

Bachelorthesis

Untersuchungen zur Immobilisierung von cysteinhaltigen Peptidantibiotika CK33 und Aspidasept an Agarosebeads

Eingereicht von: Sara Jashari



Abgabedatum: 29.08.2024

- 1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Jörg Andrä**
- 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Sezai Çiçek**

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Department Biotechnologie

Danksagung

Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. Jörg Andrä, meinen tiefsten Dank aussprechen. Durch seine Unterstützung, seinen fachkundigen Rat und seine Motivation wurde diese Arbeit erfolgreich abgeschlossen.

Ebenso möchte ich meiner Kommilitonin, Eunice Poku, herzlich danken. Sie hat mir die Methoden beigebracht und stand mir stets mit wertvollen Tipps zur Seite.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Florian Schiffel, der mich tatkräftig bei den Mikrodilutionstests unterstützt hat und auf diese Weise einen wichtigen Beitrag zu meiner Forschung geleistet hat.

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielle Peptide
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion (engl.: attenuated total reflection)
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Desoxyribonucleic acid)
DTT	1,4-Dithiothreitol
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
IR-Spektroskopie	Infrarotspektroskopie
MIC	Minimale Inhibierungskonzentration (engl.: Minimal Inhibitory Concentration)
PEG	Polyethylenglykol
RP-HPLC	Umkehrphasen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)
rpm	Umdrehung pro Minute (engl.: revolutions per minute)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl) phosphine-Hydrochlorid
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure

Kurzfassung

Medizinische Geräte haben eine lebenswichtige Bedeutung in unserer Gesellschaft. Um die Anhaftung von Mikroorganismen auf medizinische Geräte und Implantate zu verhindern, werden oft Antibiotika verwendet. Das bildet jedoch Resistenzen und steigert die Entwicklung von multiresistenten Stämmen. Deswegen ist es für Wissenschaftler äußerst wichtig neue Therapiemöglichkeiten zu forschen. Eine vielversprechende Strategie zum Ersatz von Antibiotika ist die Immobilisierung von antimikrobiellen Peptiden ans Harz (Riool et al., 2017).

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Kopplung mittels Iodacetylbindung von NK-2 abgeleiteten antimikrobiellen Peptide CK33 und Aspidasept an Harz. Für die Immobilisierung werden freie Sulfhydrylgruppen benötigt, deshalb wurden für jedes Peptid Versuche mit zwei unterschiedlichen Reduktionsmitteln durchgeführt.

Nach verschiedenen Kopplungsversuchen mit unterschiedlichen Kombinationen von der Drehzahl im Thermomixer, der Menge des verwendeten Harzes sowie Inkubationszeiten, wurde eine erfolgreiche Kopplung nachgewiesen. Hierbei wurde ein CK33-Harzsuspension-Verhältnis von 1:5, eine Schüttelzeit von zwei Stunden und Drehzahl von 1110 rpm im Thermomixer verwendet. Die erfolgreiche Kopplung wurde mittels SDS-PAGE Methode nachgewiesen. Als weitere Nachweismethoden wurden die Infrarotspektroskopie und der Mikrodilutionstest untersucht. Diese erwiesen sich jedoch im Rahmen dieser Arbeit als nicht geeignet. Mit dem Mikrodilutionstest wurde die minimale Inhibierungskonzentration MIC von den Peptiden CK33 und NK-2 bestimmt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Antimikrobielle Peptide	2
2.1 Struktur und Wirkungsweise.....	2
2.2 Selektivität von AMP.....	5
2.3 NK-2, CK33 und Aspidasept®	5
2.4 Immobilisierung	7
2.4.1 Physikalische Immobilisierung	7
2.4.2 Chemische Immobilisierung	9
2.5 Cross-Linking und PEG	11
2.6 Vergleich von immobilisierten und gelösten Peptiden	13
3. Theoretische Grundlagen der angewendeten Methoden	14
3.1 Tricin-SDS-PAGE.....	14
3.2 ATR-FTIR-Infrarotspektroskopie	14
3.3 Mikrodilutionstest.....	16
4. Materialien und Methoden	17
4.1 Materialien	17
4.2 Geräte	18
4.3 Chemikalien	19
4.4 Antimikrobielle Peptide und Enzyme.....	20
4.5 Tricin SDS-PAGE	20
4.6 Kopplung.....	23
4.7 Infrarotspektroskopie.....	26
4.8 Mikrodilutionstest.....	27
5. Ergebnisse	29
5.1 Reduktion der Peptide CK33 und Aspidasept mittels DTT und TCEP und Bestimmung der Nachweisgrenze durch SDS-PAGE	29
5.2 Kopplung.....	34
5.3 Einfluss von 0,01 % TFA auf die Kopplung.....	38
5.4 Charakterisierung der Peptidbindungen mittels Infrarotspektroskopie und Mikrodilutionstest	40
5.4.1 Infrarotspektroskopie.....	40
5.4.2 Mikrodilutionstest	41
6. Diskussion	43
7. Fazit und Ausblick	47

8. Literaturverzeichnis	48
9. ANHANG	53

1. Einleitung

Mit der alternden Gesellschaft steigt der Bedarf an medizinischen Geräten, die dazu beitragen, körperliche Funktionen zu unterstützen und die Qualität des Lebens zu verbessern. Obwohl die Geräte wie Kathetern, künstlichen Herzklappen, Gelenkprothesen und anderen Implantaten durch neue Techniken kontinuierlich optimiert werden, stellen biomaterialassoziierte Infektionen in der Medizin immer noch ein großes Problem dar und betreffen Millionen von Menschenleben. Je nach Gerätetyp und wo sie angewendet werden, können verschiedene Bakterien, die häufig aus der Krankenhausumgebung kommen, wie z. B. *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* oder Pilzen und Algen auf die Oberfläche der Geräte anhaften und einen Biofilm ausbilden. Diese Biofilme haben bestimmte Schutz- und Kommunikationsmechanismen, was sie sehr schwer zu entfernen macht. Sie können zu erheblichen gesundheitlichen Problemen führen (Riool et al., 2017).

Zur Bekämpfung von Bakterien auf Implantaten und biomedizinischen Geräten werden oft konventionelle Antibiotikabehandlungen eingesetzt. Ihre Effektivität ist jedoch in den letzten Jahren durch den erhöhten Antibiotikaverbrauch und die Entwicklung von multiresistenten Bakterien gesunken. Oft bleibt das Entfernen der Implantate als einzige Option, um die Infektion zu bekämpfen. Deswegen besteht ein dringender Bedarf an Strategien zur Prävention und Bekämpfung von biomaterialassoziierten Infektionen (Chen und Lu, 2020).

