschrieben (Lehrer et al., 1991). In Anlehnung an diese Methode, wurde der Test angepasst und nach der SOP „Agardiffusionstests“ durchgeführt. Bei diesem Test wird das Agar in zwei Schichten unterschieden. Die untere Agarschicht enthält eine viel geringere Menge an Soja-Casein-Pepton-Medium engl. *tryptic soy broth* (TSB) als die obere Schicht und unterstützt damit die antimikrobielle Aktivität durch die niedrigere Ionenstärke. Die obere „konventionelle“ Agarschicht unterstützt dagegen das Wachstum der Bakterien (Lehrer et al., 1991).

Der Test begann mit einer Übernachtkultivierung von *E. coli* WBB01 im Schüttelkolben bei 37° C und 170 rpm im (0,03 w/v) TSB-Medium. Am nächsten Tag befanden sich

die Bakterien in ihrer exponentiellen Vermehrungsphase und wurden bei 4° C und 5000 x g für 10 min (SIGMA Laborzentrifugen) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde im kaltem 10 mM, pH 7,4 Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer (NaPB) gewaschen und in 5 ml NaPB wieder resuspendiert. Anschließend wurde die OD₆₂₀ am Photometer (Thermo scientific) gemessen. Das sterile Medium hat eine OD₆₂₀ von 0,07 und enthält 0 koloniebildende Einheiten engl. *Colony Forming Unit* (CFU)·ml⁻¹. Mit Hilfe der linearen Interpolation kann aus der optischen Dichte die CFU·ml⁻¹ abgeschätzt werden (s. Formel 1).

$$4 \cdot 10^8 \cdot (OD_{620} - OD_{LW}) - 3 \cdot 10^7 = x \frac{CFU}{ml} \quad \text{Formel 1}$$

Mit Hilfe der Formel 1 wurde eine Zellsuspension mit 5·10⁶ CFU·ml⁻¹ angefertigt. Davon wurde 1 % in das untere Agarmedium (0,03 % TSB-Gemisch, 1 % Agarose, 0,02 % Tween 20) gegeben und in 6 Petrischalen gegossen. Zuvor wurde das obere und untere Agarmedium nach dem Autoklavieren in einem Wasserbad (Firma Biometra) bei 42° C bis zur Anwendung inkubiert. Nach dem Auskühlen der gegossenen unteren Agarschicht wurden Löcher ausgestanzt und mit 5 µl Probe befüllt. Als Negativkontrolle wurde 0,01 % TFA verwendet. Alle Tests wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

Nach der Probenaufgabe wurden die Petrischalen bei 37° C für 3 h in den Inkubator (Firma Binder) gestellt. Nach 3 h wurde die untere Agarschicht mit ca. 2 mm oberem Agarmedium (6 % TSB-Gemisch, 1 % Agarose) überzogen. Nach einer Übernachtinkubation von ca. 18 h bei 37° C wurden die Platten eingescannt und die Hemmhoflächen mit Hilfe der Software ImageJ berechnet (s. Abbildung 7).

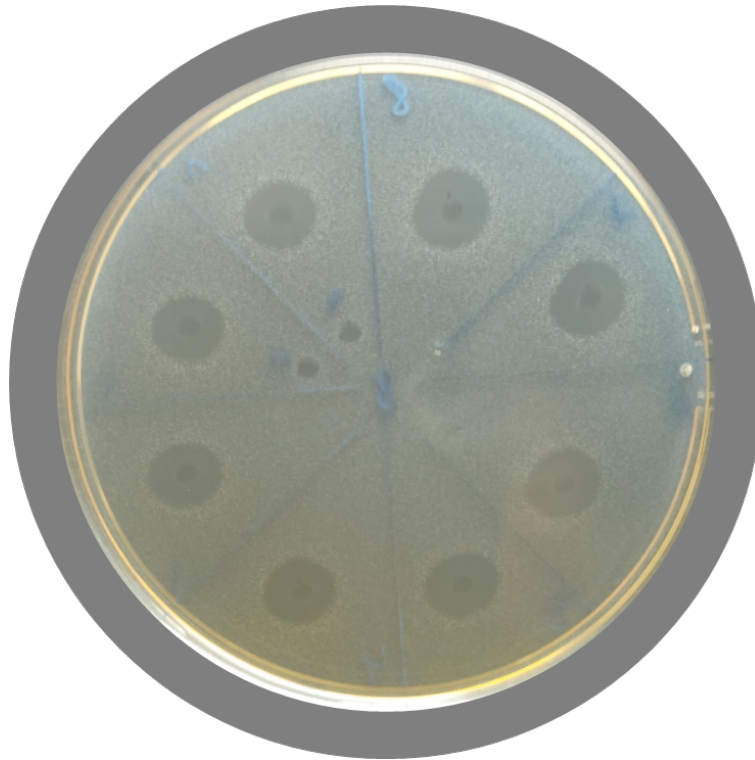


Abbildung 7: Agardiffusionstest nach einer Übernachtinkubation. Um die mittlere Stanzfläche sind Hemmhöfe mit Bakterienrasen von *E. coli* WBB01 entstanden. In der Mitte der Platte ist die hemmhoffreie Negativkontrolle erkennbar.

3.6.2 MIKRODILUTIONSTEST

Parallel zum ADT wurde die antimikrobielle Aktivität mit einem zweiten Verfahren, dem Mikrodilutionstest, überprüft. Dazu wurde am Tag 1 ein Schikanenkolben mit Luria-Bertani (LB) Medium (s. Tabelle 5) mit *E. coli* WBB01 angeimpft. Es folgte eine Inkubation bei 37° C und 170 rpm. Am Tag 2 befand sich die Kultur in einer exponentiellen Wachstumsphase (Andrä et al., 2004). Die entstandene optische Dichte wurde bei 620 nm bestimmt und mit der Formel 1 in die CFU·ml⁻¹ umgerechnet. Entsprechend der Zielzellzahl von 5·10⁶ CFU·ml⁻¹ wurde die Übernachtskultur mit LB-Medium verdünnt.

Inzwischen wurde eine Verdünnungsreihe der antimikrobiellen Peptiden mit der Konzentration von 64 µg·ml⁻¹ bis 0,1 µg·ml⁻¹ in einer Mikrotiterplatte hergestellt. Dazu wurden 90 µl des HEPES-Puffer jeweils mit und ohne 150 mM NaCl vorgelegt (s. Tabelle 6). Dann wurden in die erste Spalte 90 µl der 128 µg·ml⁻¹ Peptidlösung

hinzugefügt. Für die 10-fache Verdünnungsreihe wurden aus der ersten Spalte 90 μl in die 2-te Spalte, dann aus der 2-ten Spalte in die 3-te bis zur 10-ten Spalte überführt. Nach dem die Verdünnungsreihe erstellt worden war, wurde in jede Vertiefung 10 μl einer $5 \cdot 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ Bakteriensuspension hinzugefügt. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung analysiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Mikrotiterplatte bei 620 nm (Tecan) gemessen. Für die nachfolgende Inkubation wurde die Platte mit Deckel und Parafilm verschlossen und bei 37° C im Brutschrank (Binder) über Nacht inkubiert (s. Abbildung 8). Am nächsten Tag wurde die Absorption erneut gemessen und die Differenz berechnet. Die minimale Inhibierungskonzentration (MIC) ist definiert als die niedrigste Peptidkonzentration bei der kein Bakterium Wachstum mehr beobachtet werden kann (Andrä et al., 2004).

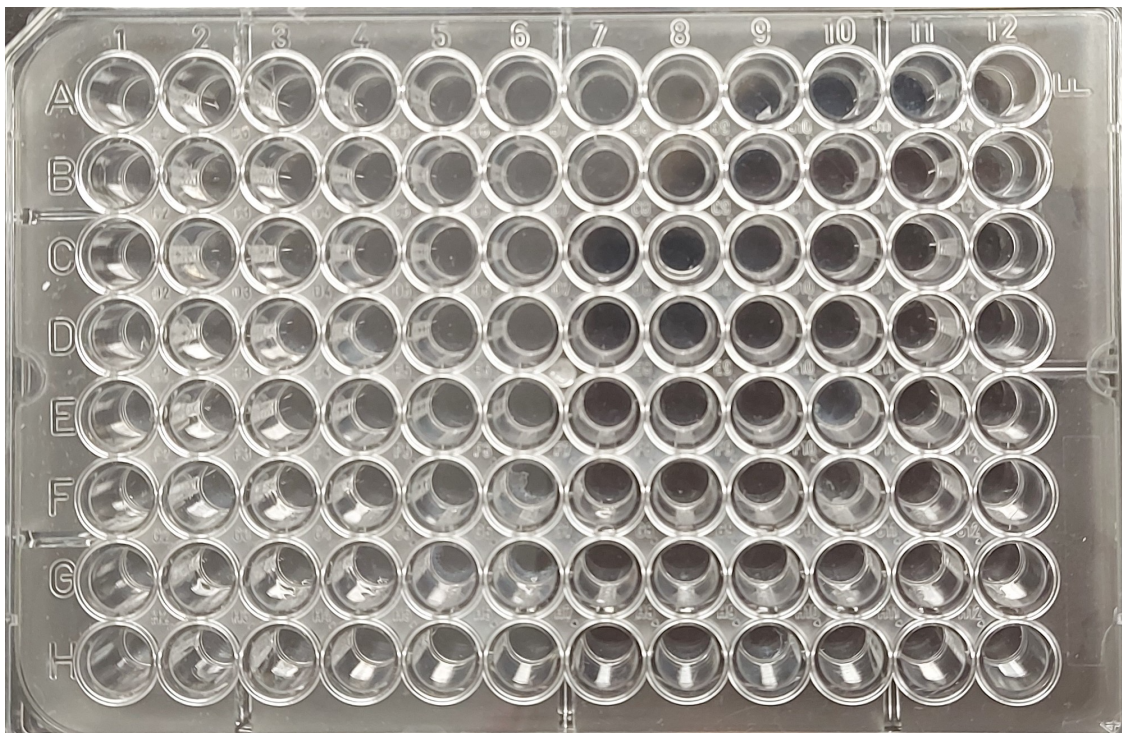


Abbildung 8: Ein Mikrodilutionstest nach einer Übernachtinkubation mit antimikrobiellen Peptiden bei 37° C mit *E. coli* WBB01 in einer Mikrotiterplatte. Die Absorptionen wurden photometrisch bei 620 nm gemessen.

HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

Tabelle 5: LB-Medium: Herstellung von 1 l

Komponente	Anteil	Menge für 1 l Lösung
Trypton	1 %	10 g
Hefeextrakt	0,5 %	5 g
NaCl	1 %	10 g

Tabelle 6: HEPES Puffer mit und ohne NaCl: Herstellung von 1 l, pH 7,0

Komponente	Anteil	Menge für 1 l Lösung
HEPES	20 mM	4,7662 g
mit und ohne NaCl	150 mM	8,7660 g

3.6.3 TRICIN-SDS-PAGE

Bereits 1970 wurde die SDS-PAGE von Laemmli für die Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht beschrieben. Dieses System ist jedoch für kleine Peptide mit einem Molekulargewicht unter 10 kDa unzureichend. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die SDS-PAGE von Schägger und Jagow weiterentwickelt. Die Veränderung des Gels brachte eine viel feinere Auflösung durch die schnelle Wanderungsgeschwindigkeit von Tricin (Schägger und von Jagow, 1987).

In dieser Arbeit wurden Fertiggele (Tris-Tricin precast gel, Bio Rad) verwendet, das besonders für das Molekulargewicht <10 kDa geeignet ist. Die Ansätze der Lösungen sind in den Tabellen 9 bis 12 beschrieben.

Das aufzugebende Probenvolumen für das Tricin-SDS-PAGE-Gel beträgt 40 µl. Das Volumen wird in 20 µl Probe und 20 µl Puffer aufgeteilt. Reduzierte Proben enthielten 0,5 M 1,4-Dithiothreitol (DTT) (s. Tabelle 7 und Tabelle 8). Das DTT dient zum Aufbrechen der Disulfidbrücken und verhindert somit die Dimerisierung der Peptide. Nach dem Vermischen der Probe mit dem Probenpuffer, wurde der Ansatz für 10 min bei 95° C und 300 rpm im Thermomixer (Eppendorf) geschüttelt. Währenddessen

wurde die SDS-PAGE-Apparatur nach Bio Rad Anleitung zusammgebaut und mit Laufpuffer (1x) gefüllt (s. Tabelle 9). Die Geltaschen wurden mit 40 µl denaturierten Proben gefüllt. An den Seiten des Gels wurden 5 µl Standardmarker (Thermo scientific) pipettiert. Von dem Peptid ALK-28C wurde eine Verdünnungsreihe (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 2; 3) µg erstellt, um die Nachweisgrenze zu ermitteln. Die restlichen Peptide (NK-2, ALK, N28-ALK, N33-ALK, ALK-28C) wurden jeweils in der Menge von 1 µg und 2 µg aufgetragen.

Der Lauf startete bei 80 V und 90 mA und endete nach ca. 4 h sobald das kleinste Molekül Orange G bis zum Ende des Gels durchgewandert war. Danach wurde das Gel mit der Fixierlösung für 30 Minuten fixiert (s. Tabelle 10). Anschließend wurde das Gel dreimal für 5 min mit vollentsalztem-Wasser (VE-Wasser) gewaschen und mit Coomassie-Blue gefärbt (s. Tabelle 11). Die Färbung als auch die nachfolgende Entfärbung wurden über Nacht durchgeführt (s. Tabelle 12).

HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

Tabelle 7: Probenvorbereitung reduzierter und nicht reduzierter Proben

Nicht reduzierte Probe	Reduziert Probe, 0,5 M DTT
20 µl Peptidlösung	20 µl Peptidlösung
20 µl Probenpuffer	15 µl Probenpuffer
	5 µl DTT (4 M)

Tabelle 8: Probenpuffer für Tricin-SDS-PAGE für 50 ml

Komponente	Anteil	Menge für 50 ml Lösung
Tris-HCl	0,2 M	1,576 g
Glycerin	40 %	20 ml
SDS	2 %	1,000 g
Orange G	0,04 %	0,020 g

Tabelle 9: Laufpuffer (10x) für die Tricin-SDS-PAGE, pH-Wert 8,3, Volumen 500 ml

Komponente	Anteil	Menge für 500 ml Lösung
Tris-Base	1 M	60,57 g
Tricin	1 M	89,60 g
SDS	1 %	5,00 g

Tabelle 10: Fixierlösung (500 ml) für die Tricin-SDS-PAGE Gele, pH-Wert 8,5

Komponente	Menge für 500 ml Lösung
Borsäure	12,37 g
Glutardialdehyd (25 %)	100 ml

Tabelle 11: Coomassie-Färbelösung, für 500 ml

Komponente	Anteil	Menge für 500 ml Lösung
Coomassie Blue G-250	0,025 %	0,125 g
Essigsäure (100 %)	10 %	50 ml

Tabelle 12: Entfärbelösung für 1l

Komponente	Anteil	Menge für 1 l Lösung
Essigsäure (100 %)	10 %	100 ml
Ethanol (> 99 %)	10 %	100 ml

3.6.4 GRÖSSENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE

Die Grössenausschluss-Chromatographie auch SEC (engl. *Size Exclusion Chromatography*) oder Gel-Permeations-Chromatographie genannt, besitzt eine poröse stationäre Phase und erlaubt damit den kleineren Molekülen in das feine Porensystem einzudringen. Die Zugänglichkeit dieser Zwischenräume bietet damit einen längeren Diffusionsweg für kleinere Stoffe und verzögert so ihre Retentionszeit. Größere Moleküle werden vom Porensystem ausgeschlossen und eluieren früher (Andrews, 1964).

Für die SEC wurde die Anlage ÄKTA™ start (cytiva) mit einer 5 ml Trennsäule aus quervernetztem Dextran (Sephadex™ G-25, GE Healthcare) und der Außenschlussgrenze von 5 kDa verwendet. Mit Hilfe der UV-Detektion bei 280 nm konnten die Peptide detektiert werden. Die Zielpolypeptide sind mit ihrem Molekulargewicht von 3,3 bis 3,6 kDa um das 21-fach größer als das DTT mit 154 Da und können deshalb klar voneinander nach der Größe separiert werden.

Eine Bild der verwendeten Anlage ist der Abbildung 9 zu entnehmen. Während der Lagerung wurde die Anlage in 20 %-igem Ethanol gelagert. Deshalb wurde sie zuerst gründlich mit dem Laufmittel (in dem Fall Kopplungspuffer) gespült. Sowohl für die Spülung der Säule als auch für die Messung wurde eine Flussrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ eingestellt. Nach der Equilibrierung der Säule wurde die 500 μl Probenschleife unter Verwendung einer Spritze mit 600 μl Probe beladen. Als Probe wurde eine $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ frisch reduzierte Peptidlösung in Kopplungspuffer und 10 mM DTT bzw. eine Negativkontrolle (Kopplungspuffer in 10 mM DTT) verwendet. Nach der Beladung der Probenschleife wurde der Lauf mit dem Umschalten des Injektionsventils gestartet. Gleichzeitig wurde in der Betriebssoftware unter „system control“ die Injektionsmarkierung gesetzt. Die gewünschten Peptidfraktionen wurden direkt nach dem UV-Detektor gesammelt.

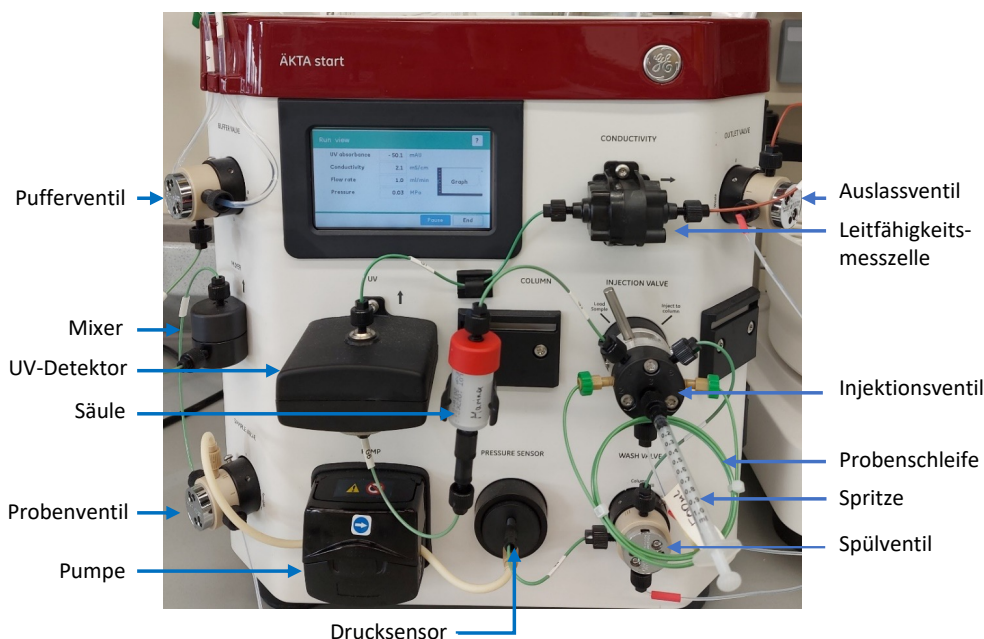


Abbildung 9: ÄKTA™ start von cytiva mit einer Probenschleife von 500 μl , einer 5 ml HiTrap™ Säule aus Sephadex™ G-25 und einer Wellenlänge von 280 nm.

3.6.5 UMKEHRPHASEN

HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

Ein weiteres in dieser Arbeit angewandtes Chromatographieverfahren ist die RP-HPLC. Die Anlage kann Peptide, bei denen sich Sequenzen um eine AS unterscheiden, voneinander trennen. Das Prinzip der Trennung beruht auf der Adsorption der hydrophoben Proteinreste an die unpolare stationäre Phase. Die Proteine bleiben adsorbiert bis das Eluent mit der nötigen Konzentration die Desorption verursacht (Abbildung 10). Dabei hat jedes Peptid basierend auf seiner Aminosäuresequenz und der daraus bedingten Konformation seinen spezifischen „hydrophoben Abdruck“. Die Stärke der Wechselwirkung mit der stationären Phase bestimmt die Zeit, wann das Analyt die Säule verlässt (Retentionszeit) (Vydac® Reference Handbook., 2011). Nicht hydrophobe Substanzen wie das DTT verlassen die Säule im Durchbruch.

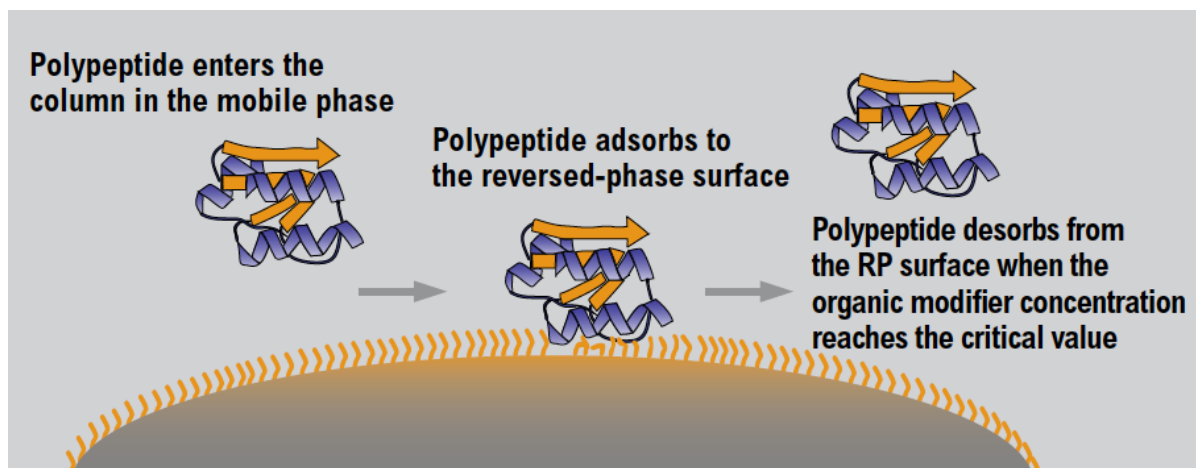


Abbildung 10: Darstellung des RP-HPLC Prinzips. Sobald das Analyt die Säule erreicht, wird es an die hydrophoben Seitenketten der stationären Phase adsorbiert. Ab einer bestimmten Eluentkonzentration, verlässt das Analyt die Säule. Quelle: Handbuch Vydac®, 2011

Die HPLC Anlage ist mit einer RP-18 Vorsäule (Merk) und einer C18 Säule (Avantor) mit einer Länge von 25 cm und 4,6 cm Innendurchmesser ausgestattet. Es wurde eine Flussrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, eine Säulenofentemperatur von 50°C und eine Wellenlänge von 210 nm im Diodenarraydetektor eingestellt (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Einstellparameter für den RP-HPLC-Lauf

Parameter	Wert
Flussrate	1 ml·min ⁻¹
Temperatur	50° C
Wellenlänge	210 nm
Probenvolumen	50 µl

Die Probenschleife fasst maximal 100 µl. Deshalb sind Probenvolumina zwischen 1 µl und 99,5 µl anwendbar. Die Steuerung der Anlage wurde mit Hilfe der Software Primaide (Hitachi) ermöglicht.