Eine alternative vielversprechende Strategie wäre die Beschichtung der Geräteoberflächen mit antimikrobiellen Peptiden AMP. Diese Peptide haben ein großes Potenzial als Antiinfektiva und wirken vorbeugend, indem sie die Bildung von Biofilmen in ihren frühen Stadien verhindern. Synthetische antimikrobielle Peptide wirken gegen ein breites Spektrum antibiotikaresistente Bakterien und Biofilmen. Darüber hinaus ist es weniger wahrscheinlich, dass die Bakterien dagegen Resistenzen entwickeln (Nicolas et al., 2021; Riool et al., 2017).

Ziel dieser Arbeit ist es, die Disulfidbrücken von CK33 und Aspidasept zu reduzieren und diese Peptide über ihre Cysteinreste an ein Polymerharz zu koppeln. Zusätzlich befasst sich diese Arbeit mit der Charakterisierung der antimikrobiellen Peptide. Die Charakterisierung umfasst sowohl den Nachweis der erfolgreichen Bindung als auch die Untersuchung ihrer antimikrobiellen Aktivität. Als Nachweismethoden werden Tricin-SDS-PAGE, Infrarotspektroskopie und Mikrodilutionstest untersucht.

2. Antimikrobielle Peptide

Die antimikrobielle Peptide AMP wurden erstmals in den 1980 Jahren aus der Froschart *Xenopus laevis* isoliert, wobei beobachtet wurde, wie ein kationisches AMP die bakterielle Zellmembran von Mikroben zerstören konnte. AMP kommen in vielen Verteidigungsmechanismen von verschiedenen Organismen vor und sind kurze amphiphile Peptide, die in der Regel aus 12 bis 100 Aminosäuren bestehen. Sie haben unter anderem antibakterielle, antivirale, antimykotische, antiparasitäre, krebshemmende, antioxidative oder sogar wundheilende Eigenschaften (Nicolas et al., 2021). Heutzutage werden natürlich vorkommende AMP als Designvorlagen für viele synthetische AMP verwendet (Riool et al., 2017). Das Ziel der Wissenschaftler ist die Gewinnung von sicheren AMP, die eine geringe Toxizität und starke Wirksamkeit zeigen (Luo und Song, 2021).

2.1 Struktur und Wirkungsweise

Ein Hauptmerkmal, wonach die antimikrobiellen Peptide kategorisiert werden, ist ihre sekundäre Struktur. Dabei werden die AMP in vier Gruppen eingeteilt (Nicolas et al., 2021):

1- α -helikale Peptide, die nur aus einer Helix bestehen.

2- β -Faltblattstrukturen, wenn die Struktur mindestens ein Paar Zweistränge enthält.

3- $\alpha\beta$ für Peptide, die beiden Strukturtypen aufweisen.

4- nicht- $\alpha\beta$ oder die sogenannten erweiterten Peptide, wenn keine der Strukturen vorhanden ist.

Die meisten AMP haben eine kationische und amphipathische Natur, deshalb interagieren sie mit der Membran von Bakterien oder Pilzen und zerstören ihre Struktur (Pasupuleti, Schmidtchen und Malmsten, 2012; Singh et al., 2023). Diese Membranen sind negativ geladen und enthalten Lipopolysacchariden und Lipoteichonsäure. Zwischen der negativ geladenen Membran und dem positiv geladenen Anteil von Peptiden kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen. Gleichzeitig interagieren die hydrophoben Teile der Peptide mit der Lipiddoppelschicht der Membran. Diese Wechselwirkungen können unterschiedlich erfolgen

und werden anhand der folgenden Modelle illustriert (Bellotti und Remelli, 2022; Wu et al., 1999).

Barrel-Staff-Modell

Monomere Peptidmoleküle lagern auf dem hydrophoben Membrankern und bilden zusammen Oligomere. Die hydrophoben Bereiche der Peptide sind dem Lipidkern zugewandt, während die hydrophilen Bereiche zur Innenseite zeigen und somit einen Kanal bilden. Das verursacht einen Verlust des Cytoplasmas und die Zerstörung der Membran (Luo und Song, 2021; Bellotti und Remelli, 2022).

Das Carpet-Modell

Die kationischen AMP interagieren mit den negativ geladenen Phospholipiden von der Membran und bilden in ihrer äußeren Schicht eine teppichähnliche Struktur. Sobald die AMP eine Schwellenkonzentration erreicht haben, ändern die Peptidmoleküle zusammen mit den Phospholipiden ihre Richtung und bilden Mizellen ähnlich wie bei einem Detergens. Somit wird die Struktur der Zellmembran zerstört (Luo und Song, 2021; Huan et al., 2020).

Toroidal-Poren-Modell

Im toroidalen Modell oder auch sogenannten Wurmlochmodell, veranlassen die antimikrobiellen Peptide die Phospholipidschichtmoleküle nach innen zu biegen. Es entsteht eine Pore, wobei der Lipiddoppelschichtkopf auf der Innenseite der Pore angeordnet ist (Nicolas et al., 2021).

Sonstige Wirkmechanismen

Die antimikrobiellen Peptide wirken nicht nur auf die Membran, sondern auch intrazellulär. Diese nicht lytische AMP können an Nukleinsäuren und Proteine binden, den Prozess der Replikation, Transkription und Translation hemmen, Organellen zerstören oder das Enzymsystem beeinflussen. Ihr Ziel ist es, den Energiestoffwechsel oder den Zellzyklus zu verhindern. Manche AMP weisen mehr als einen Wirkungsmechanismus auf. Sie können sowohl auf die Membran als auch intrazellulär wirken. Bestimmte AMP wie Bacitracin und Vancomycin können die Zellwand der Bakterien angreifen, was für Bakterien lebensentscheidend ist. Sie können entweder die Zellwandsynthese verhindern oder die Zellwandstruktur zerstören (Luo und Song, 2021).

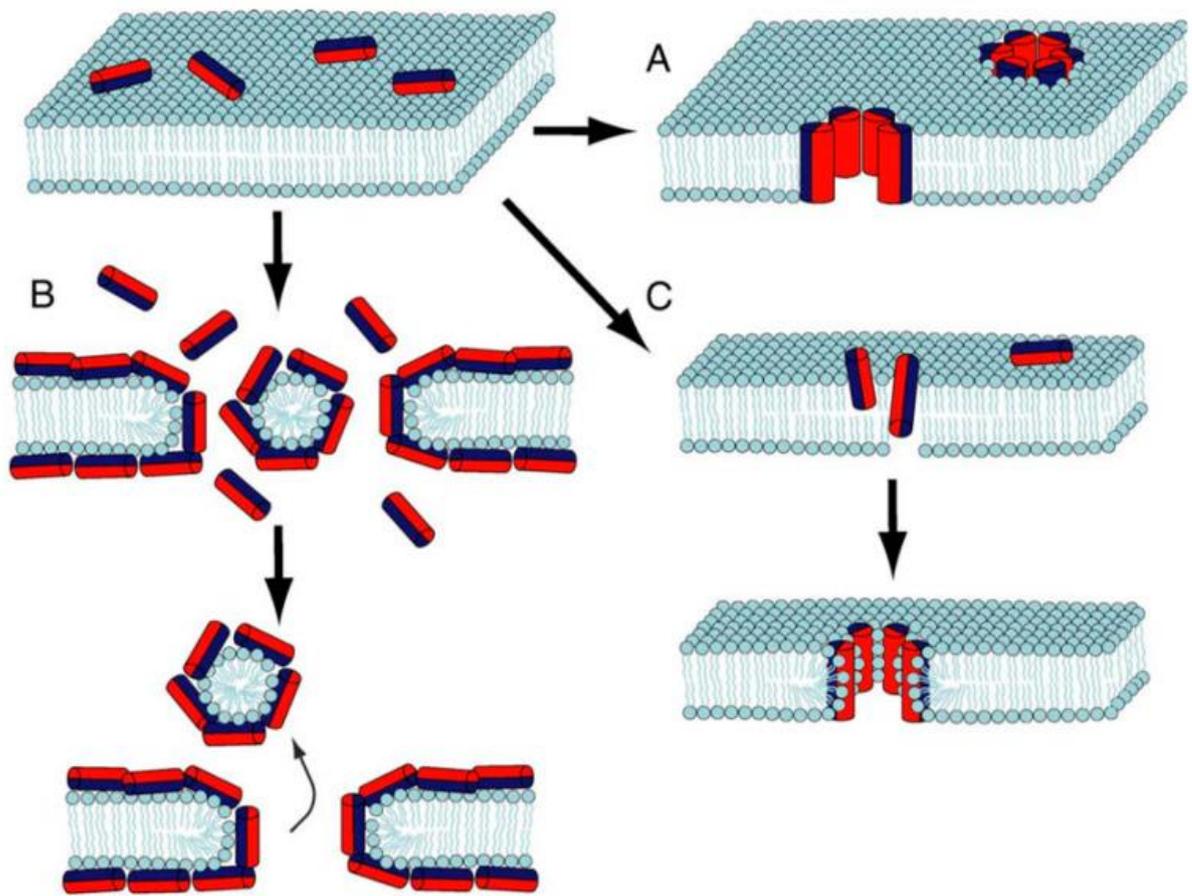


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Wirkungsmechanismen von antimikrobiellen Peptiden. A) Barrel-Stave-Modell: Die Peptide dringen parallel zu den Phospholipiden in die Membran ein und verursachen einen Verlust von Cytoplasma, bis die Membran zerstört ist. Die hydrophoben Bereiche der Peptide sind dem Lipidkern zugewandt und die hydrophilen Bereiche befinden sich im Inneren der Pore. B) Das Carpet-Modell: Die AMP bilden eine teppichartige Form auf der Membranoberfläche und interagieren mit den Phospholipiden. Sobald eine Schwellenkonzentration der Peptide erreicht ist, zerfällt die Membran in Mizellen. C) Toroidales-Modell: Die antimikrobiellen Peptide destabilisieren die Membran, indem sie die Phospholipid Moleküle zwingen, sich nach innen zu krümmen und Poren zu bilden (Nicolas et al., 2021).

2.2 Selektivität von AMP

Eine wichtige Eigenschaft von antimikrobiellen Peptiden ist die Unterscheidung zwischen Bakterien und menschlichen Zellen. Diese Selektivität basiert auf einem Unterschied der Lipidzusammensetzung von den jeweiligen zytoplasmatischen Membranen. Die äußere Schicht menschlicher Zellmembranen besteht meistens aus Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin und Cholesterin. Währenddessen enthält die Membran von prokaryotischen Zellen Cardiolipin und Phospholipide mit entweder einer anionischen Phosphatidylglycerol- (PG) oder einer zwitterionischen Phosphatidylethanolamin- (PE) Kopfgruppe. Aufgrund der Anwesenheit anionischer Lipide in pro-, aber nicht eukaryotischen Membranen, werden die kationischen AMP zu den bakteriellen Membranen angezogen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Bakterien, die eine höhere Konzentration von negativ geladenen Lipiden in der äußeren Schicht der Membran haben, anfälliger für AMP sind (Von Deuster und Knecht, 2012).

2.3 NK-2, CK33 und Aspidasept®

Ein wichtiger Repräsentant der antimikrobiellen Peptide ist NK-2. Das ist ein membranwirksames Peptid-Antibiotikum, was aus der kationischen Kernregion von NK-Lysin, einem 9-kDa porenbildenden Protein aus Schwein gewonnen wurde (Andrä et al., 2024; Andersson et al., 1995).

NK-2 ist wasserlöslich, linear, amphipatisch und nimmt eine alpha-helikale Sekundärstruktur an. Das Peptid besteht aus 27 Aminosäureresten und ist die Region mit der höchsten Dichte von NK-Lysin. Aufgrund einer kationischen Ladung von +10 bei physiologischem pH-Wert, hat das Peptid eine hohe Affinität zu negativ geladenen Membranen (Karmakar, Maity and Halder, 2017).

NK-2 ist aufgrund ihrer Eigenschaften sehr wichtig für klinische Anwendungen. Das antimikrobielle Peptid hat sich als ungiftig und nicht hämolytisch für menschliche Zellen erwiesen sowie ein Endotoxin-neutralisierendes Mittel. NK-2 hat eine hohe Wirksamkeit gegen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und andere gramnegative Bakterien, gegen *Staphylococcus aureus*, gegen Pilze, Tumorzellen und bestimmte medizinisch wichtige Protozoen, Parasiten (Andrä et al., 2024).