Alle Lösungen wurden mittels Unterdruckgerät entgast. Es wurde ein Laufmittel (0,1 % TFA in HPLC-Reinstwasser) und ein Eluent (0,1 % TFA in 70 % Acetonitril und 30 % HPLC-Reinstwasser) verwendet. Für die HPLC-Analyse der verwendeten Peptide wurde ein 45 minütiger Lauf mit einem linearen Elutionsgradienten programmiert. Hierzu wurde eine Methode nach der Tabelle 14 erstellt. Vor der Analyse wurde die Anlage vorbereitend für mindestens 10 min unter den anfänglichen Laufbedingungen gespült. Die Methode beinhaltet in den ersten 10 min eine Verhältnis von Puffer A (Laufmittel) zu Puffer B (Eluent) von 93:7. Während der nächsten 20 min wurde der Eluentanteil auf 100 % linear gesteigert und für weitere 5 min gehalten. In dieser Phase des linearen Anstiegs wird die Retentionszeit der hydrophoben Peptide ermittelt. Am Ende dieser Phase sankt der Eluentanteil auf 7 % und wurde für die restlichen 10 min gehalten. Am Ende der Messung wurde eine Spülung mit Methanol ausgeführt, um die Anlage für die Lagerung in 50 %-igem Methanol vorzubereiten.

Tabelle 14: RP-HPLC-Methode mit dem Zeitplan und den verwendeten Lösungen

Zeitplan [min]	Lösung
0 - 10	93 % Laufmittel + 7 % Eluent
10 - 30	Linearer Anstieg bis 100 % Eluent
30 - 35	100 % Eluent
35-45	93 % Laufmittel + 7 % Eluent

3.7 PEPTIDIMMOBILISIERUNG AUF POLYSTYROL

In dieser Arbeit wurde eine Immobilisierung auf zwei verschiedenen Oberflächen durchgeführt. Dazu wurden vier Peptide mit einem Cysteinrest C- und N-terminal verwendet (N28-ALK; N33-ALK; ALK-28C; ALK-33C).

Der erste Immobilisierungsversuch untersucht eine mögliche Kopplung auf einer Mikrotiterplatte Rotilabo® F-Profil aus Polystyrol (Carl Roth). Dabei wurde aus der 0,01 %-igen TFA Stocklösung eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen $128 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bis $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hergestellt. Dazu wurde in jede Kavität jeweils $90 \mu\text{l}$ HEPES-Puffer vorgelegt und anschließend in die erste Spalte $90 \mu\text{l}$ der $256 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Peptidlösung hinzugefügt. Für die achtfache Verdünnungsreihe wurde aus der ersten Spalte $90 \mu\text{l}$ in die zweite Spalte, dann aus der zweiten Spalte in die dritte bis zur achten Spalte überführt.

Es folgte eine Inkubation über Nacht bei RT. Danach wurden die Verdünnungslösungen mit der Multipipette aus den Kavitäten entnommen und die Vertiefungen mit $100 \mu\text{l}$ HEPES-Puffer gefüllt. Mit diesem Waschschrift wurden mögliche Reste der Verdünnungslösung entfernt. Anschließend wurden $100 \mu\text{l}$ einer Suspension aus Bakterien und HEPES-Puffer im Verhältnis 1:10 hinzugefügt (s. Verhältnis von Mikrodilutionstest). Mit der Formel 2 wurde eine Bakteriensuspension mit $5\cdot 10^6 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ in LB-Medium (s. Kapitel 3.6.2) und mit der Formel 3 das entsprechende Puffervolumen vorbereitet.

$$V_{\text{Bakteriensuspension}/x \text{ Kavitäten}} = x \text{ Spalten} \cdot x \text{ Reihen} \cdot 10 \mu\text{l} \quad \text{Formel 2}$$

$$V_{\text{HEPES}/x \text{ Kavitäten}} = x \text{ Spalten} \cdot x \text{ Reihen} \cdot 90 \mu\text{l} \quad \text{Formel 3}$$

Als nächstes wurde die optische Dichte bei 620 nm (Tecan) gemessen. Nach der Messung wurde die Platte mit Parafilm abgedichtet und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD zum zweiten Mal gemessen. Die Durchführung erfolgte in einer Doppelbestimmung.

3.8 PEPTIDIMMOBILISIERUNG AUF HARZ

Der zweite Immobilisierungsversuch beschäftigt sich mit der Beschichtung der Harzpartikel. Auch hier wurden die vier Peptide mit einem C- und N-terminalen Cysteinrest verwendet. Deren freie Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) können mit den Iodoacetylgruppen der Harzmoleküle eine kovalente Kopplung eingehen. Für eine bessere Flexibilität und Erreichbarkeit sorgen die Spacer beider Bindungspartner (s. Abbildung 11).

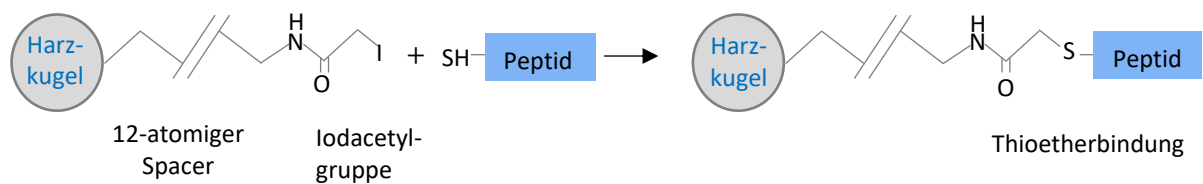


Abbildung 11: Darstellung der Immobilisierungsreaktion eines Peptids mit der Harzkugel über eine Thioetherbindung. Quelle: Abgewandt nach der Bedienungsanleitung von Thermo Scientific SulfoLink® Coupling Resin

Da eine Kopplung nur mit freien Sulfhydrylgruppen möglich ist und eine Dimerbildung die Kopplungsreaktion verhindern würde, ist eine Vorbehandlung der Peptide mit einem reduzierenden Agens notwendig. Ein Gesamtüberblick der Immobilisierungsschemata ist der Abbildung 12 zu entnehmen. Neben den Proben wurde eine Negativkontrolle mitgeführt.

VORBEREITENDE METHODIK

Um die Disulfidbrücken aufzubrechen, wurden die Peptide mit einem reduzierenden Agens versetzt. Dazu wurden die Peptidlösungen mit 10 mM DTT im Kopplungspuffer für 30 Minuten bei RT inkubiert. Das für die Kopplungsreaktion störende DTT wurde nachfolgend mittels SEC (ÄKTA™ start) entfernt (s. Kapitel 3.6.4). Das Ergebnis der Entsalzung konnte mit der anschließenden RP-HPLC-Analyse dargestellt werden.

KOPPLUNGSPROTOKOLL LAUT HERSTELLER

Entsprechend der Bedienungsanleitung von ThermoFisher scientific wurden 1 ml Harzsuspension (Coupling Resin) mit 1 mg Peptid vermischt. Es folgte eine

45-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Dabei wurden die Proben in den ersten 15 Minuten auf dem Thermomixer (Eppendorf) bei 400 rpm geschwenkt und in den restlichen 30 min ruhend inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der Überstand Ü1 für die Analytik aufbewahrt. Die Separierung des Überstands und Pellets erfolgte durch natürliche Sedimentation. Anschließend wurde das Pellet im Löschreagenz (s. Tabelle 16) resuspendiert, um mögliche freie SH-Gruppen zu besetzen. Die Phase dauerte 45 Minuten, wobei die ersten 15 Minuten die Probe bei 400 rpm im Schüttelinkubator (Eppendorf) geschwenkt und in den letzten 30 min ruhend inkubiert wurde. Der resultierende Überstand wurde verworfen. Als nächstes wurde das Pellet mit dem Waschpuffer (s. Tabelle 17) dreimal gewaschen, wobei der Überstand ebenfalls verworfen wurde. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die „immobilisierten“ Harzpartikel im gewünschten Puffer z. B. HEPES resuspendiert. Für eine sichere Entfernung der Waschlösung wurden die Proben dreimal im gewünschten Puffer gewaschen.

HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN:

Tabelle 15: Kopplungspuffer: Herstellung von 1 l mit pH 8,5.

Komponente	Anteil	Menge für 1 l Lösung
EDTA-Na ₂ Dihydrat	5 mM	2,1562 g
Tris	50 mM	0,6057 g

Tabelle 16: Löschreagenz: Herstellung von 15 ml im Kopplungspuffer

Komponente	Anteil	Menge für 15 ml Lösung
L-Cystein-HCl	50 mM	0,1182 g

Tabelle 17: Waschpuffer: Herstellung von 100 ml

Komponente	Anteil	Menge für 100 ml Lösung
NaCl	1 M	5,8440 g

ABSCHLIESSENDE METHODIK

Neben der Kopplung wurde versucht eine Entkopplung darzustellen. Dies wurde durch eine Reduktion mit DTT erreicht (s. Abbildung 12). Die entkoppelten Peptide sollten dann wieder in die Lösung gehen. Der gewonnener Überstand Ü2 kann somit neben dem Ü1 den Erfolg oder den Misserfolg der Immobilisierung bestätigen.

Neben der klassischen Durchführung nach Thermo scientific, wurden zwei weitere Abwandlungen ausprobiert. Dabei wurde im ersten Experiment das Zeitfenster verändert und im zweiten Experiment eine Reduktion der Harzpartikel vorgenommen.

KOPPLUNGSPROTOKOLL MODIFIZIERT

Beim ersten Experiment wurden abweichend vom Protokoll in Abbildung 12 die Inkubationszeiträume der Kopplungsreaktion deutlich ausgedehnt. Die Suspension aus Peptiden und Harz wurde für 2 Stunden (anstatt für 15 min) geschüttelt und anschließend zwei Tage lang (anstatt für 45 Minuten) bei RT inkubiert. Dabei wurde am Tag 1 sowie am Tag 2 der Überstand Ü1 entnommen. Außerdem wurden am zweiten Tag die restlichen Schritte des Kopplungsprotokolls durchgeführt und die Überstände Ü2 gewonnen.

Zeitgleich wurde ein zweites Experiment durchgeführt. Dazu wurden 1500 µl Harzsuspension in 10 mM DTT vor der Kopplung reduziert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei RT wurden die Harzpartikel mittels Zentrifugation bei 10 000 rpm (Eppendorf) mit je 1000 µl Kopplungspuffer fünfmal gewaschen. Der letzte Überstand von der Waschung wurde für die HPLC-Analyse aufgehoben, um das Ergebnis der Waschung zu beurteilen.

IMMOBILISIERUNGSSCHEMA

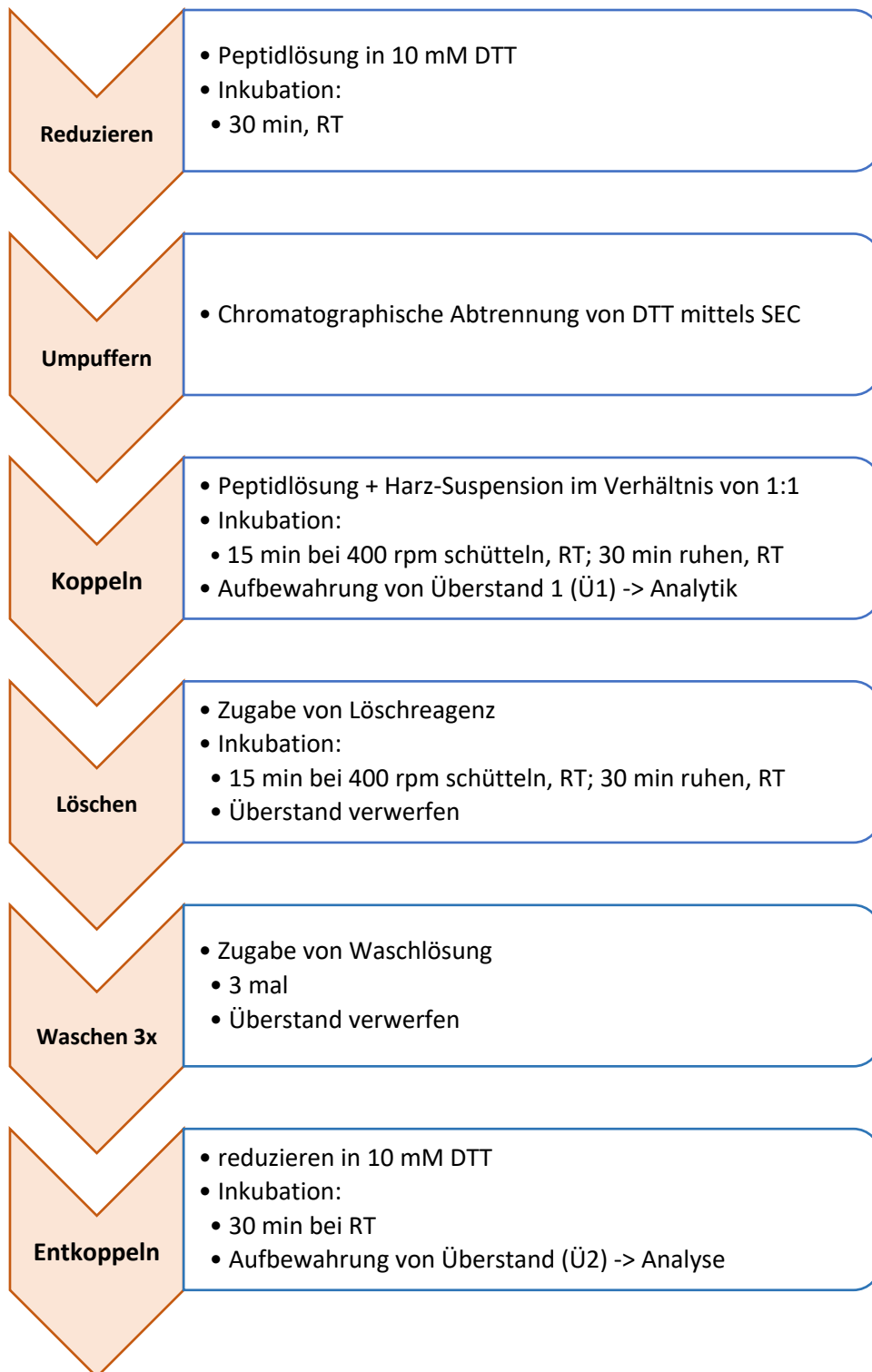


Abbildung 12: Schrittweise Skizze der Vorbereitung und Durchführung der Kopplung. Die Schritte Koppeln bis Waschen mit Waschlösung sind aus der Bedienungsanleitung des Herstellers ThermoFischer scientific www.thermofisher.com 24.11.2021, 15:30 entnommen.

4 ERGEBNISSE

Nachfolgend werden alle Ergebnisse präsentiert. Nach einer Zusammenfassung der Eigenschaften von antimikrobiellen Peptiden folgen eine tabellarische sowie eine graphische Darstellung der antimikrobiellen Aktivität ebenso wie eine elektrophoretische und eine chromatographische Darstellung der Immobilisierungsergebnisse.

4.1 EIGENSCHAFTEN DER ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDE

In der nachfolgenden Tabelle 18 werden die verschiedenen Eigenschaften, wie die Nettoladung, das Molekulargewicht, die Hydrophobizität (H) sowie das hydrophobe Moment (μ_H) zusammengefasst.

Neben der tabellarischen Darstellung ist die Hydrophobizität von 6 Peptiden ebenfalls graphisch veranschaulicht. Der Graph in Abbildung 13 wurde aus den Daten des Onlinetools ProtScale (ExPASy) nach *Eisenberg consensus scale* erstellt. Ausgehend von dem Leitpeptid NK-2 können die Unterschiede der NK-2 Modifikationen betrachtet werden. Dabei zeigt das NK-2 Peptid von seinem N-terminalem Anfang bis zur 14-ten Aminosäure zuerst geringere und später ab der 18-ten Aminosäure eine stärkere Hydrophobizität als die restlichen ALK-Peptide. Kaum erkennbare Unterschiede zeigen dagegen die ALK-Peptide untereinander.

Ergebnisse

Tabelle 18: Auflistung der Aminosäureanzahl, der Ladung und des hydrophoben Moments sowie der Vergleich von Molekulargewicht und der durchschnittlichen Hydrophobizität nach der SeqAPP und dem Onlinetool ProtParam von ExPASy. Je negativer die durchschnittliche Hydrophobizität ist, desto hydrophiler ist die Summe der AS. In dem Auswahlbereich der SeqApp wurde eine Fenstergröße von 7 und eine α -helikalen Sekundärstruktur eingestellt. Quelle: www.expasy.org/resources/protparam, aufgerufen am 24. Nov. 2021, 12:39

Peptid	Anzahl AS	Nettoladung	Molekulargewicht [g/mol]		$\emptyset H$		μ_H
			SeqAPP	Expasy	SeqAPP	Expasy	SeqAPP
NK-2	27	+10	3203	3203	-0,276	-0,263	0,7889
NK-11	11	+6	1272	1272	-0,406	-0,836	0,5586
I2W	27	+10	3276	3276	-0,297	-0,463	0,7829
C7A	27	+10	3171	3171	-0,263	-0,289	0,7941
M11L	27	+10	3185	3185	-0,260	-0,193	0,7978
D21L	27	+10	3201	3201	-0,203	+0,007	0,7957
D21K	27	+12	3216	3216	-0,298	-0,278	0,7969
C7A-D21K	27	+12	3184	3184	-0,286	-0,304	0,8021
ALK-NH ₂	27	+12	3166	3166	-0,270	-0,233	0,8113
ALK-OH	27	+11	3148	3148	-0,270	-0,233	0,8113
N28-ALK	28	+12	3269	3269	-0,250	-0,136	0,8132
ALK-28C	28	+12	3269	3269	-0,250	-0,136	0,7877
N33-ALK	33	+12	3614	3614	-0,179	-0,200	0,7476
ALK-33C	33	+12	3614	3614	-0,179	-0,200	0,6962
Melittin	26	+6	2847	2847	+0,100	+0,273	0,4273

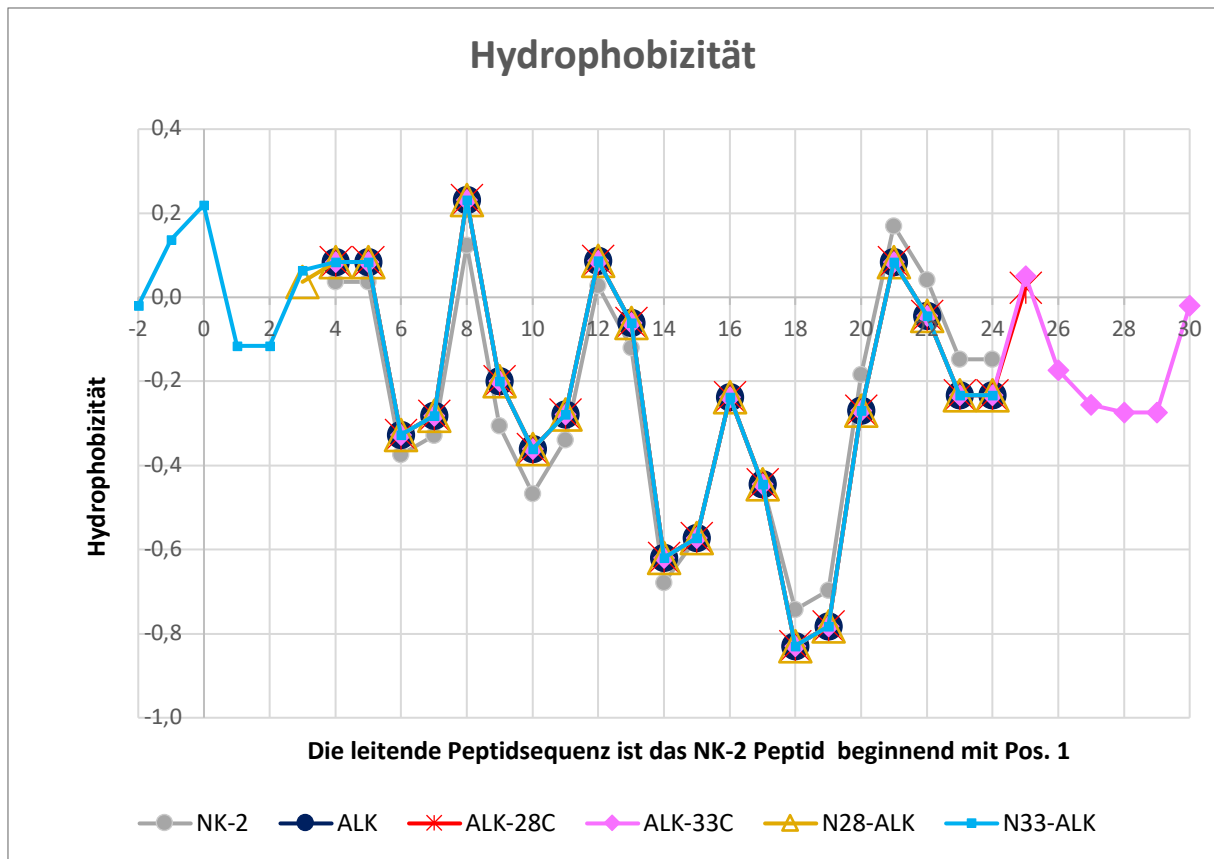


Abbildung 13: Das Ausgangspeptid NK-2 und seine Modifikationen ALK, N28-ALK, N33-ALK, ALK-28C, ALK-33C sind mit der Verteilung der Hydrophobizität nach dem *Eisenberg consensus scale* dargestellt. Die Fenstergröße beträgt 7. Quelle: www.expasy.org/resources/protscale aufgerufen am 24. Nov. 2021, 13:31

4.2 AGARDIFFUSIONSTEST

Der Agardiffusionstest wurde für die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität verwendet. Während der Analyse wurde eine dreifache Wiederholung der 17 antimikrobiellen Peptide durchgeführt. Bei jeder Wiederholung wurden die Peptide in einer Doppelbestimmung bestimmt. Es wurde eine Mengenbandbreite von (0,025; 0,050; 0,100; 0,150; 0,250; 0,400 und 0,500) μg gewählt. Mit dem Bildverarbeitungsprogramm „ImageJ“ wurden die Hemmholflächen berechnet, wobei die Stanzfläche abgezogen wurde.