CK33 ist ein Derivat des Peptids NK-2. Die Sequenz des CK33 weicht an manchen Stellen von der Leitsequenz von NK-2 ab. An der siebten Position wurde die Aminosäure Cystein mit Alanin ersetzt. An der Stelle 11 wurde Methionin gegen Leucin getauscht und an Stelle von Asparaginsäure wurde Lysin an Position 21 eingesetzt. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass CK33 einen zusätzlichen Spacer von fünf AS zwischen dem Cystein und der Leitsequenz hat. Diese fünf Aminosäuren bestehen aus einer Sequenz von Glycin und Serinresten (siehe Tabelle 1). Aufgrund der höheren Anzahl an Aminosäuren weist CK33 eine höhere molekulare Masse als NK-2 auf.

Das Peptid Aspidasept® oder Pep19-2.5 wurde auf Basis des Anti-LPS-Faktors einer Krebsart (Limulus) hervorgebracht. Die Peptidsequenz besteht aus 20 Aminosäuren und das Peptid weist eine molekulare Masse von 2711,3 Da auf (siehe Tabelle 1). Das Peptid wurde so entwickelt, dass es eine große Anzahl polarer und positiv geladener Aminosäuren und die entsprechenden hydrophoben Reste enthält, um einen amphipathischen Charakter aufzuweisen (Gutsmann *et al.*, 2010). Pep19-2.5 hat in klinischen Studien eine Wirksamkeit gegen gramnegative und grampositive Bakterien gezeigt (Heinbockel *et al.*, 2015; Schuerholz *et al.*, 2013).

Tabelle 1: Darstellung der angewandten Peptide und dessen Sequenzen im Einbuchstabencode. Die fettgedruckten Buchstaben stellen die Unterschiede in Aminosäuresequenz zwischen den Leitsequenz NK-2 und CK33.

Peptid	Sequenz
NK-2	KILRG VCKKI MRTFL RRISK DILTG KK
CK33	C GSGSG KILRG VAKKI LRTFL RRISK K ILTG KK
Aspidasept® (Pep19-2.5)	GCKKY RRRFW KFKGK FFWWG

2.4 Immobilisierung

Die Immobilisierung der AMP bezeichnet ein Prozess, bei dem die Peptide an die Oberfläche eines Substrats gebunden werden. Durch ihre antimikrobielle Aktivität können Sie die Bildung von Biofilmen verhindern. Das ist eine effektive Methode, um das Wachstum von Mikroorganismen auf medizinischen Geräten und die dadurch entstehenden Infektionen zu bekämpfen. Dies kann durch physikalische oder chemische Methoden erreicht werden. Der Immobilisierungsprozess wird durch spezifische Oberflächeneigenschaften wie die Zusammensetzung, Ladung, hydrophiler oder hydrophober Charakter, Topografie und Rauheit oder durch AMP-Eigenschaften wie der Typ, Ladung, Molekülgröße und Konformationsstabilität beeinflusst (Andrade, 2016).

2.4.1 Physikalische Immobilisierung

Die physikalischen Methoden sind eine vielversprechende Immobilisierungsstrategie, die auf hydrophoben, ionischen, Dipolwechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen antimikrobiellen Peptiden und der Oberfläche beruhen (Andrade, 2016).

Eine Adsorptionsmethode, die die Bakterien bereits bei ihrer ersten Anheftung tötet, ist die Layer-by-Layer-Technik. Dieser Ansatz basiert auf dem Einfügen von AMP in mehrschichtigen Polyelektrolytschichten. Diese Filme entstehen durch abwechselnde Ablagerung von entgegengesetzt geladenen Polyelektrolytschichten. Durch die Filmarchitektur kann eine gezielte Freisetzung der Peptide erreicht werden (siehe Abbildung 2) (Etienne et al., 2004). Die Ladung der Peptide und ihre elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Polyelektrolyten stellen normalerweise ein Hindernis für die Polyelektrolytmehrschichtfilme dar. Eine Methode zur Sicherung der Stabilität dieser Filme und zur Erhaltung der bioziden Aktivität wäre das Einfangen von AMP in hydrophoben Nanodomänen (Nicolas et al., 2021).