4.2.1 VERGLEICH DER ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDE

Die Abbildung 14 und 15 stellen den Vergleich zweier Peptide unterschiedlicher Hersteller dar. Das NK-2 (FB) und das ALK-NH₂ (FB) stammen aus dem Forschungszentrum Borstel, abgekürzt mit (FB), und das NK-2 (PG) sowie ALK-NH₂ (PG) wurde von der Firma ProteoGenix bezogen. Bei allen Peptiden ist eine flache Steigung mit steigender Peptidkonzentration erkennbar. Trotz der etwas höheren Hemmflächen von NK-2 (PG) in allen Peptidmengen außer bei 0,5 µg verlaufen die Graphen dicht beieinander. Ähnliches lässt sich bei den Graphen von ALK-NH₂ in der Abbildung 15 feststellen. Obwohl der Graph von ALK-NH₂ (FB) höhere Hemmflächen aufweist, ist die Differenz unter Berücksichtigung der Varianz sehr gering.

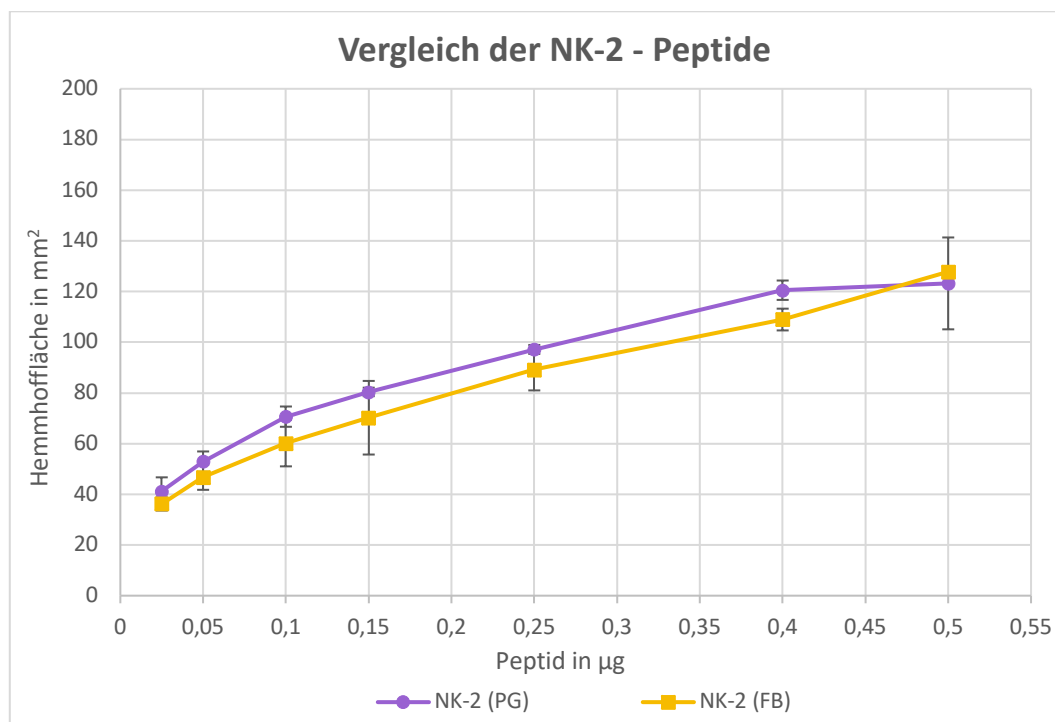


Abbildung 14: Ein Vergleich der NK-2- Peptide von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem Testorganismus *E. coli* WBB01. Das FB steht für den Peptidhersteller Forschungszentrum Borstel und das PG für die Firma ProteoGenix. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar.

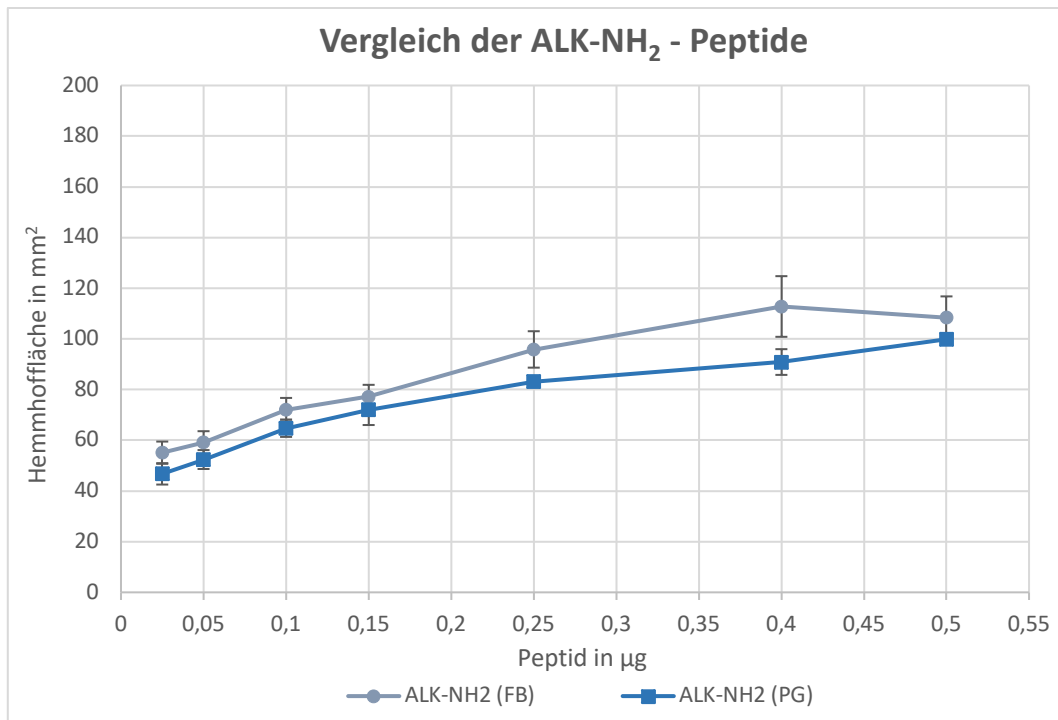


Abbildung 15: Ein Vergleich der ALK-NH₂-Peptide von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem Testorganismus *E. coli* WBB01. Das FB steht für den Peptidhersteller Forschungszentrum Borstel und das PG für die Firma ProteoGenix. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar.

In der Abbildung 16 sind weitere vier antimikrobielle Peptide graphisch zusammengefasst. Das Peptid I2W besitzt im Gegensatz zu NK-2 an der zweiten Stelle kein Isoleucin mehr, sondern ein Tryptophan. Die Seitenkette von Tryptophan ist lipophil und aromatisch. Diese Modifizierung zeigt im ADT eine geringere Aktivität verglichen mit der von NK-2.

Das aus dem Bienengift stammende antimikrobielle Peptid Melittin erzeugt nahezu gleiche Hemmflächen wie das I2W mit dem Testorganismus *E. coli* WBB01.

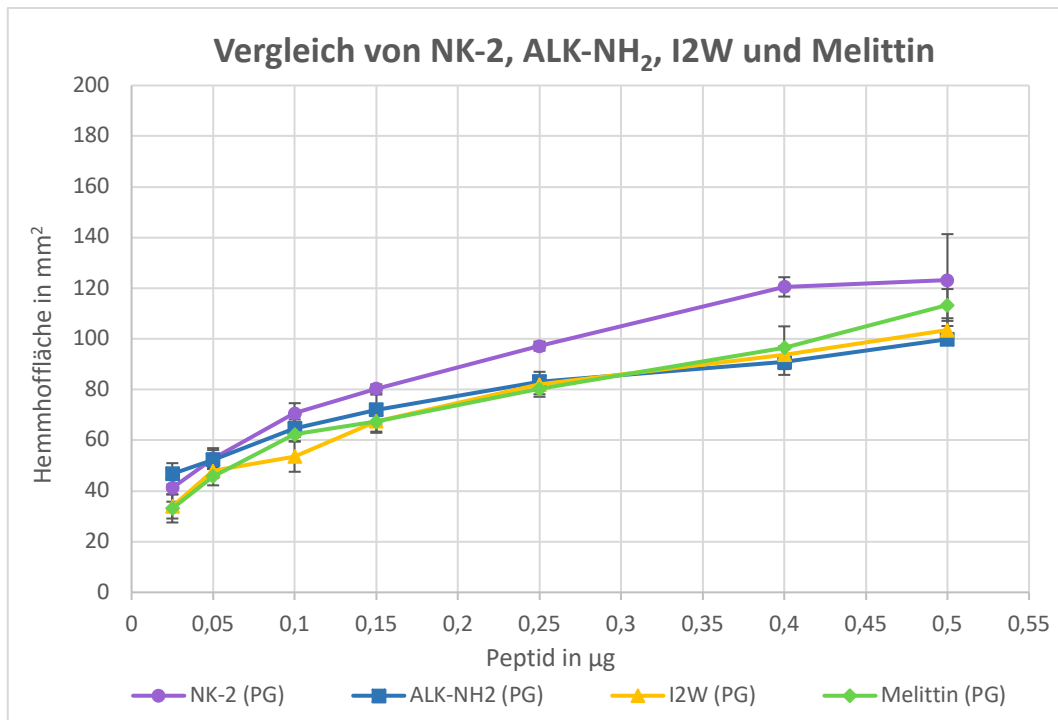


Abbildung 16: Graphische Illustration der antimikrobiellen Aktivität von NK-2 und seinen Derivaten ALK-NH₂ und I2W sowie dem Melittin von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem *E. coli* WBB01. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar.

Die nächste Abbildung 17 zeigt deutlich die Auswirkungen des Austausches von Aminosäuren in der Leitsequenz NK-2. Der Wechsel von Cystein durch Alanin, im Peptid C7A, verringert die Oxidationsbereitschaft und erhöht damit die Stabilität. Gleichzeitig ist eine deutlich höhere Hemmhofläche erkennbar. Verglichen mit allen 16 aktiven Peptiden, weist C7A die höchste Aktivität im ADT auf. Der Austausch von Methionin durch Leucin beim M11L, der ebenfalls eine verbesserte Stabilität mit sich bringt, zeigt dagegen die schwächste Peptidaktivität im ADT. Ebenfalls bringt der Austausch von Asparaginsäure durch Lysin beim D21K ein Absinken der Peptidaktivität. In Anbetracht des Einflusses von D21K sowie von C7A, der die Hemmhofläche erhöht, verläuft der Graph von C7A-D21K in der Mitte zwischen den beiden Kurven. Dabei zeigen alle Kurven einen ähnlichen Steigungsverlauf. Erwartungsgemäß zeigt das inaktive NK-11 Peptid keine antibakterielle Aktivität.

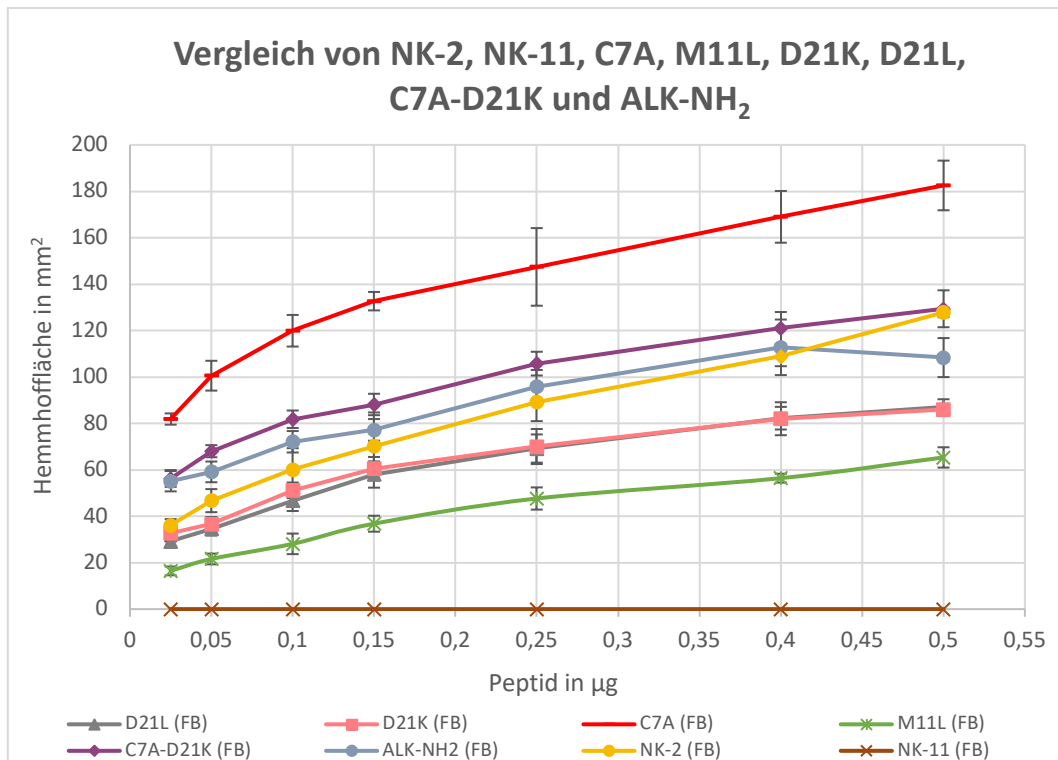


Abbildung 17: Darstellung von NK-2 und seinen 6 Derivaten: ALK-NH₂, C7A, D21K, D21L, M11L, C7A-D21K und NK-11 von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem Testorganismus *E. coli* WBB01. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar.

Der Unterschied zwischen dem aktivitätsstärksten C7A und dem aktivitätsschwächsten M11L wurde graphisch vorgestellt. Dabei handelt es sich bei beiden Peptiden nur um den Austausch von einer Aminosäure in der NK-2-Sequenz. Neben der Nettoladung, die bei beiden Peptiden gleich ist, kann die Hydrophobizität betrachtet werden. In der Abbildung 18 sind die Hydrophobizitäten von NK-2 und seinen Derivaten C7A, M11L und D21K dargestellt. Insgesamt sind die Unterschiede gering. Es lässt sich beobachten, dass die ersten 7 Aminosäuren von C7A eine höhere Hydrophobizität aufweisen, während an den Stellen 12, 13 und 14 etwas geringere Hydrophobizität zu erkennen ist. Bei den restlichen Aminosäuren ist kaum ein Unterschied zu M11L erkennbar.

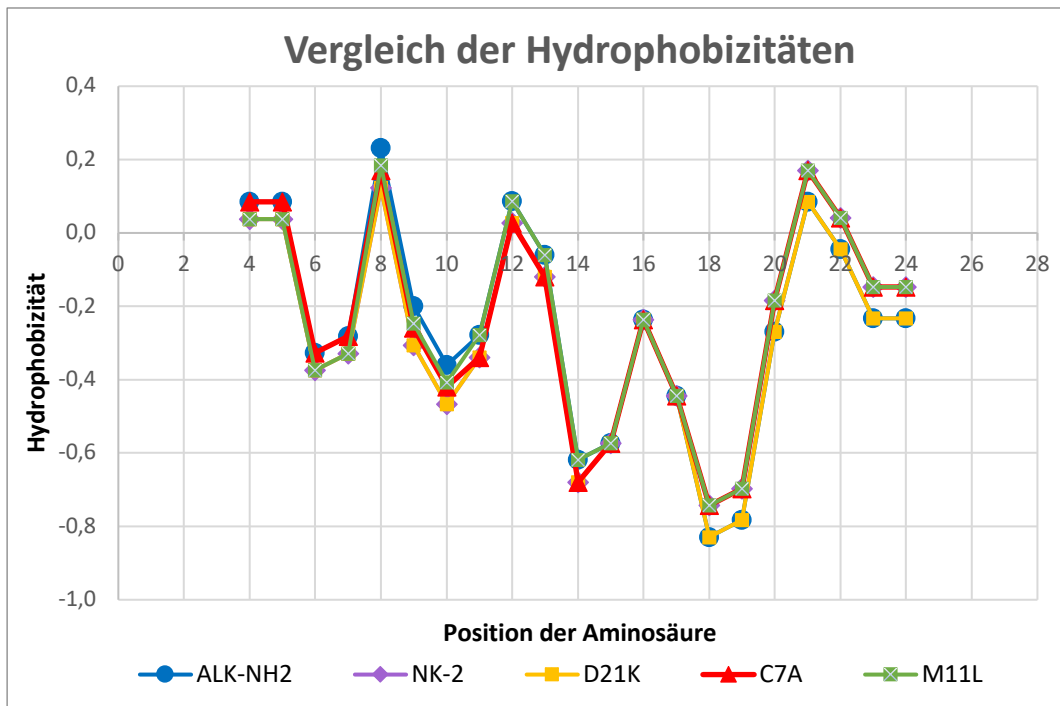


Abbildung 18: Die Verteilung der Hydrophobizitäten von NK-2 und seinen Derivaten C7A, M11L, D21K, D21L und ALK-NH₂. Dargestellt mit dem Onlinetool ProtScale nach *Eisenberg consensus scala*. Die Fenstergröße beträgt 7. Quelle: www.expasy.org/resources/protscale aufgerufen am 12.01.22 um 17:30

4.2.2 AUSWIRKUNGEN DER C-TERMINALEN AMIDIERUNG

Die nachfolgende Abbildung 19 stellt das ALK mit und ohne amidierten C-Terminus im Vergleich zum NK-2 dar. Es ist erkennbar, dass die Amidierung einen Einfluss auf die Größe der Hemmhoﬂäche ausübt. Zwischen dem am C-Terminus amidierten ALK-NH₂ und dem nicht amidierten ALK-OH ist ein Unterschied von 31 mm² bis 43 mm² in der Hemmhoﬂäche bei 0,05 µg und 0,5 µg erkennbar. Somit wirkt sich die Amidierung von ALK mindernd auf die antimikrobielle Aktivität im ADT aus.

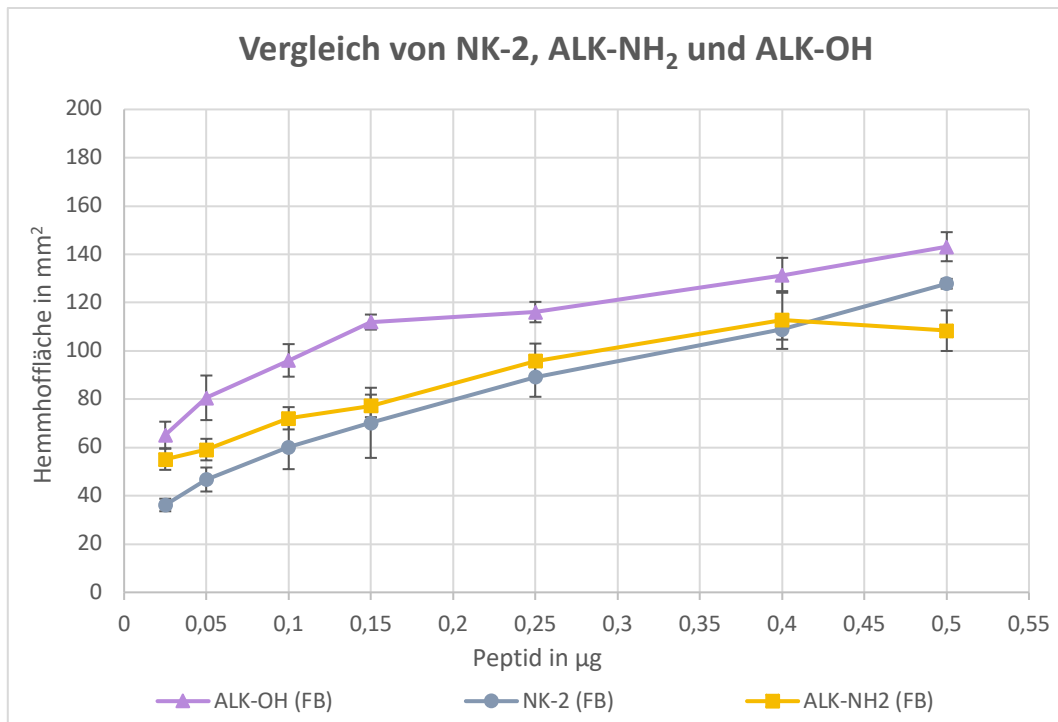


Abbildung 19: Darstellung der Aktivität eines nicht amidierten ALK-OH im Vergleich zu dem Ursurspeptid NK-2 sowie dem am C-Terminus amidierten ALK-NH₂. Messwerte stammen aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem Testorganismus *E. coli* WBB01. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar.