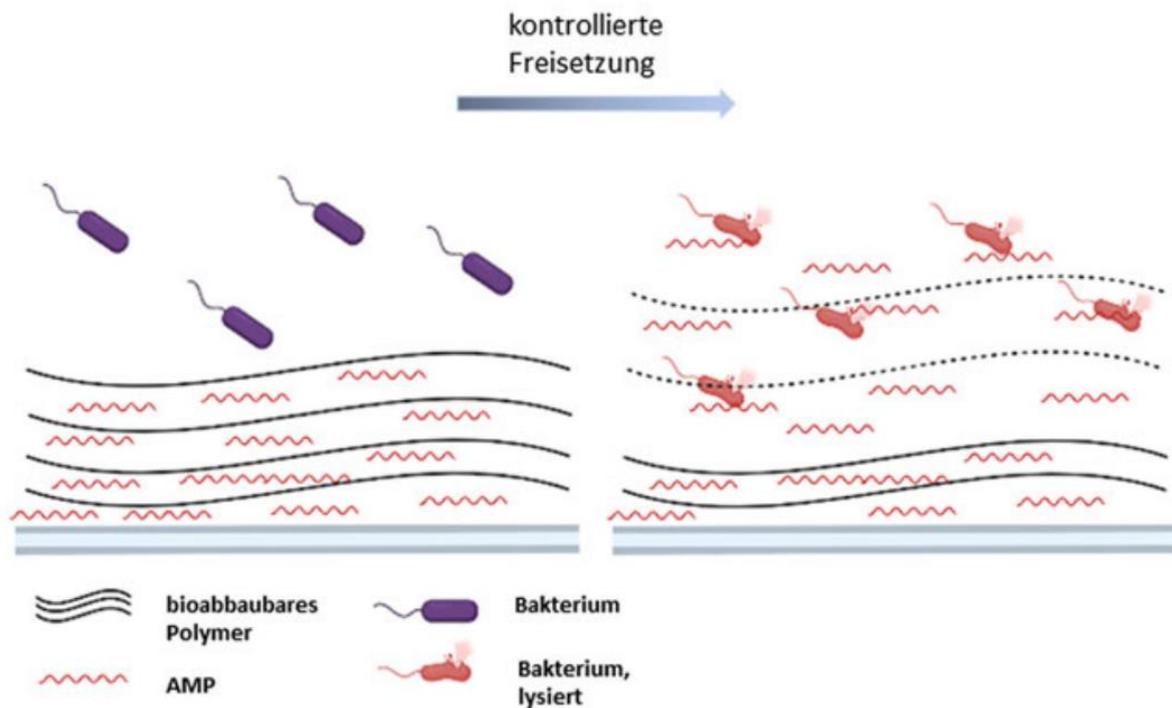


Abbildung 2: Darstellung der Layer-by-Layer-Methode. Die AMP sind in mehrschichtigen Polymerfilmen eingebettet. Nach einer zeitlich kontrollierten Freisetzung der AMP in bioabbaubaren Polymeren werden die Bakterien abgetötet, indem die Integrität der bakteriellen Zellmembran zerstört wird (Müller, 2021).

Die Vielschichtigkeit ist von entscheidender Bedeutung für die antimikrobielle Aktivität. Eine Erhöhung der Anzahl von polyelektrolytischen Schichten führt zu einer höheren Effektivität (Escobar, Muzzio und Moya, 2020).

In einer Studie von Etienne et al. wurde festgestellt, dass in einem 10-schichtigen Defensinfunktionalisierten Film, die Hemmung des Wachstums von *E. coli* D22 98% betrug. Die äußerste Schicht des Films bestand aus geladenem Poly(L-Lysin), ein Polykation. Die Experimente mit Filmen, deren letzten Schichten aus Polyanionen bestanden, zeigten keinen Erfolg (Etienne et al., 2004).

Die Filme können jede Art von Oberfläche wie Metalle, Harz, Kunststoffe beschichten. Auch die Substratform kann variieren. Die Immobilisierung kann auf planare, sphärische oder gekrümmte Geometrien erfolgen. Die Polyelektrolyt-Mehrschichtfilmen bieten eine gute Biokompatibilität und eine hohe Stabilität an. Durch die mehrschichtige Architektur kann die

Peptidmenge, Peptidschichtdicke sowie ihre homogene Verteilung gesteuert werden, um die antimikrobielle Effizienz zu steigern. Daher zeigen die Studien gute Perspektiven für ihre Anwendung zum Schutz von medizinischen Geräten und Instrumenten vor bakterieller Adhäsion (Etienne et al., 2004).

Jedoch hat diese Methode einige Nachteile, die ihre Anwendung einschränken. Die Peptide, die sich in den unteren Schichten befinden, haben keinen direkten Kontakt mit der Umgebung. Die Wirksamkeit der AMP hängt vom Diffusionsprozess an der Schnittstelle ab. Dabei spielen eine wichtige Rolle die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Polymer und Peptid und die Filmdicke. Einen weiteren Nachteil stellt die schnelle Freisetzung der Peptide aus den polymeren Filmen dar. Das kann zur Absenkung der eingebetteten Peptidmenge führen, was die notwendige Konzentration zur Hemmung des Wachstums beeinflusst. Die schnelle Freisetzung der AMP könnte zudem Bedingungen für die Entwicklung bakterieller Resistenz und lokale Toxizität schaffen (Andrade, 2016).

2.4.2 Chemische Immobilisierung

Eine Alternative zur Beschichtung der Oberflächen ist die chemische Immobilisierung. Bei dieser Art der Immobilisierung werden kovalente Bindungen zwischen der Oberfläche und AMP gebildet. Diese kovalenten Bindungen sind so stark, dass eine spontane Peptidentkopplung unwahrscheinlich wird. Die Stabilität des antimikrobiellen Films ist nur einer der Vorteile, die diese Methode anzubieten hat. Durch die chemische Immobilisierung wird die Dauer der antimikrobiellen Effektivität erhöht und die Toxizität für Patienten verringert, indem das Auswaschen von Peptiden verringert wird (Bagheri, Beyermann und Dathe, 2009; Haynie, Crum und Doele, 1995). Diese Vorteile machen die chemische Modifikation eine vielversprechende Methode. In einer Studie von Willcox et al. über die Immobilisierung von kationischen Peptiden zur Verhinderung mikrobieller Besiedlung auf Kontaktlinsenmaterial, wurde die kovalente Bindung mit der physikalischen Adsorption verglichen. Dafür wurden die Peptide Protamin, Melittin und das synthetische Peptid Melimin benutzt. Die kovalente Bindung zeigte deutlich bessere Ergebnisse und eine höhere Effizienz als die physikalische Immobilisierung (Willcox et al., 2008). Die molekularen Kopplungsmechanismen müssen jedoch weiterhin untersucht werden, um die bioaktiven

Eigenschaften der AMP zu bewahren. Durch die kovalente Bindung kann ihre Konformationsstruktur geändert, ihre Mobilität eingeschränkt und der Wirkungsmechanismus beeinflusst werden (Andrade, 2016).

Es sind zwei Arten der chemischen Kopplung zu unterscheiden. Die selektive und die nicht selektive Kopplung.

Nicht selektive Immobilisierung ist eine einfache Methode, die auf natürliche Weise erfolgt. Es sind dafür keine chemischen Modifikationen in den Peptiden notwendig. Die kovalente Bindung erfolgt zwischen aktivierten Oberflächen und intrinsischen funktionellen Gruppen (z. B. Carbonsäure-, Amino-, Sulfhydryl- und Hydroxylgruppen) der Peptidsequenz. Diese Bindungsmethode kann benutzt werden, wenn eine breite Bindung an verschiedenen Molekülen erwünscht ist. Die mehrfachen kovalenten Bindungen mit unterschiedlicher Orientierung können zur Folge die Effektivität haben.

Dagegen erfolgt die selektive chemische Immobilisierung gezielt. Eine spezifische funktionelle Gruppe wird in die Struktur des Peptids eingefügt. Der Reaktionsverlauf und die Orientierung des Moleküls können kontrolliert werden (Andrade, 2016).

In dieser Arbeit soll eine chemische Immobilisierung der Peptide CK33 und Aspidasept® (Pep19-2.5) durchgeführt werden (siehe Tabelle 1). Die Immobilisierung erfolgt, indem die Iodacetylgruppen an den Harzpartikeln eine Thioetherbindung mit freien Sulfhydrylgruppen vom Peptid bilden (siehe Abbildung 3). Damit die freien Sulfhydrylgruppen von Cystein zustande kommen, muss das Peptid reduziert werden. 1,4-Dithithreiol (DTT) ist ein Reduktionsmittel, das die Disulfidbrücken reduzieren kann. Es erweist sich jedoch in dieser Arbeit als nicht geeignet, weil es Thiolgruppen enthält, die um die Bindungsplätze an den Iodacetylgruppen konkurrieren können. Um den Schritt, bei dem 1,4-Dithithreiol (DTT) vor der Kopplungsreaktion entfernt werden muss, zu umgehen, wird ein anderes Reduktionsmittel benutzt. Tris(2-carboxyethyl) phosphine-Hydrochlorid (TCEP) besitzt im Gegensatz zu DTT keine Thiolgruppe, wodurch die Iodacetyl-Reaktion nicht beeinträchtigt wird. Somit erweist sich Tris(2-carboxyethyl) phosphine-Hydrochlorid (TCEP) als ein geeignetes Reduktionsmittel und muss vor der Kopplung nicht entfernt werden.

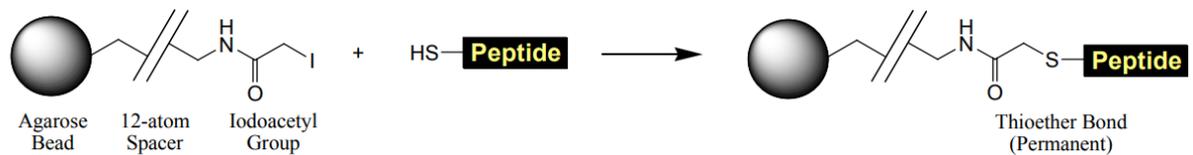


Abbildung 3: Reaktionsschema der Kopplung eines Peptids mit einem Harzpartikel. Die Kopplung basiert auf einer Thioetherbindung. Quelle: Bedienungsanleitung von Thermo Scientific SulfoLink® Coupling Resin.

2.5 Cross-Linking und PEG

Der chemische Vorgang, bei dem das Peptid mithilfe von einem Linker kovalent an der Oberfläche gekoppelt wird, ist als Cross-Linking bekannt. Ein Linker zusammen mit einem eingebauten Abstandshalter engl. Spacer kann dem Peptid Bewegungsfreiheit geben. Cross-Linking wird oft eingesetzt, um antimikrobielle Peptide auf verschiedene anorganische und organische Substrate zu binden. Linker sind meistens Kohlenstoffkettenmoleküle, die entweder synthetisch sind, wie Silan und Polyethylenglykol (PEG), oder natürlichen Ursprungs sind wie Heparin, Dopamin und Chitosan. Die am meisten verwendeten Linkermoleküle in der Orthopädie sind Silan und PEG (Stewart et al., 2019). Es wurde bewiesen, dass die antimikrobielle Aktivität bei der Verwendung eines Linkers deutlich besser ist als bei einer direkten Immobilisierung (Ivanov et al., 2012; Nicolas et al., 2021).

PEG spielt wegen seiner antiadhäsiven Eigenschaften eine wichtige Rolle, um die Oberflächen gegen eine bakterielle Infektion zu schützen. Darüber hinaus kann PEG die bakterizide Wirkung von Peptiden nach deren Kopplung auf der Oberfläche aufrechterhalten (Andrade, 2016). In vielen Arbeiten wird PEG als ein Abstandshalter erwähnt. Die Länge des Polymers hat einen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität. Je länger das Polymer, desto besser ist die antimikrobielle Wirksamkeit (Bagheri, Beyermann und Dathe, 2009). Der Nachteil der Verwendung von Polyethylenglykol wäre das Risiko der Degradation der Polymerkette (Cho et al., 2007).

Der Standardansatz zur Oberflächen PEGylierung nutzt die vorhandenen Hydroxylgruppen des Substrats, um die PEG-Moleküle auf der Oberfläche zu binden. Die kürzlich angewendeten PEG-Moleküle sind speziell modifiziert, um elektrostatische Wechselwirkungen mit der hydroxylierten Oberfläche zu bilden. Sie sind auch mit Amin- (NH₂-PEG-NH₂) oder

Carboxylgruppen (COOH–PEG–NH₂) versehen, um Biomoleküle zu fixieren. In der Abbildung 4 ist die PEGylierung von Proteinen an einem hydroxylierten Substrat dargestellt. Das Prinzip kann auf die kovalente Immobilisierung von Peptiden mithilfe von PEG an Oberflächen übertragen werden.

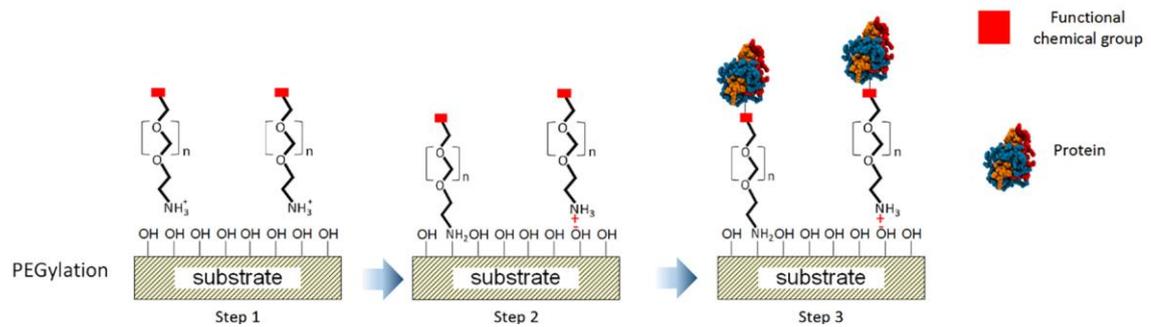


Abbildung 4: Die Schematische Darstellung von einer kovalenten Immobilisierung eines Proteins an einer Oberfläche mithilfe von PEG. Schritt 1: Das hydroxylierte Substrat wird in einer PEG-Lösung ausgesetzt. Schritt 2: PEG wird entweder über eine Kondensationsreaktion oder über elektrostatische Wechselwirkungen an die Substratoberfläche gebunden. Schritt 3: Das gewünschte Protein wird über die chemische Funktionsgruppe am PEG gekoppelt (Stewart et al., 2019).