4.2.3 AUSWIRKUNGEN DER SPACERPOSITIONIERUNG IM ALK-NH₂

Anschließend werden die Aktivitätsunterschiede der N- und C-terminalen Modifizierung der ALK-Peptide und deren Leitsequenz, das ALK-NH₂, miteinander verglichen. Das N28-ALK und das ALK-28C besitzen terminal ein Cystein, während das N33-ALK und das ALK-33C zwischen dem Cystein und der Leitsequenz zusätzlich einen Spacer aus fünf Aminosäuren haben.

In der Abbildung 20 sind bei der niedrigsten Peptidmenge nahezu alle Hemmhoflächen identisch, obwohl der nachfolgende Verlauf durchaus Aktivitätsunterschiede zeigt. Prinzipiell lässt sich feststellen, dass die am C-Terminus modifizierten Peptide geringere Hemmhoflächen aufweisen als die Peptide mit demselben Linker und Spacer am N-Terminus. Die niedrigste Aktivität zeigt dabei das ALK-33C.

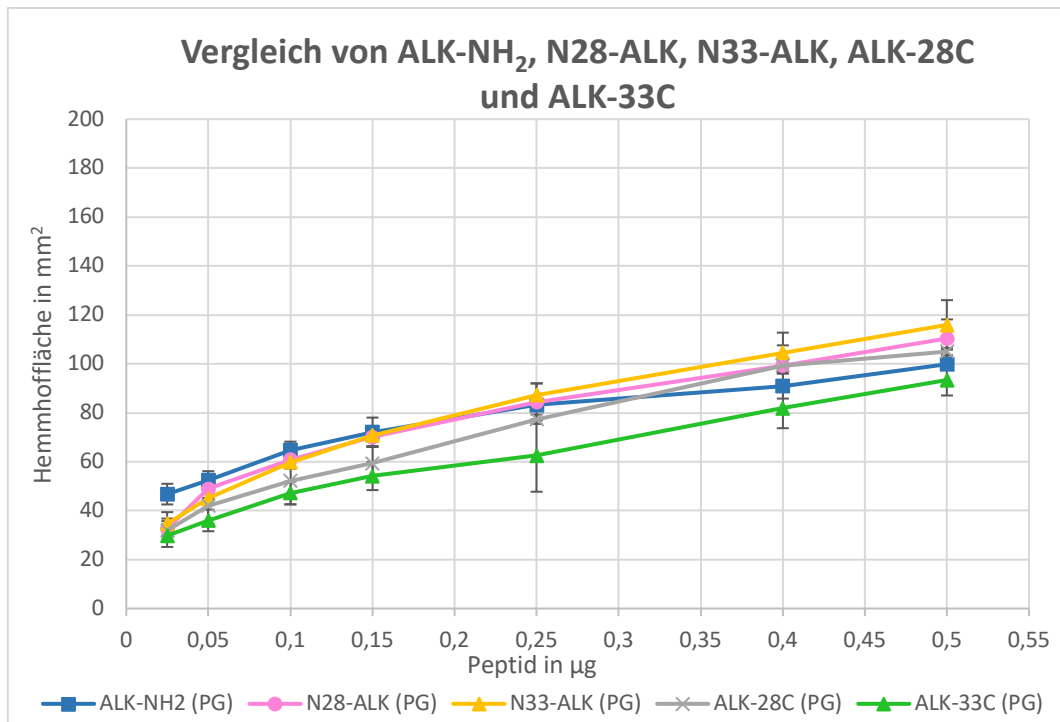


Abbildung 20: Der Verlauf der Hemmhofflächen von ALK und der 4 Immobilisierungspeptide N28-ALK, N33-ALK, ALK-28C und ALK-33C von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem *E. coli* WBB01. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar.

4.2.4 GESAMTÜBERSICHT DER AKTIVEN PEPTIDE

Zum Schluss der ADT-Ergebnisse ist eine Gesamtübersicht der 16 aktiven Peptide in der Abbildung 21 zusammengefasst. Dabei werden die Peptide in den Peptidmengen 0,05 µg und 0,5 µg miteinander verglichen. Es ist erkennbar, dass die stärksten Hemmhofflächen den Peptiden C7A als auch ALK-OH zuzuordnen sind.

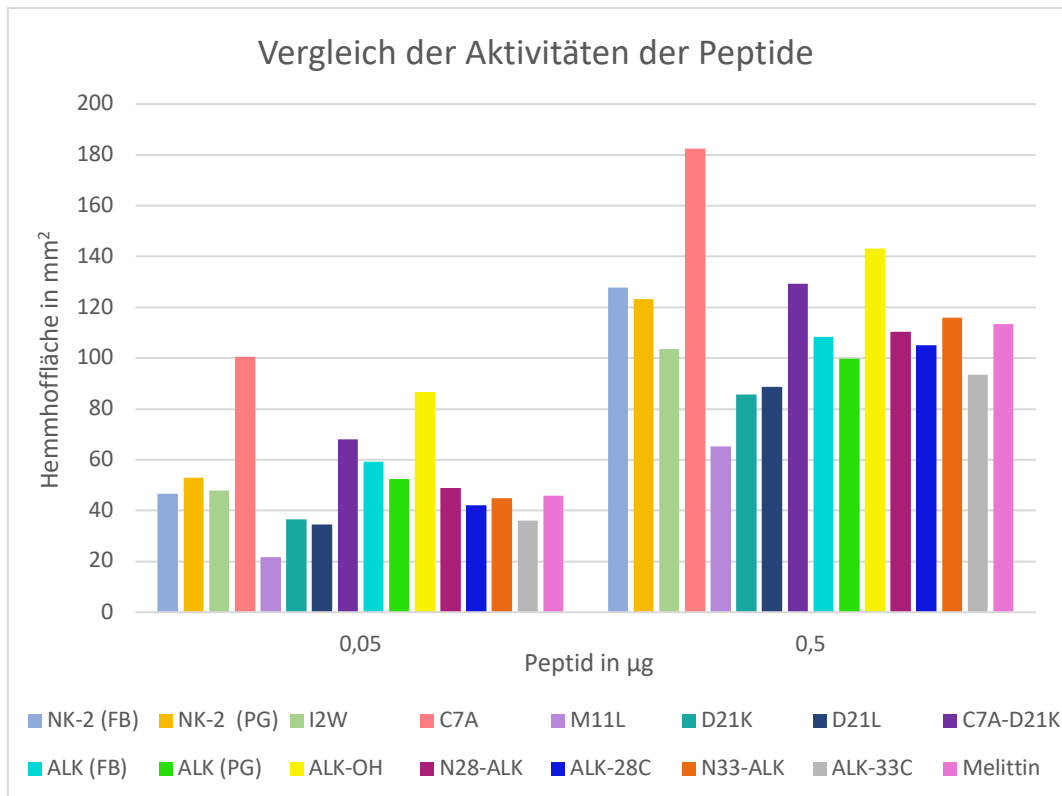


Abbildung 21: Vergleich der Hemmhoflächen aller aktiven Peptide in der Mengen 0,05 µg und 0,5 µg von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem *E. coli* WBB01.

4.3 MIKRODILUTIONSTEST

Eine weitere Möglichkeit die Aktivität der antimikrobiellen Peptide zu testen ist der Mikrodilutionstest. Mit der Verdünnungsreihe kann eine minimale Inhibierungskonzentration, der MIC-Wert, bestimmt werden. Die Tabelle 19 fasst alle MIC-Werte der 17 Peptide von drei unabhängigen Experimenten zusammen (s. Anhang). Dabei werden zwei verschiedene Pufferbedingungen differenziert. Dennoch zeigen größtenteils die Ergebnisse der Peptide sowohl untereinander als auch unter den verschiedenen Pufferbedingungen keinen signifikanten Unterschied. Jedoch deutet die NK-2 Modifikation ALK-COOH mit den MIC-Werten zwischen zwei und vier auf die stärkste Aktivität hin.

Zwar könnte bei I2W und D21K eine Tendenz für eine verringerte Aktivität in Anwesenheit von Salz im Puffer interpretiert werden, jedoch finden sich auch komplett gegenteilige Resultate wie beim D21L und NK-2. Diese Peptide zeigen eine stärkere Aktivität in Anwesenheit von Salz. Diese Ergebnisse unterscheiden sich jedoch um nur eine Verdünnungsstufe und liegen somit in der Streuweite dieser Methode.

Tabelle 19: Werte der minimalen Inhibierungskonzentration von 17 Peptiden von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Analyse wurde mit und ohne 150 mM NaCl im HEPES-Puffer mit dem Mikroorganismus *E. coli* WBB01 bei einer Inkubation über Nacht bei 37° C durchgeführt.

Peptid	MIC-Wert in $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ In HEPES	MIC-Wert in $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 150 mM NaCl in HEPES
NK-2 (FB)	4 - 8	4 - 8
NK-2 (PG)	8 - 16	8
NK-11	> 64	> 64
I2W	4 - 8	8 - 16
C7A	4	4
M11L	4 - 8	4
D21K	4	8
D21L	4 - 8	4
C7A-D21K	4	4
ALK-NH ₂ (FB)	4	4
ALK-NH ₂ (PG)	4 - 8	8
ALK-OH	2 - 4	2 - 4
N28-ALK	4	4
ALK-28C	4	4
N33-ALK	4	4
ALK-33C	4	4
Melittin	4 - 8	8

4.4 TRICIN-SDS-PAGE

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der elektrophoretischen Trennung der NK-2 und ALK-Peptide vorgestellt. Die Abbildung 22 zeigt eine Übersicht von dem NK-2 und von den ALK-Peptiden in den Peptidmengen 1 μg und 2 μg . Es ist deutlich erkennbar, dass alle nicht reduzierten Peptide mit einem Cysteinrest Oligomere bilden. Deshalb zeigen die Banden cysteinhaltiger Peptide wie NK-2, N28-ALK, ALK-28C, N33-ALK und ALK-33C im oberen Gel einen höheren Molekulargewicht als das ALK-NH₂, welches zusammen mit ALK-OH die einzigen Peptide sind ohne einen

Ergebnisse

Cysteinrest. Im unteren Gel sind die Peptide in ihrer reduzierten Form dargestellt. Durch die fehlenden Disulfidbrücken befinden sich alle Peptide auf gleicher Höhe bei 10 kDa.

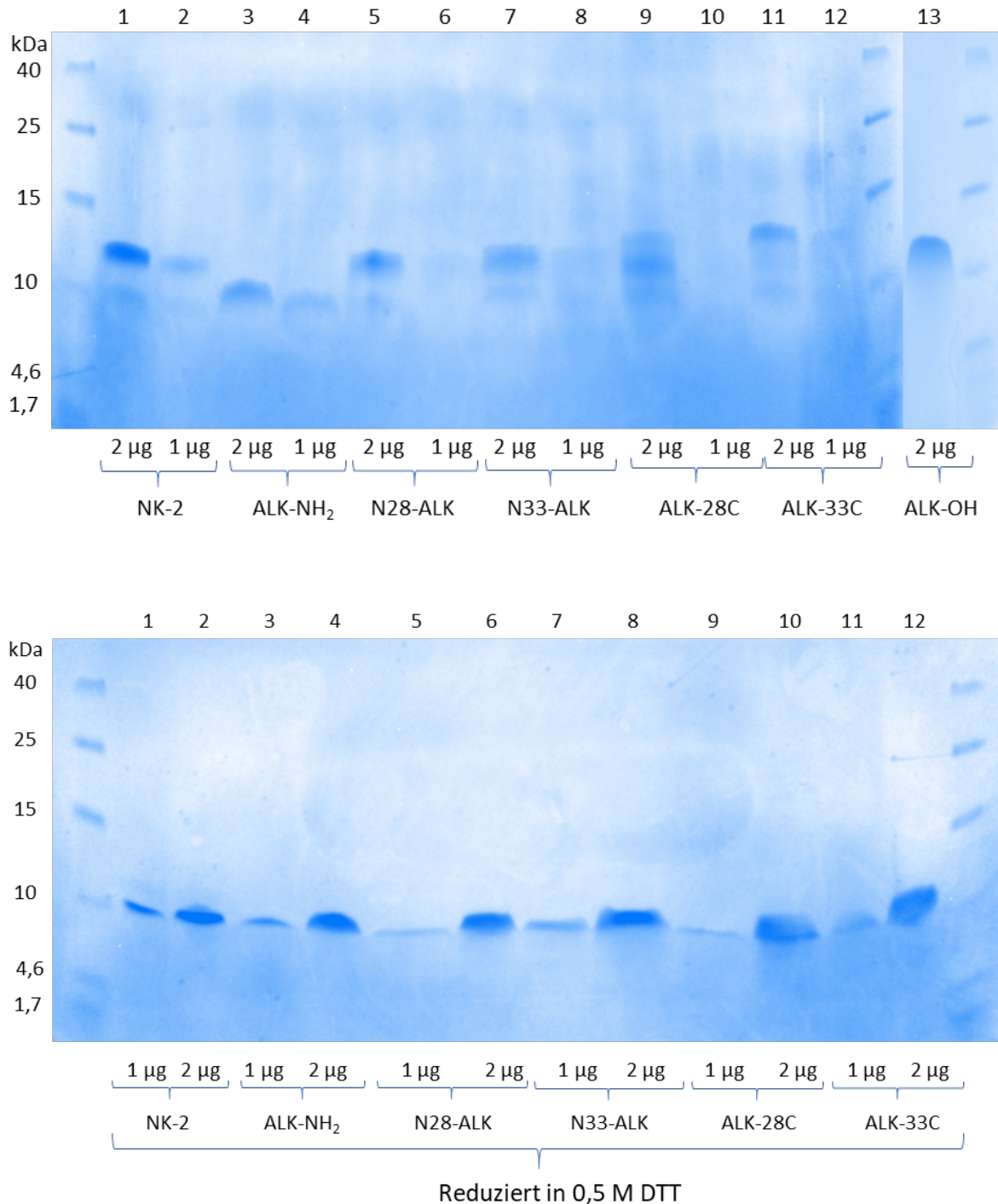


Abbildung 22: Tricin-SDS-PAGE von NK-2 sowie seinen ALK-Derivaten in den Peptidmengen 1 µg und 2 µg. Im oberen Gel sind die Peptide in ihrer unbehandelten Form dargestellt, während im unteren Gel die Peptide vor der Auftragung in 0,5 M DTT reduziert wurden.

Die Abbildung 23 stellt eine Verdünnungsreihe von ALK-28C dar. Banden mit größerer Peptidmenge erscheinen dicker. Anhand dieser Abbildung kann eine sinnvolle Verwendung der Peptidmenge für die Tricin-SDS-PAGE Analyse abgelesen werden. Eine Peptidmenge von 1 µg von ALK-28C kann sowohl in reduzierter als auch in nativer Form gut erkannt werden. Die genaue Nachweisgrenze liegt vermutlich zwischen den Verdünnungsstufen 0,3 µg und 1 µg. Jedenfalls können Peptidmengen $\leq 0,3 \mu\text{g}$ nicht dargestellt werden.

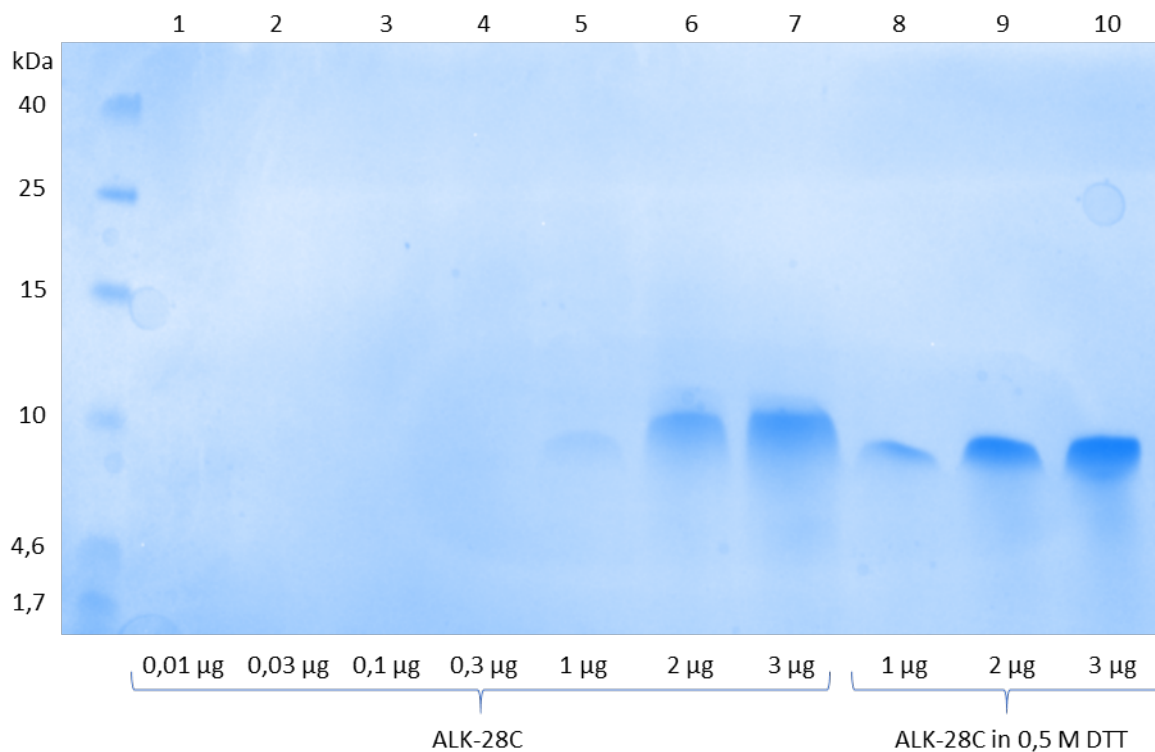


Abbildung 23: Tricin-SDS-PAGE Verdünnungsreihe von ALK-28C in den Peptidmengen von 0,01 µg bis 3 µg. Das ALK-28C ist ebenfalls in seiner reduzierten Form abgebildet.

4.5 PEPTIDIMMOBILISIERUNG

Die Peptidimmobilisierung an der Mikrotiterplatte aus Polystyrol konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Das ungehinderte Wachstum der Bakterien nachdem die Peptidverdünnungen entfernt und die Kavitäten einmal gespült worden sind, konnte deutlich mit der optischen Dichte nachgewiesen werden (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: Ergebnisse der minimalen Inhibierungskonzentration von dem Immobilisierungsversuch auf eine Polystyroloberfläche. Die Analyse erfolgte in HEPES-Puffer bei einer maximalen Peptidkonzentration von $128 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ mit dem Mikroorganismus *E. coli* WBB01.

Peptid	MIC-Wert in $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ In HEPES
N28-ALK	> 128
ALK-28C	> 128
N33-ALK	> 128
ALK-33C	> 128

Als nächstes wurde eine andere Immobilisierungsstrategie durchgeführt. Demnach sollten die Peptide eine kovalente Thioetherbindung mit den Harzkügelchen eingehen. Aus den Ergebnissen der Tricin-SDS-PAGE konnte jedoch entnommen werden, dass die Peptide als Oligomere vorliegen. Deshalb wurde vor der Immobilisierung ein Reduktionsmittel hinzugefügt, welches anschließend mittels SEC (ÄKTA™ start) wieder entfernt wurde, da dessen Vorhandensein die Kopplungsreaktion verhindern würde. Anschließend wurden die gesammelten Fraktionen auf die Anwesenheit von DTT mit der RP-HPLC überprüft.

Die Chromatogramme der SEC sind in der Abbildung 24 bis Abbildung 26 vorgestellt. Alle Peptide verließen laut der UV-Detektion die Säule zwischen 1,5 ml bzw. 1,6 ml und 3,5 ml bzw. 3,8 ml. Der DTT-Peak fängt dabei bei 4 ml bzw. 4,2 ml an und endet bei 8,6 ml bzw. 8,9 ml. Laut der SEC-Analyse hatten alle Proben die gleichen Retentionszeiten. Alle Peaks der Peptide hatten ihren höchsten Punkt bei 2,3 ml und alle DTT-Peaks bei 5,6 ml. Um eine mögliche Vermischung der Fraktionen mit den DTT-Peaks zu verhindern, wurden die Peptidfraktionen zwischen 1,7 ml und 3,2 ml bzw. beim N33-ALK zwischen 1,8 ml und 3,3 ml gesammelt. Um bei der Negativkontrolle das gleiche Fraktionsvolumen wie bei den Proben abzubilden, wurde eine Fraktion zwischen dem niedrigstem Wert 1,7 ml und dem höchsten gesammelten Wert 3,3 ml aufgefangen. Insgesamt wurde während der Umpufferung eine dreifache Probenverdünnung erzielt.

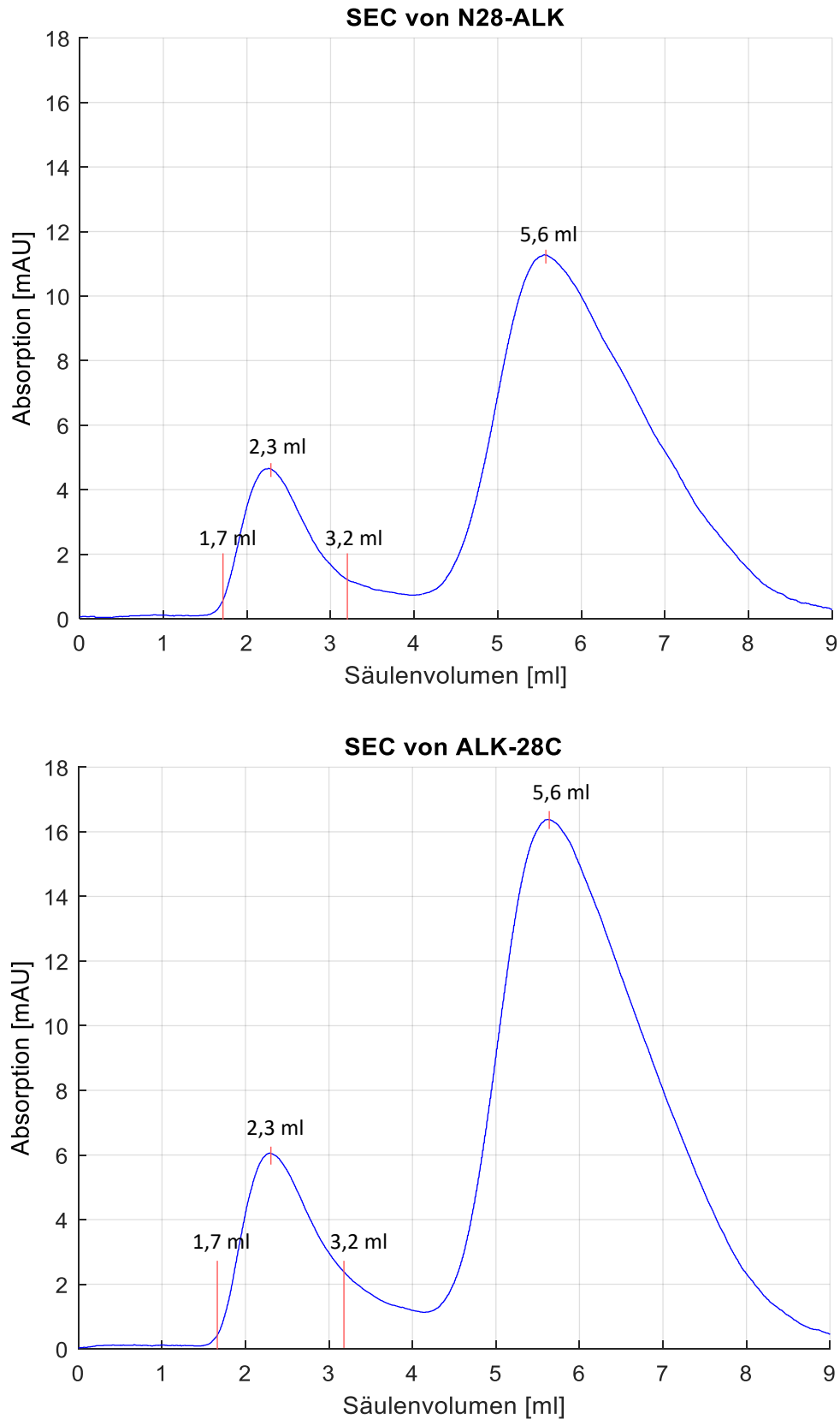


Abbildung 24: SEC-Analyse von 0,5 mg N28-ALK (oben) bzw. ALK-28C (unten). Die roten Balken bei 1,7 ml und 3,2 ml zeigen den gesammelten Fraktionsausschnitt. Die Anlage wurde bei 280 nm mit dem Kopplungspuffer und einer Flussrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ betrieben.

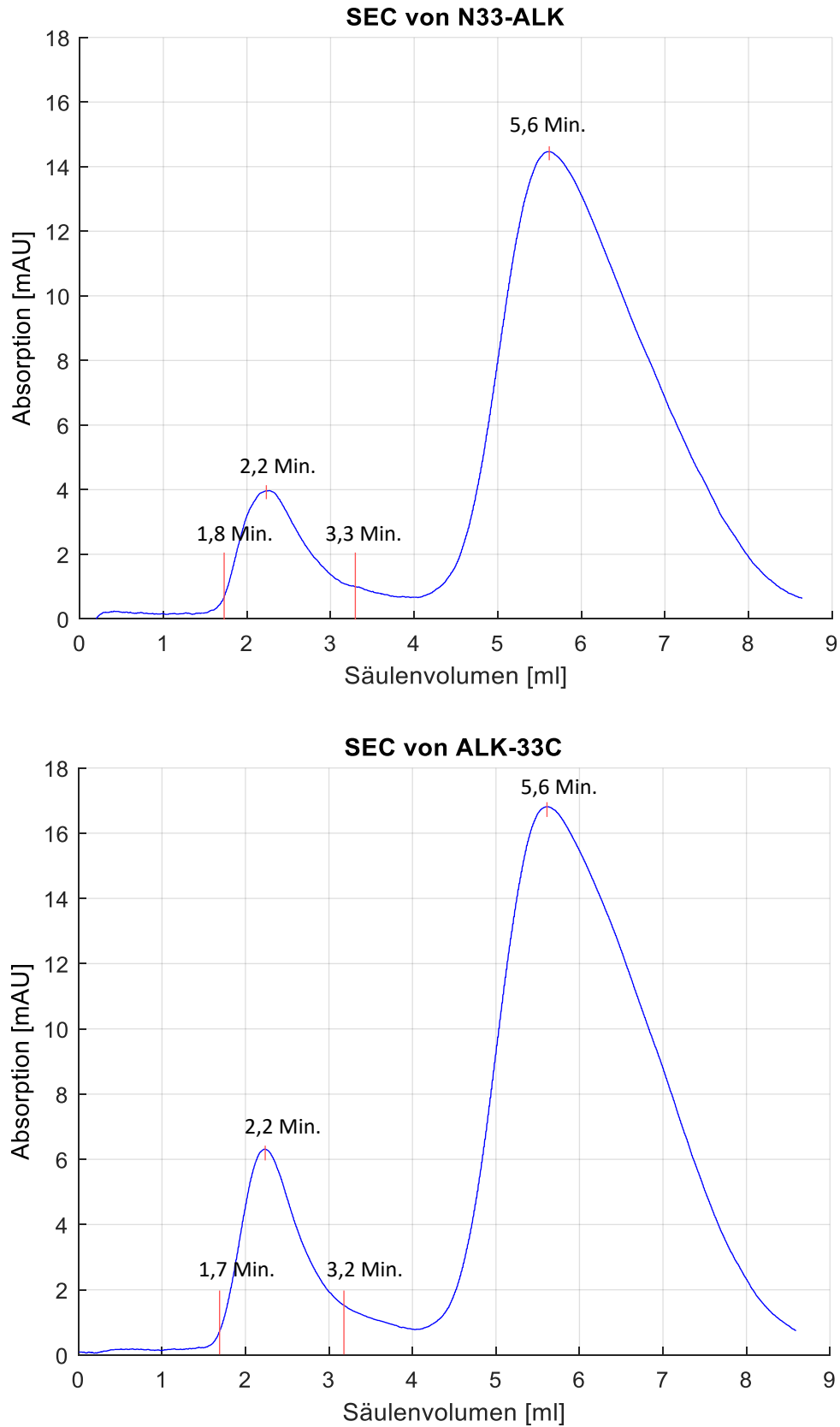


Abbildung 25: SEC-Analyse von 0,5 mg N33-ALK (oben) bzw. ALK-33C (unten). Die roten Balken bei 1,7 ml bzw. 1,8 ml und 3,2 ml bzw. 3,3 ml zeigen die gesammelte Fraktion. Die Anlage wurde bei 280 nm mit dem Kopplungspuffer und einer Flussrate von $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ betrieben.

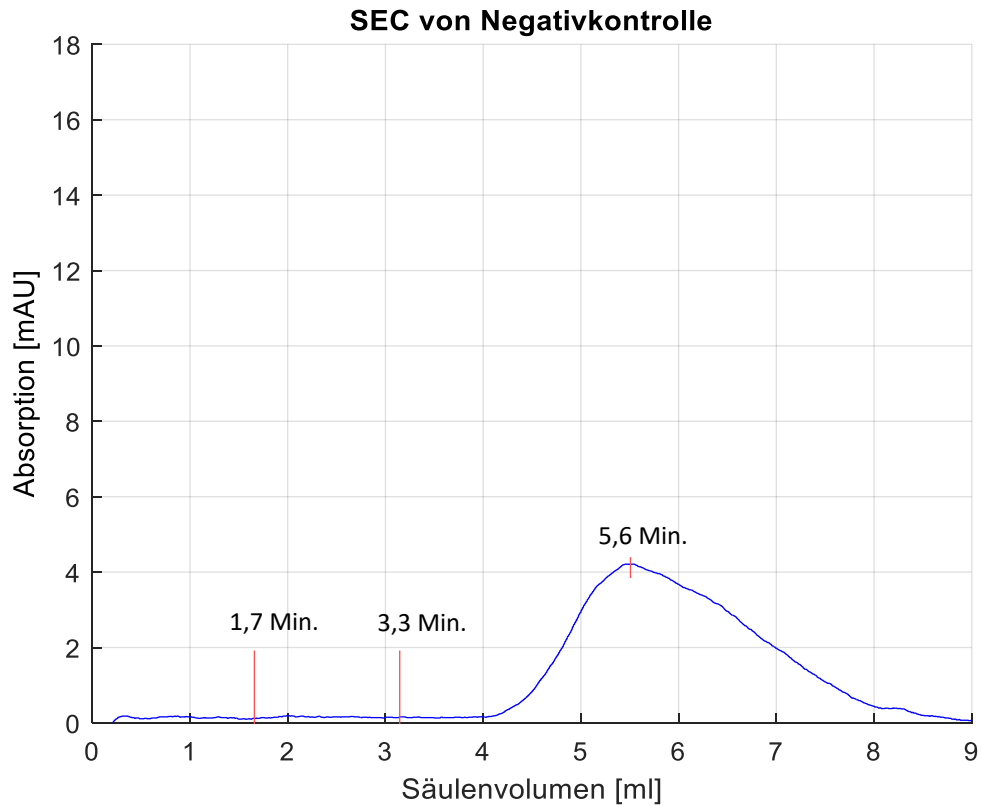


Abbildung 26: SEC-Analyse von der Negativkontrolle. Die roten Balken bei 1,7 ml und 3,3 ml zeigen den gesammelten Fraktionsausschnitt. Die Anlage wurde bei 280 nm mit dem Kopplungspuffer und einer Flussrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ betrieben.

In den Abbildung 27 bis 29 sind die Chromatogramme einer RP-HPLC Analyse dargestellt. Darin sind reduzierte sowie entsalzten Proben erkennbar. Vor jeder Messung wurde eine VE-Wasserprobe analysiert. Da die Anlage über einen längeren Zeitraum nicht betrieben wurde und die Lagerbedingungen ungewiss sind, erscheinen anlagenbedingte Störungen als sogenannte „Geisterpeaks“ bei 3 min und 21 min. Diese Peaks sind nicht der Probe zuzuordnen, da sie ebenfalls in der Negativkontrolle (Kopplungspuffer mit und ohne DTT) sowie in den VE-Wasserproben erscheinen.

Der Peak bei 5,8 min im Durchbruch der reduzierten Proben ist dem DTT zuzuordnen, entsprechend der reduzierten Negativkontrolle (s. Abbildung 29). Dagegen erscheinen bei den entsalzten Proben keine Peaks bei 5,8 min im Durchbruch.

Alle Peptide zeigen eine sehr ähnliche Retentionszeit bei 23,5 min (ALK-33C), 23,7 min (ALK-28C), 24,1 min (N28-ALK) und 24,4 min (N33-ALK).

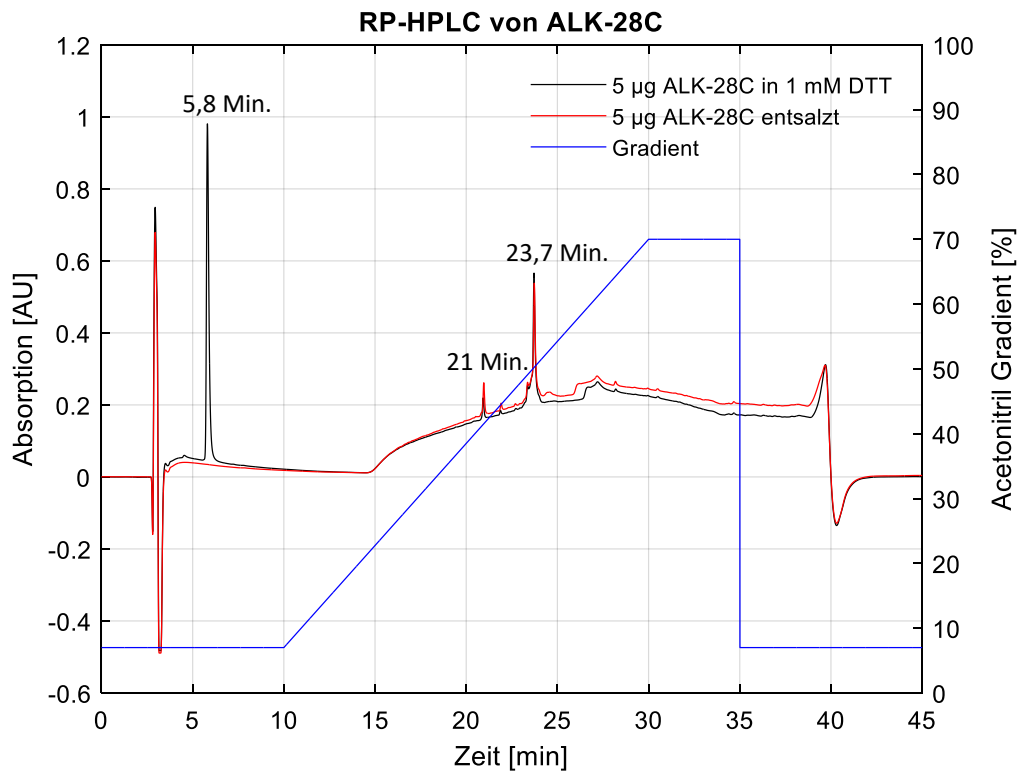
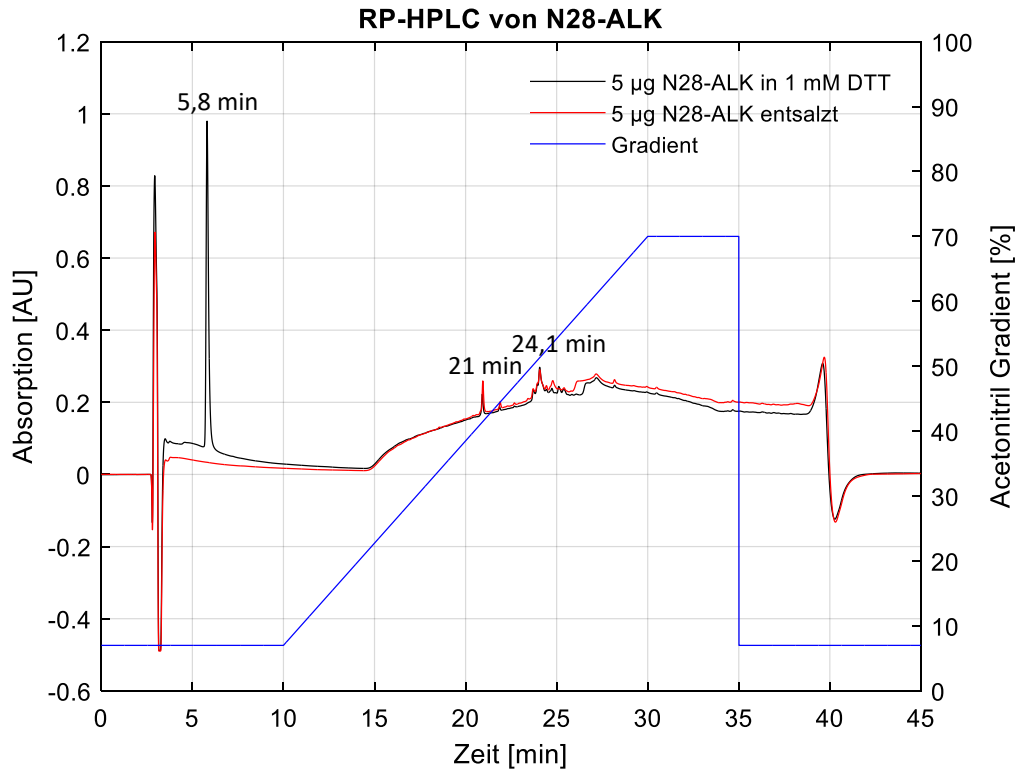


Abbildung 27: RP-HPLC Analyse von je 5 µg N28-ALK (oben) und ALK-28C (unten) bei 210 nm. Die schwarze Kurve zeigt das Peptid vor, die rote nach der Entsalzung und die blaue den linearen Gradientenverlauf von Acetonitril. Aufzugebendes Volumen sind 50 µl, die Flussrate beträgt 1 ml·min⁻¹.

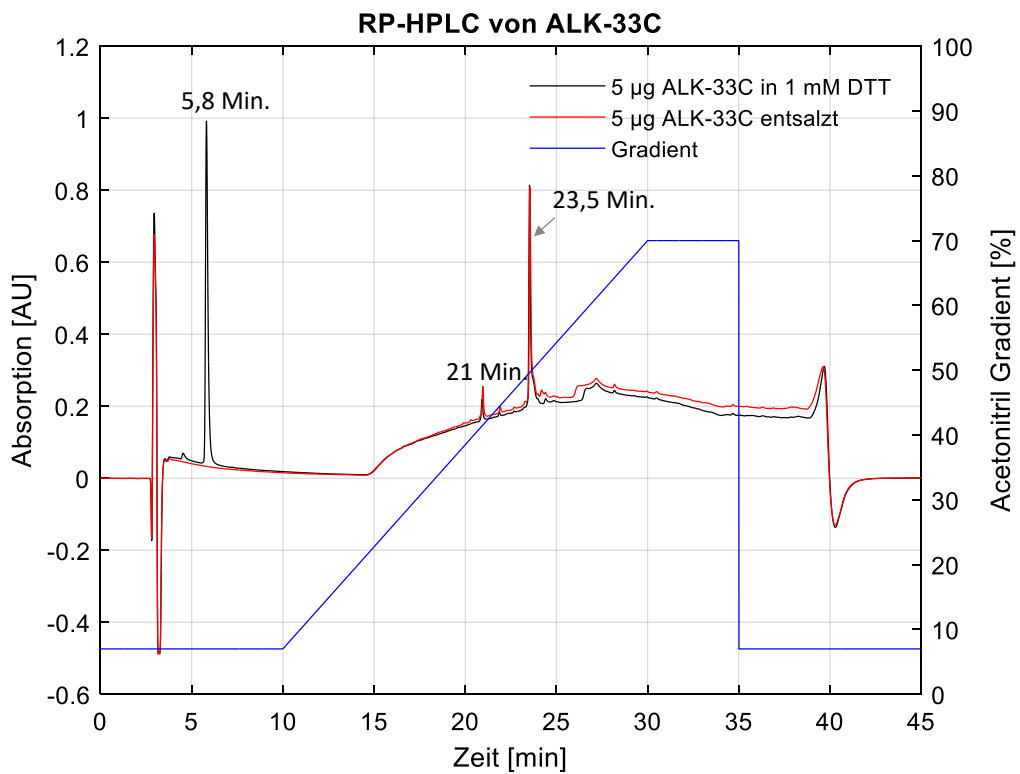
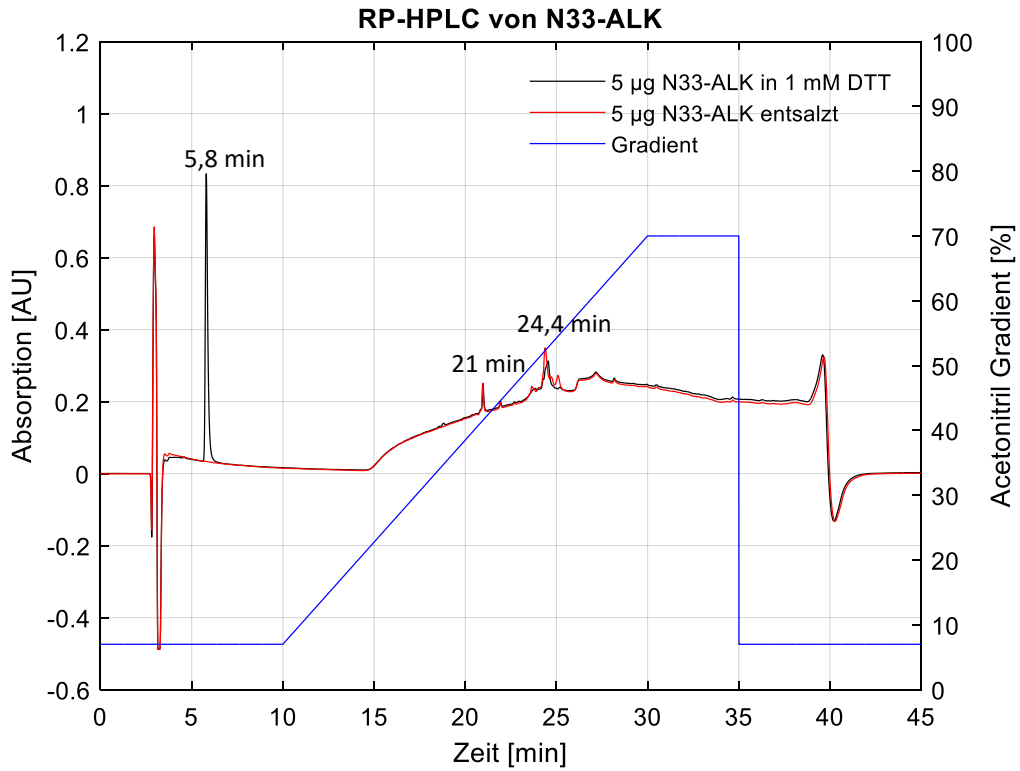


Abbildung 28: RP-HPLC Analyse von 5 µg N33-ALK (oben) bzw. ALK-33C (unten) bei 210 nm. Die schwarze Kurve zeigt das Peptid vor, die rote nach der Entsalzung und die blaue den linearen Gradientenverlauf von Acetonitril. Aufzugebendes Volumen sind 50 µl, die Flussrate beträgt 1 ml·min⁻¹.