2.6 Vergleich von immobilisierten und gelösten Peptiden

Um die Effektivität der immobilisierten antimikrobiellen Peptide besser zu beurteilen, ist ein Vergleich mit den gelösten AMP nötig. Gekoppelte AMP zeigen bei der gleichen Konzentration eine langsamere Wirkung im Vergleich zu den gelösten AMP. In einer Studie von Yasir et al. wurde festgestellt, dass gelöste Peptide nach vier Stunden Inkubation keine DNA/RNA freisetzen, während gekoppelte Melimin- und Mel4-Peptide nach acht Stunden Inkubation 2,3-mal bzw. 1,5-mal so viel Nukleinsäure freisetzen. Das deutet darauf hin, dass die immobilisierte AMP eine langsame, aber intensivere Wirkung als die gelöste AMP zeigen (Yasir et al., 2020).

Ein ähnliches Ergebnis bezüglich der Geschwindigkeit der Wirkung der immobilisierten AMP zeigte eine Studie von Bagheri et al. mit immobilisierten Peptiden wie KLAL, MK5E und Melittin. Diese wiesen eine geringere Membranzerstörung und verlangsamten Abtötung von *E. coli* auf, im Vergleich zu den gelösten Peptiden. Die langsame Kinetik und die verringerte Aktivität der AMP könnte daran liegen, dass sie nicht flexibel genug sind und die bakterielle Membran nicht permeabilisieren können. Dies könnte durch Anwendung bestimmter PEG-Spacer, die als Abstandhalter dienen, behoben werden. Eine Erhöhung der immobilisierten Peptiddichte auf der Oberfläche hat sich als nicht wirksam erwiesen (Bagheri, Beyermann und Dathe, 2009).

Ein Nachteil von den gelösten Peptiden ist, dass diese nach der Interaktion mit der äußeren Bakterienmembran zu einer schnellen Erschöpfung kommen und eine geringe Effektivität aufweisen (Yasir et al., 2020). Ebenso zeigen die gelösten Peptide eine höhere zytotoxische Aktivität gegenüber humanen Zellen als die immobilisierten AMP (Rapsch et al., 2014).

Abschließend lässt sich sagen, dass die immobilisierte AMP spezifische Herausforderungen mit sich bringen, aber auch Vorteile haben.

3. Theoretische Grundlagen der angewendeten Methoden

3.1 Tricin-SDS-PAGE

Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (Tricin-SDS-PAGE) ist eine Methode zur Trennung der kleinen Proteine (Schägger, 2006). Sie ist eine optimierte Methode von SDS-PAGE, die zur Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht dient. Mithilfe von SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), die sich im Probenpuffer befindet, werden alle Proteine negativ geladen. SDS sorgt dafür, dass durch die Interaktion mit den hydrophoben Bereichen die Struktur der Proteine zerstört wird, indem alle Wechselwirkungen und nicht-kovalente Bindungen innerhalb der Proteine destabilisiert werden. Alle Proteine sind jetzt negativ geladen und werden beim Anlegen eines elektrischen Feldes, durch das Gel zum Anode wandern. Je kleiner die Proteine, desto schneller wandern Sie durch das Gel. Die Konzentration von Acrylamid, woraus das Gel besteht, beeinflusst die Porengröße der Gele. Für kleine Proteine ist eine hohe Konzentration von Acrylamid geeignet (Schägger, 2006).

3.2 ATR-FTIR-Infrarotspektroskopie

Eine analytische Methode, die zur Charakterisierung von Molekülen verwendet wird, ist die IR-Spektroskopie. Diese Methode untersucht die Wechselwirkungen zwischen Infrarotstrahlung und Materie. In bestimmten Wellenlängen absorbieren die Moleküle die Infrarotstrahlung und dadurch werden Vibrationen in den chemischen Bindungen der Moleküle verursacht. Mit einem IR-Spektrometer wird die Energie der Infrarotstrahlung gemessen, die von der Probe benötigt wird, um molekulare Schwingungen zu erzeugen. Im Spektrum werden die Absorptionsbänder gezeigt, die spezifisch für bestimmte chemische Bindungen sind. Die wichtigsten Schwingungstypen sind die Streckschwingungen und die Biegeschwingungen. Bei den Streckschwingungen ändert sich die Bindungslänge zwischen den Atomen während der Schwingungen und bei den Biegeschwingungen ändert sich der Winkel.

Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) ist eine spezielle Form der Infrarotspektroskopie, wobei alle Frequenzen des Lichts gleichzeitig gemessen werden. Durch eine mathematische Fourier-Transformation wird ein IR-Spektrum erzeugt. Die Fourier-

Transformation wandelt ein Zeitsignal, das vom IR-Detektor erfasst wird, in ein Frequenzspektrum um (siehe Abbildung 5).