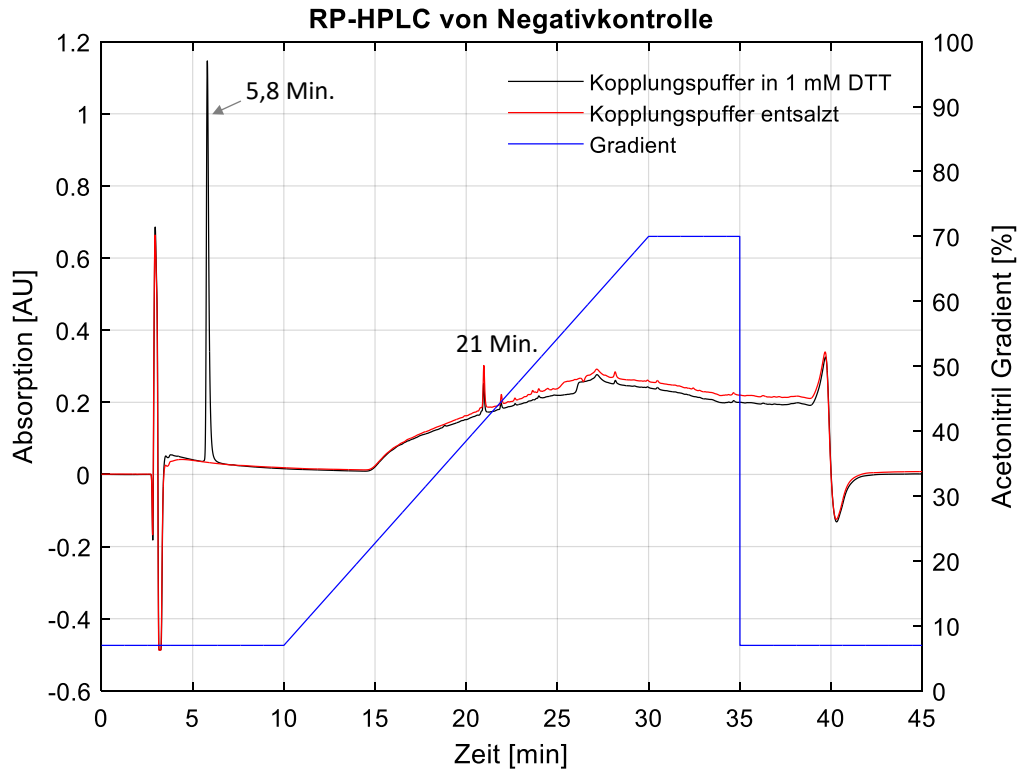


Abbildung 29: RP-HPLC Analyse von der Negativkontrolle bei 210 nm. Die schwarze Kurve zeigt das Peptid vor, die rote nach der Entsalzung mit der SEC (ÄKTA™ start) und die blaue den linearen Gradientenverlauf von Acetonitril.. Aufzugebendes Volumen sind 50 µl, die Flussrate beträgt 1 ml·min⁻¹.

KOVALENTE IMMOBILISIERUNG:

Die Immobilisierung wurde nach dem Herstellerprotokoll mit dem Kopplungsharz SulfoLink® Coupling Resin (Thermo scientific) durchgeführt (s. Abbildung 12). Die Überstände Ü1 (direkt nach der Kopplung) und Ü2 (Reduzierung der gekoppelten Peptide) wurden gesammelt und mit der Tricin-SDS-PAGE analysiert.

Die Ergebnisse der ersten Harzimmobilisierung sind in der Abbildung 30 dargestellt. Die Fraktionen sowie die Überstände wurden unverdünnt auf das Gel aufgetragen. Die Überstände Ü1 weisen eine geringere Peptidmenge als die Fraktionen auf. Dies kann jedoch auf die Verdünnung mit dem Coupling Resin 1:1 während der Kupplungsreaktion erklärt werden. Es ist deutlich erkennbar, dass alle Ü1 eine Bande und alle Ü2 keine Banden enthalten. Außerdem ist bei dem ALK-28C und ALK-33C eine Dimerbildung erkennbar.

Ergebnisse

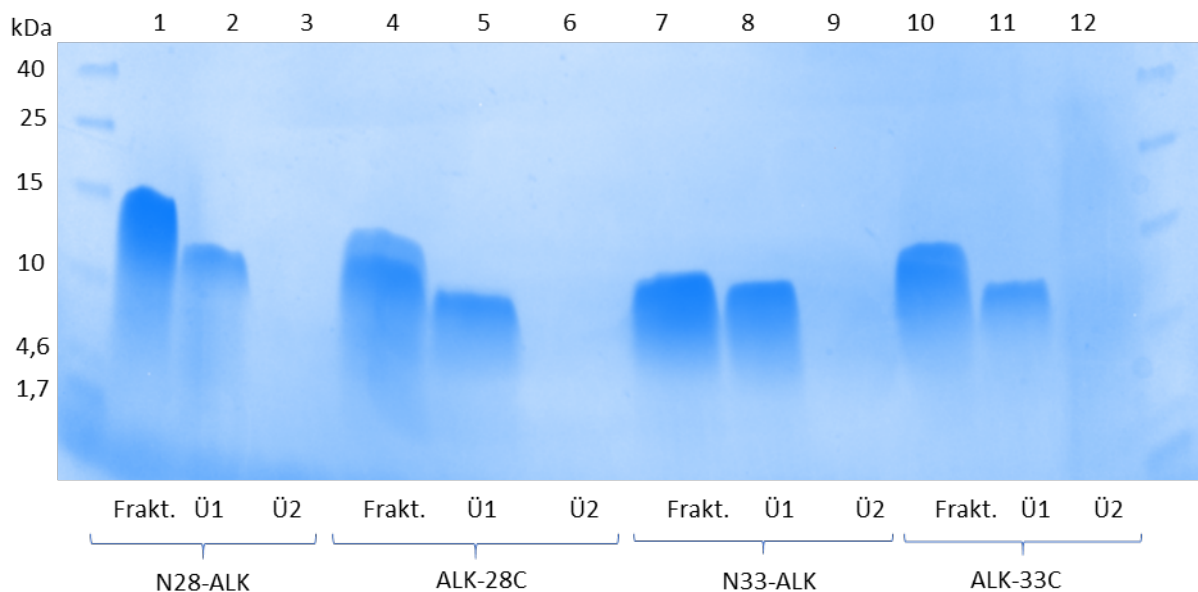


Abbildung 30: Tricin-SDS-PAGE von der ersten Harzkopplung. Die Fraktionen nach der Entsalzung wurden mit „Frakt.“ abgekürzt. Der Überstand 1 (Ü1) entstand direkt nach der Kopplungsreaktion und Überstand 2 (Ü2) nach der Reduktion mit 10 mM DTT der an Harz „gekoppelten“ Peptide.

Mit dieser Erkenntnis wurden zweite weitere Immobilisierungsexperimente durchgeführt. Dabei wurden im Experiment 1 die Inkubationszeiten für die Kopplungsreaktion verlängert und im Experiment 2 die Harzpartikel vor der Kopplung reduziert. Damit wurden parallel zwei Protokollabwandlungen durchgeführt.

Die Abbildung 31 veranschaulicht, dass sowohl nach einem Tag sowie nach zwei Tagen längerer Inkubationszeit die Peptide immer noch im Überstand (Ü1) zu finden sind. Es ist auch keine Abnahme der Peptidmenge bei allen Peptiden im Vergleich von Tag 1 und Tag 2 erkennbar. Im oberen Gel wurden die Fraktionen für die Gelauftragung 1:3 verdünnt und erscheinen somit heller als Ü1. Auch die Überstände (Ü2) deuten auf den Misserfolg der Immobilisierung.

Das untere Gel der Peptide N33-ALK und ALK-33C bestätigt das Ergebnis. Hier wurden die Fraktionen nicht verdünnt und erscheinen als dickere Banden. Beim ALK-33C ist bei der Fraktion als auch bei Ü1 im Experiment 2 eine Dimerbildung erkennbar.

Ergebnisse

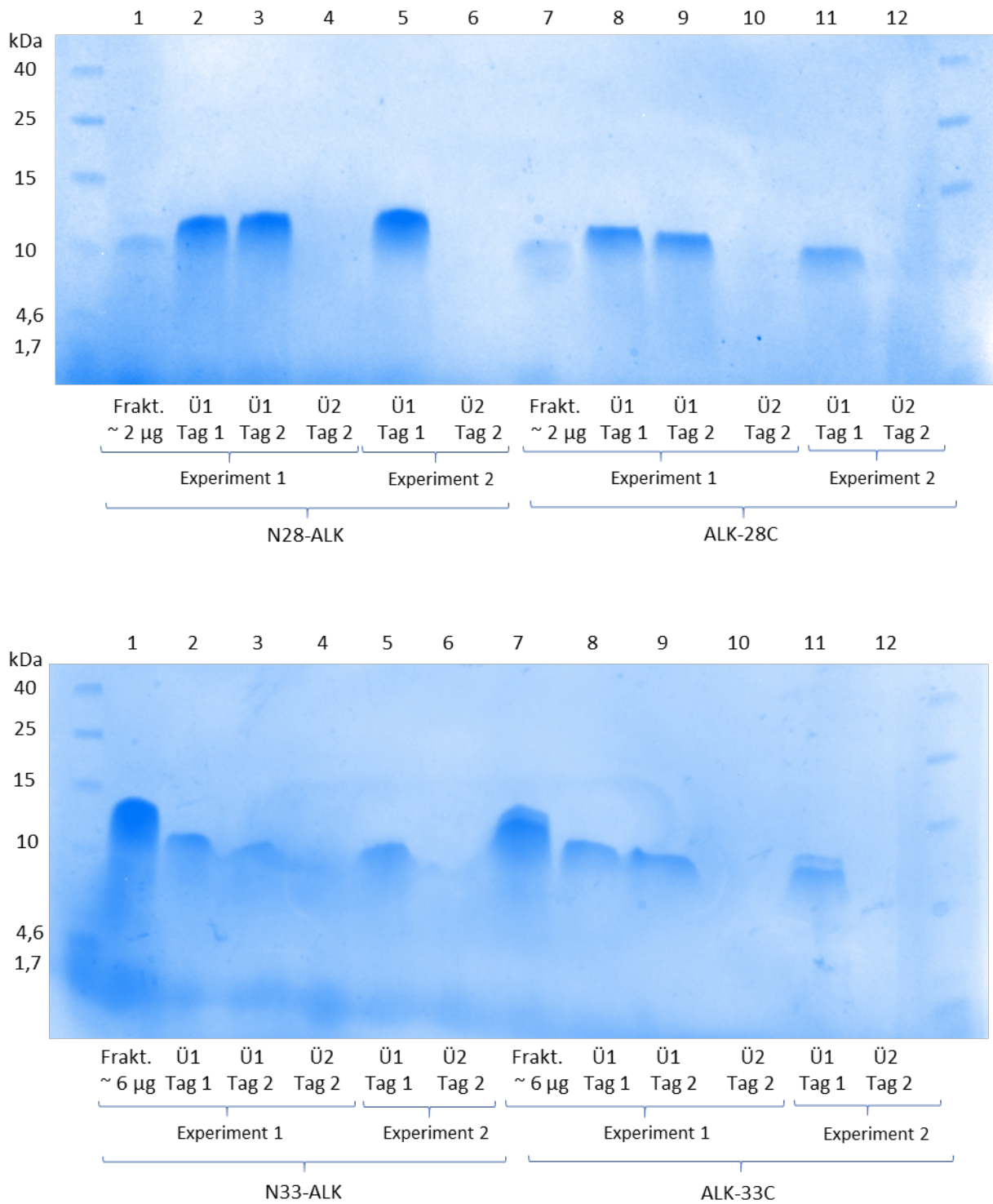


Abbildung 31: Tricin-SDS-PAGE von N28-ALK und ALK-28C (oben) sowie N33-ALK und ALK-33C (unten) im Immobilisierungsexperiment 1 und 2. Der Überstand Ü1 entspricht dem ersten Überstand, welches direkt nach der Kopplungsreaktion entnommen wurde. Die Überstände Ü2 wurden nach der Reduktion der gekoppelten Peptide entnommen.

Die letzte RP-HPLC Analyse in Abbildung 32 zeigt den Überstand aus der letzten Spülung der Harzpartikel nach einer 10 mM DTT Reduktion. Bei 5,8 min ist deutlich ein DTT-Peak erkennbar.

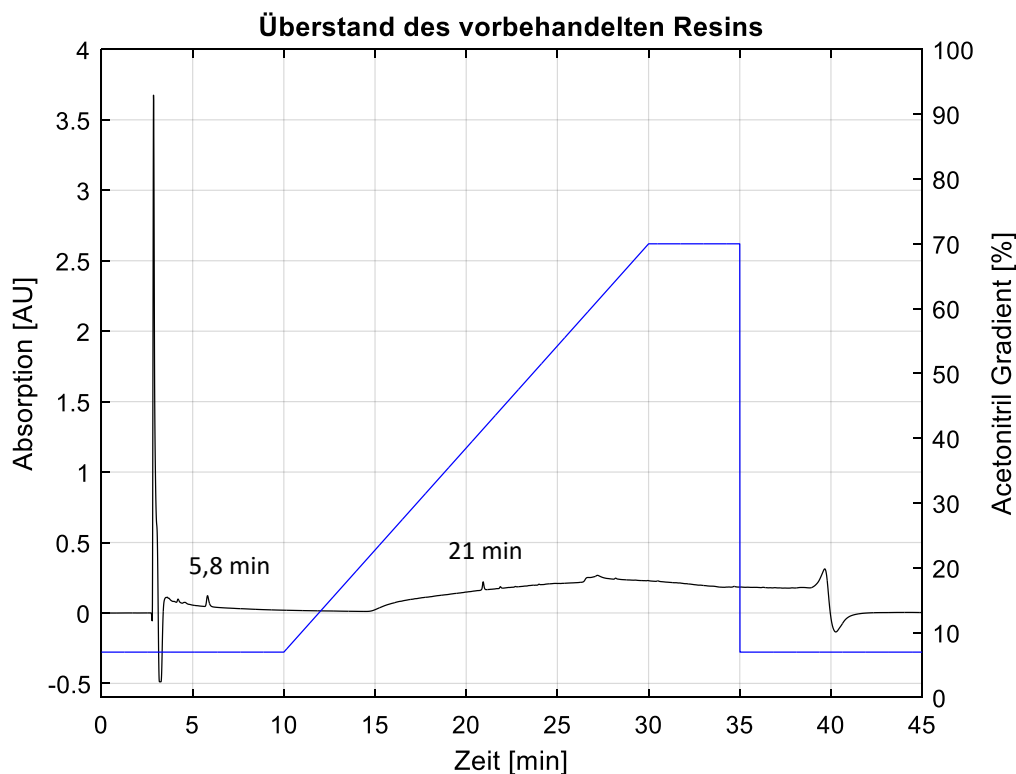


Abbildung 32: RP-HPLC Analyse vom Überstand nach der fünften Harzwäsche von DTT bei 210 nm. Die schwarze Kurve zeigt den Waschüberstand und die blaue den linearen Gradienten von Acetonitril. Aufzugebendes Volumen sind 50 μl , die Flussrate beträgt 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.6 RP-HPLC-ANALYSE DER ALK-PEPTIDE

Zum Ende dieser Arbeit wurden zum Vergleich mit den vier ALK-Derivaten zwei weitere RP-HPLC Analysen von dem ALK-NH₂ und dem nicht amidierten ALK-COOH durchgeführt. Deren Retentionszeiten betragen 23,7 min (s. Abbildung 33).

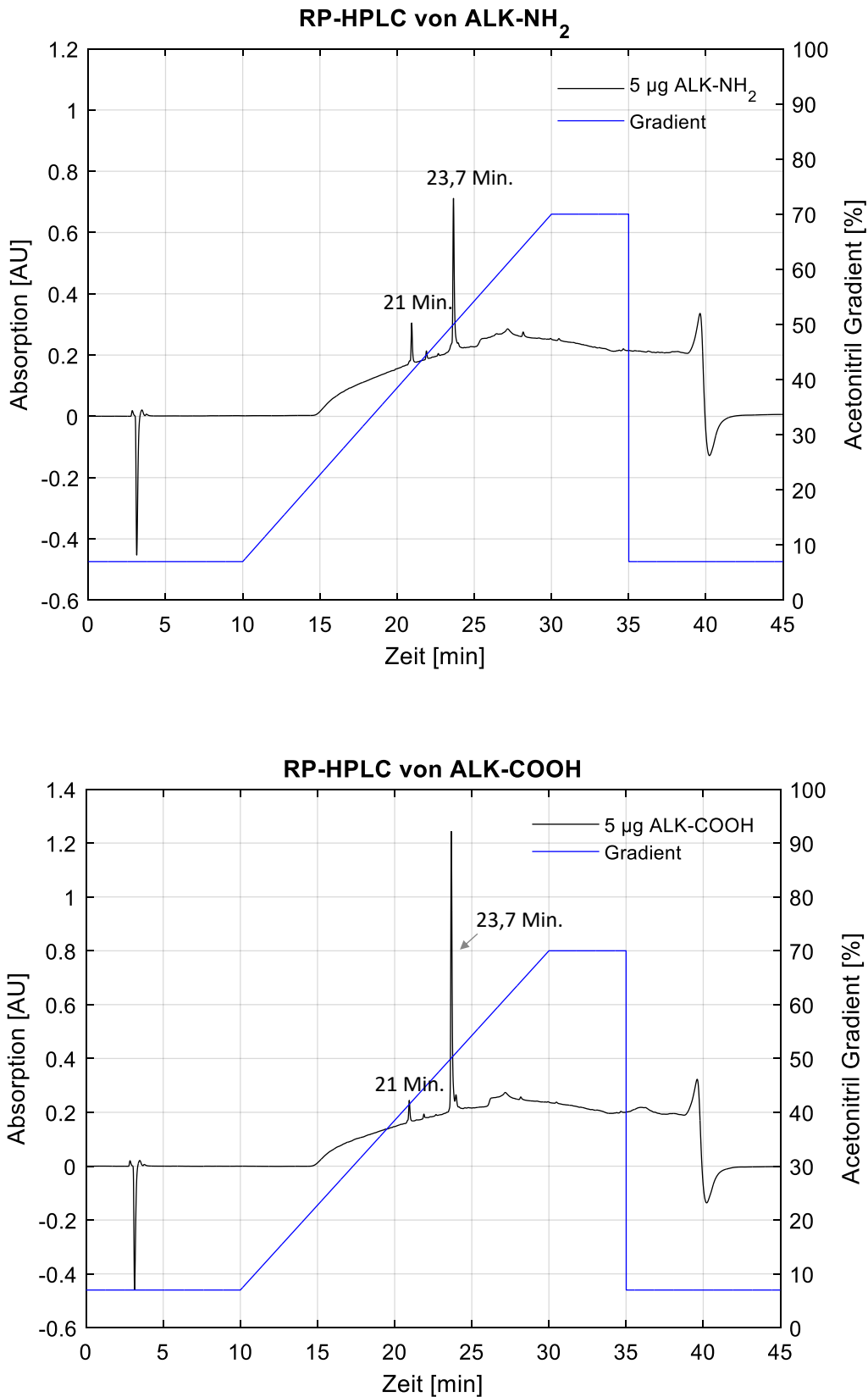


Abbildung 33: RP-HPLC Analyse von 5 µg ALK-NH₂ (oben) bzw. ALK-COOH (unten) bei 210 nm. Die schwarze Kurve zeigt das Peptid und die blaue den linearen Gradientenverlauf von dem Acetonitril. Aufzugebendes Volumen sind 50 µl, die Flussrate beträgt 1 ml·min⁻¹.

Die nachfolgenden Tabelle 21 fasst die Retentionszeiten und Hydrophobizitäten aller ALK-Peptide zusammen.

Tabelle 21: Eine Übersicht der Retentionszeiten aus der RP-HPLC-Analyse und der Hydrophobizitäten der ALK-Peptide.

Peptid	Retentionszeit [min]	H
ALK-NH₂	23,7	-0,270
ALK-OH	23,7	-0,270
N28-ALK	24,1	-0,250
ALK-28C	23,7	-0,250
N33-ALK	24,4	-0,179
ALK-33C	23,5	-0,179

5 DISKUSSION

Die Aktivitätsvergleiche der NK-2- und ALK-Peptide unterschiedlicher Hersteller im Agardiffusionstest und im Mikrodilutionstest, zeigen gute Übereinstimmung mit dem Testorganismus *E. coli* WBB01.

Bei den ADT-Ergebnissen sollte jedoch das Diffusionsverhalten in Betracht gezogen werden. Obwohl die stärkste antimikrobielle Aktivität von C7A und die schwächste Aktivität von M11L zu verzeichnen ist, könnte es ebenso durch die bessere Diffusionsfähigkeit von C7A bzw. durch das schlechtere Diffusionsverhalten von M11L verursacht worden sein.

Der Vergleich mit den MDT-Ergebnissen von C7A und M11L kann dagegen diesen starken Aktivitätsunterschied nicht bestätigen. Die MIC-Ergebnisse der beiden Peptide unterscheiden sich um eine Verdünnungsstufe und befinden sich somit in der Streuweite dieser Methode. Dennoch kann eine stärkere Aktivität von C7A nicht ausgeschlossen werden. Gleichzeitig liegt auch die Vermutung nahe, dass das C7A eine bessere Diffusionsfähigkeit als das M11L besitzt. Dies würde erklären, warum das ALK-OH geringere Hemmhoflächen als das C7A aufweist, obwohl es im MDT die stärkste Aktivität zeigt. Damit können die größeren Hemmhoflächen von C7A ebenso durch das bessere Diffusionsvermögen erklärt werden. Eine Erklärung auf Grund der Hydrophobizitäten in Abbildung 18 kann durch die geringen Unterschiede zwischen C7A und M11L in Bezug auf das Diffusionsverhalten nicht gewonnen werden.

Eine nähere Betrachtung der ALK-Peptide zeigt ein überraschendes Ergebnis. Die Amidierung am C-Terminus bringt eine Abschwächung der Aktivität mit sich. Anscheinend ist der Einfluss des C-Terminus bzw. die negative Ladung für die Aktivität der α -helikalen Struktur bedeutend, denn sowohl im ADT als auch im MDT zeigt das einzige am C-Terminus nicht amidierete ALK-OH die zweitstärkste bzw. die stärkste Aktivität. Zwei weitere Beispiele bestätigen diese These. Der Austausch von Asparaginsäure durch Lysin beim D21K am Ende der Sequenz und die damit einhergehende Erhöhung der positiven Ladung von +10 auf +12 bringt weder beim

ADT noch beim MDT eine Aktivitätssteigerung mit sich und bestätigt ebenfalls die Tatsache, dass die Aktivität der Peptide nicht nur von der Ladung abhängig ist. Vielmehr ist die antimikrobielle Aktivität von einer Mischung der minimalen kationischen Ladung mit einem stark amphipathischen Sequenzabschnitt abhängig (Andrä et al., 2007). Auch die Modifizierungen am C-Terminus am Beispiel von ALK-28C und ALK-33C zeigen kleinere Hemmhoflächen als die Modifizierung am N-Terminus bei den N28-ALK und N33-ALK im Agardiffusionstest. Damit wirken sich die Veränderungen am C-Terminus insgesamt negativ auf die Aktivität der Peptide aus. Im MDT konnten diese feineren Aktivitätsunterschiede der zuletzt genannten Peptide nicht dargestellt werden. Der Grund dafür könnte in der Methodik und/oder dem verteidigungsschwachen Testorganismus *E. Coli* WBB01 liegen. Schließlich werden im MDT nur die Ergebnisse der Verdünnungsstufen und keine Zwischenwerte erfasst.

Insgesamt sind die Ergebnisse der Peptide im MDT unter der Berücksichtigung der Streuweite von einer Verdünnungsstufe ziemlich ähnlich. Ebenso konnten die verschiedenen Pufferbedingungen keinen signifikanten Unterschied der antimikrobiellen Aktivität darstellen. Theoretisch wirkt sich der Salzanteil im HEPES-Puffer ausgleichend auf die Ladung der kationischen Peptide aus und sollte zum Absinken der Aktivität führen. In der Praxis konnten jedoch diese Aktivitätsunterschiede durch den Salzanteil nicht bestätigt werden. Diese Beobachtung wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Sowohl die Resultate von Qi et al. als auch die Vergleichswerte von NK-2, C7A-D21K, ALK-OH und ALK-NH₂ (Forschungszentrums Borstel) konnten keinen nennenswerten Unterschied in den MIC-Werten mit und ohne 150 mM NaCl feststellen (Qi et al., 2011; K. Stephan, 2015). Die ähnlichen Ergebnisse könnten sich ebenfalls durch den relativ abwehrschwachen Mikroorganismus *E. coli* WBB01 begründen lassen. Obwohl diese Resultate erste gute Erkenntnisse liefern, müssten sie dennoch durch weitere Versuche mit anderen Bakterienstämmen verglichen werden. Ein möglicher Stamm könnte der von anderen Forscherteams oft verwendete *Staphylococcus aureus* sein (Andrä et al. 2011; Appendini und Hotchkiss, 2001; Cole et al., 2010).

TRICIN-SDS-PAGE ANALYSE

Bei der Tricin-SDS-PAGE Analyse ist auffällig, dass die reduzierten Peptide trotz ihres kleineren Molekulargewichts von 3,2 kDa und 3,6 kDa ungefähr bei 10 kDa zu hoch

laufen. Vermutlich schafft das negativ geladene SDS-PAGE-Gel nicht die stark positive Eigenladung der Peptide zu überdecken. Damit bleiben die Peptide noch geladen und werden nicht exakt nach ihrer Größe getrennt. Die nicht reduzierten antimikrobiellen Peptide laufen dabei noch höher als 10 kDa. Dies liegt an der Ausbildung der Oligomere und der damit einhergehenden Zunahme der Größe.

IMMOBILISIERUNG AUF POLYSTYROL

Das ungehinderte bakterielle Wachstum bei der Immobilisierung der antimikrobiellen Peptide auf einer Mikrotiterplatte mit Polystyroloberfläche könnte als mögliche Ursache eine unzureichende Konzentration der Peptide von $128 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ haben. Laut Bagheri et al. konnte der MIC-Wert der immobilisierten Peptide im Vergleich zu den freien Peptiden erst bei einer viel höheren Peptidkonzentration um das 100- bis 400-fache bestimmt werden (Bagheri et al., 2009). Deshalb könnten weitere Immobilisierungsversuche mit höheren Peptidkonzentrationen zum Erfolg führen. Es könnte auch hilfreich sein Proben nach der ersten Inkubation zu sammeln, um die Peptidmenge mit der Anfangsmenge zu vergleichen. Wäre die Immobilisierung erfolgreich, würde dann die Peptidmenge im Überstand abnehmen.

IMMOBILISIERUNG AUF HARZ

Das Fehlen der Peaks bei 5,8 min bei den entsalzten Proben verdeutlicht, dass die Entsalzung erfolgreich durchgeführt wurde und kein DTT mehr in den Proben vorhanden war. Dennoch sind die Immobilisierungsversuche gescheitert. Auch das Fehlen der Banden bei Ü2 bestätigt dieses Ergebnis. Würde die Immobilisierung zielführend verlaufen sein, würden die Überstände Ü1 keine und die Überstände Ü2 eine Peptidbande aufweisen. Zwar ist eine Oligomerbildung bei den Peptiden ALK-28C und ALK-33C in den Fraktionen nach der Entsalzung erkennbar, dennoch wären ausreichend Monomere für eine Kopplungsreaktion vorhanden. Zudem könnte die Lagerung die Ausbildung der Oligomere in den Fraktionsproben begünstigt haben, da die Tricin-SDS-PAGE Analyse erst am nächsten Tag oder im Falle von Experiment 1 und 2 erst eine Woche nach der Entsalzung durchgeführt wurde. Außerdem weisen die Peptide N28-ALK und N33-ALK keine Oligomerbildung auf und zeigen dennoch die gleichen Ergebnisse. Deshalb kann sowohl die Oligomerbildung als auch eine mögliche Verunreinigung mit DTT als Ursache für den Misserfolg ausgeschlossen werden.

Ebenso waren die Immobilisierungsversuche mit längeren Inkubationszeiten von 2 Tagen in den Experimenten 1 erfolglos. Auch in den Experimenten 2 konnte kein Immobilisierungserfolg verzeichnet werden. Im Experiment 2 sollte eine mögliche Oligomerbildung der Iodacetylgruppen der Harzpartikel durch die Vorbehandlung mit DTT ausgeschlossen werden, obwohl laut Hersteller die reaktiven Gruppen frei sein sollten. Jedoch konnte mit der RP-HPLC Analyse des fünften Waschüberstandes nach der Reduktion immer noch das DTT nachgewiesen werden. Würde das Kopplungsprotokoll an sich erfolgreich erprobt sein, so würde das Vorhandensein von DTT im Experiment 2 die Kopplungsreaktion verhindern.

Ein Blick auf eine andere Arbeit zeigt, dass die Immobilisierung auf Harzpartikel durchaus möglich ist. Bagheri et al. beschreibt in seiner Arbeit eine erfolgreiche chemische Kopplung von den antimikrobiellen Peptiden MK5E und KLAL über eine Oxime-Bindung und Thioalkylierung. Für die Thioalkylierung wurde dem KLAL ebenso wie bei den N28-ALK und N33-ALK am N-Terminus ein Cysteinrest für die Kopplung hinzugefügt. Der Immobilisierungserfolg war begrenzt durch die Harzoberfläche und die antimikrobielle Aktivität im MDT sank um zwei Größenordnungen im Vergleich zu den freien Peptiden. Die Kopplungsreaktion erfolgte bei Bagheri et al. ebenso wie in dieser Arbeit bei Experiment 1 über Nacht bei Raumtemperatur (Bagheri et al., 2009).

RP-HPLC-CHROMATOGRAPHIE VON ALK

Die Retentionszeiten der ALK-NH₂ und ALK-COOH sind gleich oder nahezu gleich mit den anderen ALK-Modifikationen. Die beiden Peptide haben keinen Cysteinrest in ihrer Sequenz und sind damit nicht in der Lage Oligomere zu bilden. Das zeigt sich in dem scharfen Peak beider Peptide. Die unterschiedlichen Höhen der Peaks könnten durch die Unsicherheiten in der Herstellung von Stocklösungen oder durch eine technische Störung der Anlage verursacht worden sein. Da die RP-HPLC-Anlage nicht einwandfrei funktionierte, kann eine anlagenbedingte Ursache nicht ausgeschlossen werden.

Der Vergleich der Retentionszeiten mit den Hydrophobizitäten der ALK-Peptide in Tabelle 21 zeigt keinen eindeutigen Zusammenhang. Es wäre jedoch möglich, dass die Retentionszeiten nicht exakt von der RP-HPLC Anlage erfasst worden sind bzw. anlagenbedingt gewissen Schwankungen unterworfen waren. Denn auch bei Peptiden

mit gleichen Hydrophobizitätswerten wie dem N33-ALK und dem 33C-ALK unterscheiden sich die Retentionszeiten um 0,9 min. Theoretisch sollten hydrophobere Peptide eine entsprechend längere Retentionszeit haben als die weniger hydrophoberen Peptide.

6 FAZIT UND AUSBLICK

Diese Masterarbeit befasst sich mit der Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität der Peptide und der Immobilisierung auf unterschiedlichen Oberflächen. Dabei liefern die Aktivitätstests überraschende Erkenntnisse. Es stellt sich heraus, dass die C-terminale Amidierung der Peptide mit einer Aktivitätsminderung einhergeht. Damit übertraf die antimikrobielle Aktivität des einzigen am C-Terminus nicht amidierten Peptids ALK-COOH alle anderen Peptide. Gleichzeitig konnten die mit Abstand größten Hemmflächen von C7A im Agardiffusionstest unter anderem auf die bessere Diffusionsfähigkeit zurückgeführt werden.

Weniger erfolgreich verliefen die Immobilisierungsversuche. Obwohl die Kopplungen auf eine Mikrotiterplatte aus Polystyrol und auf Harzkügelchen missglückten, bilden die Ergebnisse einen Anfang für die weitere Arbeit. Dabei bedarf es umfangreicher Untersuchungen, um die geeigneten Kopplungsbedingungen zu finden. Weitere Experimentiermöglichkeiten könnten sich mit einer alternativen Beschichtungsoberfläche, anderen Pufferbedingungen und höheren Peptidkonzentration befassen.

Eine erfolgreiche Immobilisierung würde die offenen Fragen nach der effektiveren Konstellation der Peptide mit der Immobilisierungsoberfläche beantworten. Für die weitere Forschung mit diesen Peptiden wäre wichtig zu erfahren, welche der immobilisierten Peptide in Anbetracht der Orientierung und dem Spacer die beste antimikrobielle Aktivität hätte. Außerdem wäre zu klären, wie sich die Immobilisierung auf die Ausbeute, Stabilität und Bioverfügbarkeit auswirkt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdolhosseini, M., Nandula, S. R., Song, J., Hirt, H., & Gorr, S.-U. (2012).** Lysine substitutions convert a bacterial-agglutinating peptide into a bactericidal peptide that retains anti-lipopolysaccharide activity and low hemolytic activity. *Peptides*, 35(2), 231–238.
- Andrä, J., Goldmann, T., Ernst, C. M., Peschel, A., & Gutschmann, T. (2011).** Multiple Peptide Resistance Factor (MprF)-mediated Resistance of *Staphylococcus aureus* against Antimicrobial Peptides Coincides with a Modulated Peptide Interaction with Artificial Membranes Comprising Lysyl-Phosphatidylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 18692–18700.
- Andrä, J., Jakovkin, I., Grötzinger, J., Hecht, O., Krasnosdembskaya, A. D., Goldmann, T., Gutschmann, T., & Leippe, M. (2008).** Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin. *Biochemical Journal*, 410(1), 113-122.
- Andrä, J., Koch, M. H. J., Bartels, R., & Brandenburg, K. (2004).** Biophysical Characterization of Endotoxin Inactivation by NK-2, an Antimicrobial Peptide Derived from Mammalian NK-Lysin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5), 1593–1599.
- Andrä, J., Monreal, D., Martinez de Tejada, G., Olak, C., Brezesinski, G., Gomez, S. S., Goldmann, T., Bartels, R., Brandenburg, K., & Moriyon, I. (2007).** Rationale for the design of shortened derivatives of the NK-lysin-derived antimicrobial peptide NK-2 with improved activity against Gram-negative pathogens. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(20), 14719–14728.
- Andrews, P (1964).** Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochemical Journal*. 91(2), 222-233
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2001).** Surface modification of poly(styrene) by the attachment of an antimicrobial peptid. 81, 609–616.
- Bagheri, M., Beyermann, M., & Dathe, M. (2009).** Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 1132-1141.

- Bagheri, M., Beyermann, M., & Dathe, M. (2012).** Mode of Action of Cationic Antimicrobial Peptides Defines the Tethering Position and the Efficacy of Biocidal Surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, 23(1), 66–74.
- Brogden, K. A. (2005).** Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250.
- Byrne, B., & Iwata, S. (2002).** Membrane protein complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(2), 239–243.
- Chen, C., & Lu, T. (2020).** Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. *Antibiotics*, 9(1), 24.
- Chen, J., Zhu, Y., Xiong, M., Hu, G., Zhan, J., Li, T., Wang, L., & Wang, Y. (2018).** Antimicrobial Titanium Surface via Click-Immobilization of Peptide and Its in Vitro/Vivo Activity. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 1034–1044.
- Chen, R., Willcox, M. D. P., Cole, N., Ho, K. K. K., Rasul, R., Denman, J. A., & Kumar, N. (2012).** Characterization of chemoselective surface attachment of the cationic peptide melimine and its effects on antimicrobial activity. *Acta Biomaterialia*, 8(12), 4371–4379.
- Chen, X., Hirt, H., Li, Y., Gorr, S.-U., & Aparicio, C. (2014).** Antimicrobial GL13K peptide coatings killed and ruptured the wall of *Streptococcus gordonii* and prevented formation and growth of biofilms. *PloS One*, 9(11), e111579.
- Cho, W.-M., Joshi, B. P., Cho, H., & Lee, K.-H. (2007).** Design and synthesis of novel antibacterial peptide-resin conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(21), 5772–5776.
- Cole, N., Hume, E. B. H., Vijay, A. K., Sankaridurg, P., Kumar, N., & Willcox, M. D. P. (2010).** In Vivo Performance of Melimine as an Antimicrobial Coating for Contact Lenses in Models of CLARE and CLPU. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(1), 390–395.
- Costa, F., Carvalho, I. F., Montelaro, R. C., Gomes, P., & Martins, M. C. L. (2011).** Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomaterialia*, 7(4), 1431–1440.
- Costa, F., Gomes, P., & Martins, M. C. L. (2018).** 13—Antimicrobial peptides (AMP) biomaterial coatings for tissue repair. In M. A. Barbosa & M. C. L. Martins (Hrsg.), *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair* (S. 329–345). Woodhead Publishing.

- Costa, F., Maia, S. R., Gomes, P. A., & Martins, M. C. (2015).** *Dhvar5 antimicrobial peptide (AMP) chemoselective covalent immobilization results on higher antiadherence effect than simple physical adsorption.* 531–549.
- Darouiche, R. O. (2004).** Treatment of infections associated with surgical implants. *The New England Journal of Medicine*, 350(14), 1422–1429.
- Dutta, D., Cole, N., Kumar, N., & Willcox, M. D. P. (2013).** Broad Spectrum Antimicrobial Activity of Melimine Covalently Bound to Contact Lenses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(1), 175–182.
- Eisenberg, D. (1984).** THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF MEMBRANE AND SURFACE PROTEINS. *MEMBRANE PROTEIN STRUCTURE*, 53, 595–623.
- Eisenberg, D., Weiss, R. M., & Terwilliger, T. C. (1982).** The helical hydrophobic moment: A measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, 299(5881), 371–374.
- Etienne, O., Picart, C., Taddei, C., Haikel, Y., Dimarcq, J. L., Schaaf, P., Voegel, J. C., Ogier, J. A., & Egles, C. (2004).** Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: A new approach to protection of implants from bacterial colonization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3662–3669.
- Faber, C., Stallmann, H. P., Lyaruu, D. M., Joosten, U., von Eiff, C., van Nieuw Amerongen, A., & Wuisman, P. I. J. M. (2005).** Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2438–2444.
- Fields, G. B., & Noble, R. L. (1990).** Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 35(3), 161–214.
- Füssle, R. (2010).** *Prinzipien der Antibiotikatherapie*. 36, 101–116.
- Gao, G., Lange, D., Hilpert, K., Kindrachuk, J., Zou, Y., Cheng, J. T. J., Kazemzadeh-Narbat, M., Yu, K., Wang, R., Straus, S. K., Brooks, D. E., Chew, B. H., Hancock, R. E. W., & Kizhakkedathu, J. N. (2011).** The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. *Biomaterials*, 32(16), 3899–3909.
- Gareis, M. (2006).** Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 1(4), 354–363.

- Glinel, K., Jonas, A. M., Jouenne, T., Leprince, J., Galas, L., & Huck, W. T. S. (2009).** Antibacterial and Antifouling Polymer Brushes Incorporating Antimicrobial Peptide. *Bioconjugate Chemistry*, 20(1), 71–77.
- Godoy-Gallardo, M., Mas-Moruno, C., Fernández-Calderón, M. C., Pérez-Giraldo, C., Manero, J. M., Albericio, F., Gil, F. J., & Rodríguez, D. (2014).** Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomaterialia*, 10(8), 3522–3534.
- Godoy-Gallardo, M., Wang, Z., Shen, Y., Manero, J. M., Gil, F. J., Rodriguez, D., & Haapasalo, M. (2015).** Antibacterial Coatings on Titanium Surfaces: A Comparison Study Between in Vitro Single-Species and Multispecies Biofilm. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(10), 1–22.
- Gross, S., Wilms, D., Krause, J., Brezesinski, G., & Andrä, J. (2013).** Design of NK-2-derived peptides with improved activity against equine sarcoid cells: PEPTIDE-MEDIATED KILLING OF EQUINE CANCER CELLS. *Journal of Peptide Science*, 19(10), 619–628.
- Habermann, E., & Jentsch, J. (1967).** *Sequenzanalyse des Melittins aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken*. 348(Jahresband), 37–50.
- Haynie, S. L., Crum, G. A., & Doele, B. A. (1995).** Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(2), 301–307.
- Hilpert, K., Elliott, M., Jensen, H., Kindrachuk, J., Fjell, C. D., Körner, J., Winkler, D. F. H., Weaver, L. L., Henklein, P., Ulrich, A. S., Chiang, S. H. Y., Farmer, S. W., Pante, N., Volkmer, R., & Hancock, R. E. W. (2009).** Screening and Characterization of Surface-Tethered Cationic Peptides for Antimicrobial Activity. *Chemistry & Biology*, 16(1), 58–69.
- Holmberg, K. V., Abdolhosseini, M., Li, Y., Chen, X., Gorr, S.-U., & Aparicio, C. (2013).** Bio-inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications. *Acta Biomaterialia*, 9(9), 8224–8231.
- Höpfner, A. (2002).** *Virulenz und Resistenzspektrum von Staphylococcus epidermidis im experimentellen Modell der Endophthalmitis*. PhD Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Grace Davison Discovery Sciences (2011)** *Vydac a Grace Product* (4), 1-85.

- Humblot, V., Yala, J.-F., Thebault, P., Boukerma, K., Héquet, A., Berjeaud, J.-M., & Pradier, C.-M. (2009).** The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials*, 30(21), 3503–3512.
- Ivanov, I. E., Morrison, A. E., Cobb, J. E., Fahey, C. A., & Camesano, T. A. (2012).** Creating antibacterial surfaces with the peptide chrysophsin-1. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4(11), 5891–5897.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006).** Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511.
- Lanig Harald (2012).** Hydrophobizitätsskala, RÖMPP (Online), www.roempp.thieme.de/lexicon/RD-08-03304, besucht am 07.03.2022 um 11:15
- LaPorte, D. C., Rosenthal, K. S., & Storm, D. R. (1977).** Inhibition of Escherichia coli growth and respiration by polymyxin B covalently attached to agarose beads. *Biochemistry*, 16(8), 1642–1648.
- Lehrer, R. I., Rosenman, M., Harwig, S. S. S. L., Jackson, R., & Eisenhauer, P. (1991).** Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *Journal of Immunological Methods*, 137(2), 167–173.
- Li, M., Lai, Y., Villaruz, A. E., Cha, D. J., Sturdevant, D. E., & Otto, M. (2007).** Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(22), 9469–9474.
- Li, Y., Santos, C. M., Kumar, A., Zhao, M., Lopez, A. I., Qin, G., McDermott, A. M., & Cai, C. (2011).** “Click” Immobilization on Alkylated Silicon Substrates: Model for the Study of Surface Bound Antimicrobial Peptides. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 17(9), 2656–2665.
- Liepinsh, E., Andersson, M., Ruyschaert, J. M., & Otting, G. (1997).** Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nature Structural Biology*, 4(10), 793–795.
- Lim, K., Chua, R. R. Y., Saravanan, R., Basu, A., Mishra, B., Tambyah, P. A., Ho, B., & Leong, S. S. J. (2013).** Immobilization studies of an engineered arginine-tryptophan-rich peptide on a silicone surface with antimicrobial and antibiofilm activity. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(13), 6412–6422.
- Powers, J.-P. S., & Hancock, R. E. W. (2003).** The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681–1691.

- Qi, X., Poernomo, G., Wang, K., Chen, Y., Chan-Park, M. B., Xu, R., & Chang, M. W. (2011).** Covalent immobilization of nisin on multi-walled carbon nanotubes: Superior antimicrobial and anti-biofilm properties. *Nanoscale*, 3(4), 1874–1880.
- Ramasamy, M., & Lee, J. (2016).** Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. *BioMed Research International*, 2016, 1–17.
- Rapsch, K., Bier, F. F., Tadros, M., & von Nickisch-Rosenegk, M. (2014).** Identification of antimicrobial peptides and immobilization strategy suitable for a covalent surface coating with biocompatible properties. *Bioconjugate Chemistry*, 25(2), 308–319.
- Rasul, R., Cole, N., Balasubramanian, D., Chen, R., Kumar, N., & Willcox, M. D. P. (2010).** Interaction of the antimicrobial peptide melimine with bacterial membranes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(6), 566–572.
- Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., & Sharpless, K. B. (2002).** A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective „ligation“ of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 41(14), 2596–2599.
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379.
- Schröder-Borm, H., Willumeit, R., Brandenburg, K., & Andrä, J. (2003).** Molecular basis for membrane selectivity of NK-2, a potent peptide antibiotic derived from NK-lysin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1612(2), 164–171.
- Shukla, A., Fleming, K. E., Chuang, H. F., Chau, T. M., Loose, C. R., Stephanopoulos, G. N., & Hammond, P. T. (2010).** Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces. *Biomaterials*, 31(8), 2348–2357.
- Steckbeck, J. D., Deslouches, B., & Montelaro, R. C. (2014).** Antimicrobial peptides: New drugs for bad bugs? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 14(1), 11–14.
- Steinberg, D. A., Hurst, M. A., Fujii, C. A., Kung, A. H., Ho, J. F., Cheng, F. C., Lounsbury, D. J., & Fiddes, J. C. (1997).** Protegrin-1: A broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(8), 1738–1742.

- Tan, X. W., Goh, T. W., Saraswathi, P., Nyein, C. L., Setiawan, M., Riau, A., Lakshminarayanan, R., Liu, S., Tan, D., Beuerman, R. W., & Mehta, J. S. (2014).** Effectiveness of Antimicrobial Peptide Immobilization for Preventing Perioperative Cornea Implant-Associated Bacterial Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), 5229–5238.
- Teixeira, M., Carbone, C., Sousa, M. do C., Espina, M., García, M., Sánchez-López, E., & Souto, E. B. (2020).** Nanomedicines for the Delivery of Antimicrobial Peptides (AMPs). *Nanomaterials*, 10, 1–23.
- Wadhvani, P., Heidenreich, N., Podeyn, B., Bürck, J., & Ulrich, A. S. (2017).** Antibiotic gold: Tethering of antimicrobial peptides to gold nanoparticles maintains conformational flexibility of peptides and improves trypsin susceptibility. *Biomaterials Science*, 5(4), 817–827.
- Wang, G., Mishra, B., Lau, K., Lushnikova, T., Golla, R., & Wang, X. (2015).** Antimicrobial Peptides in 2014. *Pharmaceuticals*, 8(1), 123–150.
- Wang, L., Chen, J., Cai, C., Shi, L., Liu, S., Ren, L., & Wang, Y. (2014).** Multi-biofunctionalization of a titanium surface with a mixture of peptides to achieve excellent antimicrobial activity and biocompatibility. *Journal of Materials*
- Wang, L., Chen, J., Shi, L., Shi, Z., Ren, L., & Wang, Y. (2014).** The promotion of antimicrobial activity on silicon substrates using a „click“ immobilized short peptide. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 50(8), 975–977.
- Wei, J., Ravn, D. B., Gram, L., & Kingshott, P. (2003).** Stainless steel modified with poly(ethylene glycol) can prevent protein adsorption but not bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32(4), 275–291.
- Willcox, M. D. P., Hume, E. B. H., Aliwarga, Y., Kumar, N., & Cole, N. (2008).** A novel cationic-peptide coating for the prevention of microbial colonization on contact lenses. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 1817–1825.
- Xiang, L., Peng, L., Rathi, S., Anindya, B., Biswajit, M., Suo Hon, S., Xiaodi, S., Paul Anantharajah, T., & Susanna Su Jan, L. (2014).** Antimicrobial functionalization of silicone surfaces with engineered short peptides having broad spectrum antimicrobial and salt-resistant properties. *Acta Biomaterialia*, 10(1), 258–266.
- Zasloff, M. (2002).** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–395.

8 ANHANG

A ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung der drei meist verwendeten Wirkungsmechanismen der antimikrobiellen Peptiden: (A) Barrel-Stave Modell, (B) Carpet Modell und (C) Toroidal-Poren-Modell. Die hydrophoben Teile der AMPs sind in blau und die hydrophilen in rot dargestellt. Quelle: Costa et al., 2018. 8
- Abbildung 2:** Derzeitig beobachtete Wirkungsorte von antimikrobiellen Peptiden mit der gramnegativen und der grampositiven Membran sowie mit anderen Zellbestandteilen. Die AMPs sind in rot dargestellt. (A) Ausbildung eines Membrankanals z. B. Dermicidin; (B) Ausbau einer torroidalen Pore z. B. LL-37; (C) Darstellung des Carpet Modells z. B. Piscidin; (D) rezeptorvermittelte Bindung an das membranbildende Enzym z. B. Lactococcin G; (E) Anlagerung an den Maltoserezeptor z. B. von Gravicin ML; (F) Freisetzung von Autolysin durch RTD2; (G) Inhibierung der RNA-Polymerase durch MccJ25; (H) Störung der Proteinsynthese durch Apidaecin. Definition der Abkürzungen: (OM) äußere Membran; (IM) innere Membran; (PGN) Peptidoglycan; (LTA) Lipoteichonsäure; (LPS) Lipopolysaccharide; (MLT) Maltosetransporter. Quelle: Wang et al., 2015. 10
- Abbildung 3:** Darstellung einer bakteriellen Membran (rechts) und einer multizellulären Species z. B. Oberfläche eines Erythrozyten (links), welche in Wechselwirkung mit einem AMP tritt. Quelle: Zasloff, 2002. 13
- Abbildung 4:** Verschiedene Möglichkeiten AMPs physikalisch auf ein Biomaterial zu adsorbieren. In (A) sind die AMPs in ein geladenes und in (B) geladenes und wasserabbaubares Polymer mittels Layer-by-Layer-Verfahren eingebunden. In (C) sind die AMPs physikalisch an ein Biomaterial adsorbiert und in (D) in ein ungeladenes Polymer eingegliedert. Quelle: Costa et al., 2018. 15
- Abbildung 5:** Beispiele für eine kovalente Immobilisierung von antimikrobiellen Peptiden. In (A) tragen die AMPs eine Thiolgruppe (Cystein meist als Thioldonor) für eine kovalente Bindung an Thiol-, Maleimide- oder Epoxidbasierte

- Oberfläche. In **(B)** ist die Immobilisierung mittels Huisgen Cycloaddition von Alkin-tragendem Peptid auf eine Azidbasierte Oberfläche und umgekehrt dargestellt. Quelle: Costa et al., 2011..... 20
- Abbildung 6:** Dargestellt sind zwei kovalent immobilisierte Peptide mit unterschiedlicher Amphipathizitätsverteilung in der N- und C-terminalen Orientierung. Schwarze Peptidbereiche sind hydrophob, rote kationisch..... 22
- Abbildung 7:** Agardiffusionstest nach einer Übernachtinkubation. Um die mittlere Stanzfläche sind Hemmhöfe mit Bakterienrasen von *E. coli* WBB01 entstanden. In der Mitte der Platte ist die hemmhoffreie Negativkontrolle erkennbar. 37
- Abbildung 8:** Ein Mikrodilutionstest nach einer Übernachtinkubation mit antimikrobiellen Peptiden bei 37° C mit *E. coli* WBB01 in einer Mikrotiterplatte. Die Absorptionen wurden photometrisch bei 620 nm gemessen..... 38
- Abbildung 9:** ÄKTA™ start von cytiva mit einer Probenschleife von 500 µl, einer 5 ml HiTrap™ Säule aus Sephadex™ G-25 und einer Wellenlänge von 280 nm... 42
- Abbildung 10:** Darstellung des RP-HPLC Prinzips. Sobald das Analyt die Säule erreicht, wird es an die hydrophoben Seitenketten der stationären Phase adsorbiert. Ab einer bestimmten Eluentkonzentration, verlässt das Analyt die Säule. Quelle: Handbuch Vydac®, 2011 43
- Abbildung 11:** Darstellung der Immobilisierungsreaktion eines Peptids mit der Harzkugel über eine Thioetherbindung. Quelle: Abgewandt nach der Bedienungsanleitung von Thermo Scientific SulfoLink® Coupling Resin..... 46
- Abbildung 12:** Schrittweise Skizze der Vorbereitung und Durchführung der Kopplung. Die Schritte Koppeln bis Waschen mit Waschlösung sind aus der Bedienungsanleitung des Herstellers ThermoFischer scientific www.thermofisher.com 24.11.2021, 15:30 entnommen..... 49
- Abbildung 13:** Das Ausgangspeptid NK-2 und seine Modifikationen ALK, N28-ALK, N33-ALK, ALK-28C, ALK-33C sind mit der Verteilung der Hydrophobizität nach dem *Eisenberg consensus scale* dargestellt. Die Fenstergröße beträgt 7. Quelle: www.expasy.org/resources/protscale aufgerufen am 24. Nov. 2021, 13:31..... 52
- Abbildung 14:** Ein Vergleich der NK-2- Peptide von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem Testorganismus *E. coli* WBB01. Das FB steht für den Peptidhersteller Forschungszentrum Borstel und das PG für die Firma ProteoGenix. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar. 53

- Abbildung 15:** Ein Vergleich der ALK-NH₂-Peptide von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem Testorganismus *E. coli* WBB01. Das FB steht für den Peptidhersteller Forschungszentrum Borstel und das PG für die Firma ProteoGenix. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar. 54
- Abbildung 16:** Graphische Illustration der antimikrobiellen Aktivität von NK-2 und seinen Derivaten ALK-NH₂ und I2W sowie dem Melittin von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem *E. coli* WBB01. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar. 55
- Abbildung 17:** Darstellung von NK-2 und seinen 6 Derivaten: ALK-NH₂, C7A, D21K, D21L, M11L, C7A-D21K und NK-11 von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem Testorganismus *E. coli* WBB01. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar. 56
- Abbildung 18:** Die Verteilung der Hydrophobizitäten von NK-2 und seinen Derivaten C7A, M11L, D21K, D21L und ALK-NH₂. Dargestellt mit dem Onlinetool ProtScale nach *Eisenberg consensus scala*. Die Fenstergröße beträgt 7. Quelle: www.expasy.org/resources/protscale aufgerufen am 12.01.22 um 17:30 57
- Abbildung 19:** Darstellung der Aktivität eines nicht amidierten ALK-OH im Vergleich zu dem Ursprungspeptid NK-2 sowie dem am C-Terminus amidierten ALK-NH₂. Messwerte stammen aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem Testorganismus *E. coli* WBB01. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar. 58
- Abbildung 20:** Der Verlauf der Hemmhoflächen von ALK und der 4 Immobilisierungspeptide: N28-ALK, N33-ALK, ALK-28C und ALK-33C von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem *E. coli* WBB01. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung dar. 59
- Abbildung 21:** Vergleich der Hemmhoflächen aller aktiven Peptide in der Mengen 0,05 µg und 0,5 µg von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung mit dem *E. coli* WBB01. 60
- Abbildung 22:** Tricin-SDS-PAGE von NK-2 sowie seinen ALK-Derivaten in den Peptidmengen 1 µg und 2 µg. Im oberen Gel sind die Peptide in ihrer unbehandelten Form dargestellt, während im unteren Gel die Peptide vor der Auftragung in 0,5 M DTT reduziert wurden. 62

- Abbildung 23:** Tricin-SDS-PAGE Verdünnungsreihe von ALK-28C in den Peptidmengen von 0,01 µg bis 3 µg. Das ALK-28C ist ebenfalls in seiner reduzierten Form abgebildet. 63
- Abbildung 24:** SEC-Analyse von 0,5 mg N28-ALK (oben) bzw. ALK-28C (unten). Die roten Balken bei 1,7 ml und 3,2 ml zeigen den gesammelten Fraktionsausschnitt. Die Anlage wurde bei 280 nm mit dem Kopplungspuffer und einer Flussrate von 1 ml·min⁻¹ betrieben. 65
- Abbildung 25:** SEC-Analyse von 0,5 mg N33-ALK (oben) bzw. ALK-33C (unten). Die roten Balken bei 1,7 ml bzw. 1,8 ml und 3,2 ml bzw. 3,3 ml zeigen die gesammelte Fraktion. Die Anlage wurde bei 280 nm mit dem Kopplungspuffer und einer Flussrate von 1 ml·min⁻¹ betrieben..... 66
- Abbildung 26:** SEC-Analyse von der Negativkontrolle. Die roten Balken bei 1,7 ml und 3,3 ml zeigen den gesammelten Fraktionsausschnitt. Die Anlage wurde bei 280 nm mit dem Kopplungspuffer und einer Flussrate von 1 ml·min⁻¹ betrieben. 67
- Abbildung 27:** RP-HPLC Analyse von je 5 µg N28-ALK (oben) und ALK-28C (unten) bei 210 nm. Die schwarze Kurve zeigt das Peptid vor, die rote nach der Entsalzung und die blaue den linearen Gradientenverlauf von Acetonitril. Aufzugebendes Volumen sind 50 µl, die Flussrate beträgt 1 ml·min⁻¹..... 68
- Abbildung 28:** RP-HPLC Analyse von 5 µg N33-ALK (oben) bzw. ALK-33C (unten) bei 210 nm. Die schwarze Kurve zeigt das Peptid vor, die rote nach der Entsalzung und die blaue den linearen Gradientenverlauf von Acetonitril. Aufzugebendes Volumen sind 50 µl, die Flussrate beträgt 1 ml·min⁻¹..... 69
- Abbildung 29:** RP-HPLC Analyse von der Negativkontrolle bei 210 nm. Die schwarze Kurve zeigt das Peptid vor, die rote nach der Entsalzung mit der SEC (ÄKTA™ start) und die blaue den linearen Gradientenverlauf von Acetonitril.. Aufzugebendes Volumen sind 50 µl, die Flussrate beträgt 1 ml·min⁻¹..... 70
- Abbildung 30:** Tricin-SDS-PAGE von der ersten Harzkopplung. Die Fraktionen nach der Entsalzung wurden mit „Frakt.“ abgekürzt. Der Überstand 1 (Ü1) entstand direkt nach der Kopplungsreaktion und Überstand 2 (Ü2) nach der Reduktion mit 10 mM DTT der an Harz „gekoppelten“ Peptide. 71
- Abbildung 31:** Tricin-SDS-PAGE von N28-ALK und ALK-28C (oben) und N33-ALK und ALK-33C (unten) im Immobilisierungsexperiment 1 und 2. Der Überstand Ü1 entspricht dem ersten Überstand, welches direkt nach der Kopplungsreaktion

entnommen wurde. Die Überstände Ü2 wurden nach der Reduktion der gekoppelten Peptide entnommen. 72

Abbildung 32: RP-HPLC Analyse vom Überstand nach der fünften Harzwäsche von DTT bei 210 nm. Die schwarze Kurve zeigt den Probenüberstand und die blaue den linearen Gradienten von Acetonitril. Aufzugebendes Volumen sind 50 µl, die Flussrate beträgt 1 ml·min⁻¹..... 73

Abbildung 33: RP-HPLC Analyse von 5 µg ALK-NH₂ (oben) bzw. ALK-COOH (unten) bei 210 nm. Die schwarze Kurve zeigt das Peptid und die blaue den linearen Gradientenverlauf von dem Acetonitril. Aufzugebendes Volumen sind 50 µl, die Flussrate beträgt 1 ml·min⁻¹. 74

B TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte und deren Hersteller	28
Tabelle 2: Auflistung der Chemikalien mit den Angaben zum Hersteller und Charge	29
Tabelle 3: Auflistung der Materialien mit Herstellerangaben	31
Tabelle 4: Auflistung der getesteten Peptide mit dem Einbuchstabencode und der Chargennummer. Die Peptide NK-2 und ALK wurden von zwei unterschiedlichen Herstellern bezogen. Forschungszentrum Borstel wurde mit „FB“ abgekürzt. Alle Peptide außer ALK-OH haben einen amidierten C-Terminus. Der rote Buchstabe signalisiert den Austausch einer AS verglichen mit der Leitsequenz NK-2.....	33
Tabelle 5: LB-Medium: Herstellung von 1 l.....	39
Tabelle 6: HEPES Puffer mit und ohne NaCl: Herstellung von 1 l, pH 7,0	39
Tabelle 7: Probenvorbereitung reduzierter und nicht reduzierter Proben.....	40
Tabelle 8: Probenpuffer für Tricin-SDS-PAGE für 50 ml	40
Tabelle 9: Laufpuffer (10x) für die Tricin-SDS-PAGE, pH-Wert 8,3, Volumen 500 ml	41
Tabelle 10: Fixierlösung (500 ml) für die Tricin-SDS-PAGE Gele, pH-Wert 8,5.....	41
Tabelle 11: Coomassie-Färbelösung, für 500 ml.....	41
Tabelle 12: Entfärbelösung für 1l.....	41
Tabelle 13: Einstellparameter für den RP-HPLC-Lauf.....	44
Tabelle 14: RP-HPLC-Methode mit dem Zeitplan und den verwendeten Lösungen	44
Tabelle 15: Kopplungspuffer: Herstellung von 1 l mit pH 8,5.....	47
Tabelle 16: Löschreagenz: Herstellung von 15 ml im Kopplungspuffer	47
Tabelle 17: Waschpuffer: Herstellung von 100 ml	47
Tabelle 18: Auflistung der Aminosäureanzahl, der Ladung und des hydrophoben Moments sowie der Vergleich von Molekulargewicht und der durchschnittlichen Hydrophobizität nach der SeqAPP und dem Onlinetool ProtParam von ExPASy. Je negativer die durchschnittliche Hydrophobizität ist, desto hydrophiler ist die Summe der AS. In dem Auswahlbereich der SeqApp wurde eine Fenstergröße von 7 und eine α -helikalen Sekundärstruktur eingestellt. Quelle: https://www.expasy.org/resources/protparam aufgerufen am 24. Nov. 2021, 12:39	51

Tabelle 19: Werte der minimalen Inhibierungskonzentration von 17 Peptiden von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Analyse wurde mit und ohne 150 mM NaCl im HEPES-Puffer mit dem Mikroorganismus <i>E. coli</i> WBB01 bei einer Inkubation über Nacht bei 37° C durchgeführt.	61
Tabelle 20: Ergebnisse der minimalen Inhibierungskonzentration von dem Immobilisierungsversuch auf eine Polystyroloberfläche. Die Analyse erfolgte in HEPES-Puffer bei einer maximalen Peptidkonzentration von 128 µg·ml ⁻¹ mit dem Mikroorganismus <i>E. coli</i> WBB01.	64
Tabelle 21: Eine Übersicht der Retentionszeiten aus der RP-HPLC-Analyse und der Hydrophobizitäten der ALK-Peptide.	75
Tabelle 22: Alle Werte der minimalen Inhibierungskonzentration von 17 Peptiden in drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Analyse wurde in HEPES-Puffer mit 150 mM NaCl und ohne Salz mit dem Mikroorganismus <i>E. coli</i> WBB01 durchgeführt.	viii

C. MIC-Werte

Tabelle 22: Alle Werte der minimalen Inhibierungskonzentration von 17 Peptiden in drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Analyse wurde in HEPES-Puffer mit 150 mM NaCl und ohne Salz mit dem Mikroorganismus *E. coli* WBB01 durchgeführt.

Peptid	MIC-Wert in µg/ml In HEPES			MIC-Wert in µg/ml In HEPES + 150 mM NaCl		
NK-2 (FB)	4	4	8	4	8	4
NK-2 (PG)	8	8	16	8	8	8
NK-11	>64	>64	>64	>64	>64	>64
I2W	4	4	8	8	8	16
C7A	4	4	4	4	4	4
M11L	4	8	8	4	4	8
D21K	4	4	4	8	8	8
D21L	4	8	8	4	4	4
C7A-D21K	4	4	4	4	4	4
ALK-NH₂ (FB)	4	4	4	4	4	4
ALK-NH₂ (PG)	4	4	8	8	8	8
ALK-OH	2	2	4	2	2	4
N28-ALK	4	4	4	4	4	4
ALK-28C	4	4	4	4	4	4
N33-ALK	4	4	4	4	4	4
ALK-33C	4	4	4	4	4	4
Melittin	4	4	8	8	8	8

D. MATLAB CODE

Dieser Code wurde zur graphischen Darstellung der RP-HPLC-Chromatogramme verwendet.

```
clc, clear all, close all

clear ES_list

Data28Cvor = ['C:\Users\abb214\Desktop\Marina\ÄKTA3\28C_vor_ÄKTA3_5µg.CDF'];

DataGradient=
readmatrix('C:\Users\abb214\Desktop\Marina\ÄKTA3\Elutionsgradient2.txt');

Name3 = ncreadatt(Data28Cvor, '/', 'sample_name'); % Einlesen von Attributen
z. B. Name, Sprache

ncdisp('C:\Users\abb214\Desktop\Marina\ÄKTA3\28C_vor_ÄKTA3_5µg.CDF')

Cm28Cvor(:,1) = 0:0.4:2700; % Erzeugung der Zeitachse:
Schrittweite = 0.4 = Zeit(s)/Zeileneinträge

CmGradient(:,1) = 0:0.01:45;

Cm28Cvor(:,2)=
ncread('C:\Users\abb214\Desktop\Marina\ÄKTA3\28C_vor_ÄKTA3_5µg.CDF',
'ordinate_values');

CmGradient(:,2)= DataGradient(:,2);

figure(1)
hold on
yyaxis left
p1 = plot(Cm28Cvor(:,1)./60,Cm28Cvor(:,2),'k')
hold off
xlabel('Zeit [min]')
ylabel('Absorption [AU]','color','k')
title('28C-ALK')
axis([0 45 -0.6 1])

yyaxis right
p2 = plot(CmGradient(:,1),CmGradient(:,2),'r')
ylabel('Acetonitril Gradient [%]','color','k')
axis([0 45 0 100])
legend([p1 p2],{'5 µg ALK-28C','Gradient'})
legend('boxoff')
grid on
```

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit mit dem Titel „Thioether-basierte Immobilisierung und Charakterisierung von NK-Lysin-basierten antimikrobiellen Peptiden“ ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel, einschließlich elektronischer Quellen verwendet habe. Alle Stellen der Arbeit, die ich anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen habe, sind kenntlich gemacht. Dies gilt auch für Zeichnungen, Skizzen, bildlichen Darstellungen und dergleichen. Die Arbeit ist von mir in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht eingereicht worden.

Hamburg, 11. März 2022

Marina Lesniewski