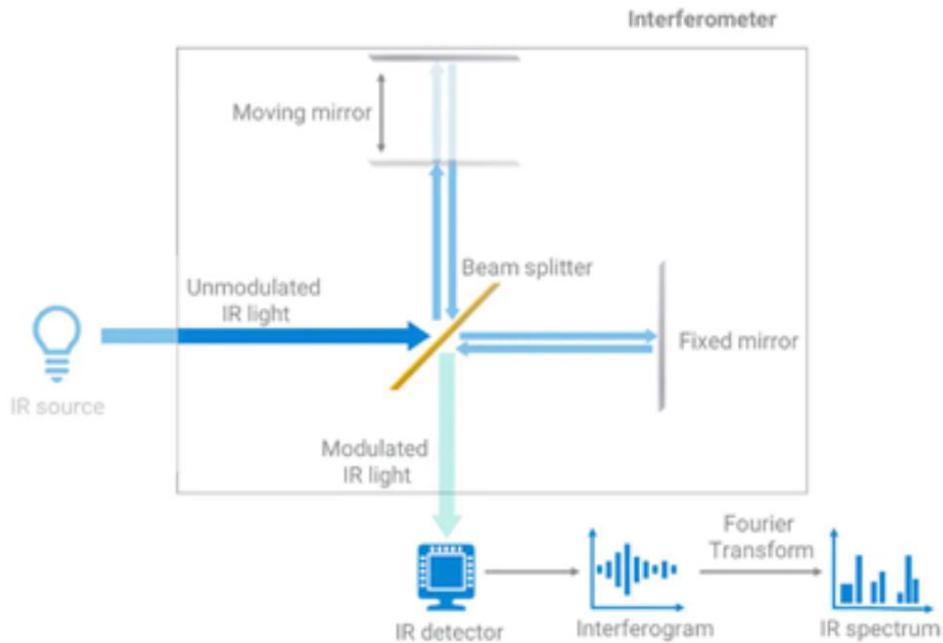


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines FTIR-Spektrometers. Ein Strahlteiler teilt das IR-Licht im Interferometer in zwei Strahlen auf. Ein Strahl wird von einem festen Spiegel reflektiert und der andere Strahl von einem beweglichen Spiegel. Die Strahlen treffen sich am Strahlteiler und interferieren miteinander. Aufgrund der variierenden Weglänge des zweiten Strahls, hat das austretende IR-Licht eine variierende Frequenzverteilung. Der Detektor zeichnet ein Interferogramm und durch die Fourier-Transformation wird ein IR-Spektrum erhalten (ATR-FTIR Spectroscopy, FTIR Sampling Techniques | Agilent).

Attenuated total reflectance (ATR) oder die abgeschwächte Totalreflexion ist die am meisten angewandte Technik in der FTIR-Spektroskopie. Hier wird das IR-Licht vielfach an der Grenze zwischen einem Kristall und Probe reflektiert. Das reflektierte Licht geht weiter zum FTIR-Detektor. Bei einer Totalreflexion dringt ein Teil des Lichts in die Probe ein. Das von der Probe absorbierende Licht wird evaneszente Welle genannt.

3.3 Mikrodilutionstest

Der Mikrodilutionstest ist eine empfindliche Methode zur Bestimmung der Wirksamkeit von Antibiotika, Antimykotika, antimikrobiellen Peptide oder zur Beobachtung von Resistenzen. Eine Mikrotiterplatte hat 96 Vertiefungen, wobei jede Vertiefung unterschiedliche Konzentrationen des Antibiotikums oder des antimikrobiellen Peptides enthält. In jede Vertiefung wird eine Menge des Mikroorganismus gegeben und die Mikrotiterplatte wird inkubiert. Nach der Inkubation kann die minimale Hemmkonzentration (MIC) von den antimikrobiellen Substanzen bestimmt werden. MIC ist definiert als die niedrigste Peptidkonzentration, die benötigt wird, um das Wachstum eines Bakteriums nicht mehr sehen zu können (Andrä et al., 2004).

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

Tabelle 2: Auflistung der angewendeten Materialien und der jeweiligen Hersteller

Materialien	Hersteller
Becherglas (50 ml, 100 ml, 500 ml)	Vitalab
Messzylinder (50 ml, 100 ml)	Vitalab
Glasflasche (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml)	Vitalab
Wägeschälchen	Labsolute
Elektrophoresekammer	BioRad
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000µL, 10 mL)	Nerbe Plus
Einmalhandschuhe	Meditrade
Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Tücher	Roth
Breathe Easy Gas permeable Membrane für Mikrotiterplatten	Diversified Biotech
Mikrotiterplatten	k.A
Rührfisch, magnetisch	k.A
Schikanenkolben (500 ml, 1000 ml)	Duran

4.2 Geräte

Tabelle 3: Auflistung der angewendeten Geräte und der jeweiligen Hersteller

Geräte	Hersteller
Feinwaage	Kern
Waage	Sartorius
SDS-PAGE	BioRad
Thermomixer C	Eppendorf
Vortexer	Phoenix
Zentrifuge „mini spin“	Eppendorf
pH-Meter	Calimatic
Kühlschrank 5°C	VWR International
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Heizblock	Labnet
Pipetten (10 µL, 200 µL, 1000µL, 10 mL)	Brand
Spectrophotometer	Thermo scientific
Plattenreader MULTISKAN ASCENT	Thermo ELEKTRON CORPORATION
FTIR- Infrarotspektrometer	Agilent Technologies
Schüttelinkubator	Axon Labortechnik
Magnetrührer	Heidolph

4.3 Chemikalien

Tabelle 4: Auflistung der angewendeten Chemikalien und der jeweiligen Hersteller

Chemikalien	Charge	Hersteller
Tris-Base	189283473	Roth
Tricin Pufferant [®] (≥ 99%)	472327381	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	RNBD6044	Sigma-Aldrich
Essigsäure (100%)	383337674	Roth
SDS-Pellets	10291236	Roth
Ethanol (>99)	k.A	Roth
Glutardialdehyd (25%)	199283500	Roth
Borsäure	k.A	Roth
Acrylamid Gel (30%)	k.A	Roth
TEMED	264357751	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	410162406	Roth
Glycerin	097252665	Roth
1,4-Dithiothreitol	463206589	Roth
Tris(2-carboxyethyl) phosphine-Hydrochlorid	A0443530	Thermo scientific
Kalibrier-Pufferlösung pH 7;9	k.A	k.A
Wasser, demineralisiert	-	Hausleitung
Reinstwasser	-	Hausleitung
Trifluoressigsäure (TFA)	405235011	Carl Roth
SulfoLink [®] Coupling Resin	YC364883	Thermo scientific
Roti-Blue Coomassie 5X	411315733	Roth
EDTA-Na ₂ -Dihydrat	286514	Labochem international
Ultra Low Range Molecular Weight Marker	SLBT0500	SIGMA
HEPES	282319917	Roth
Natriumchlorid	099280391	Roth
Hefeextrakt	0292755739	Roth
Bacto TM Peptone	211677	BD

4.4 Antimikrobielle Peptide und Enzyme

In dieser Arbeit wurden insgesamt drei Peptide und ein Enzym benutzt. Für die Reduktion und Kopplungsversuche wurden CK33 und Aspidasept eingesetzt. Aspidasept wurde als Kontrolle eingesetzt. Für die Untersuchung mittels IR-Spektroskopie wurde Lysozym benutzt und für den Mikrodilutionstest wurde NK-2 und CK33 benutzt. Die Peptide und das Enzym lagen in lyophilisierter Form vor. Aus CK33 wurden zwei Stocklösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Das Peptid wurde einmal in 0,01 % TFA und einmal in Kopplungspuffer gelöst. Der Kopplungspuffer enthielt 5 mM EDTA-Na und 50 mM Tris gelöst in demineralisiertem Wasser. Aspidasept wurde in 0,01 % TFA gelöst. Die Stocklösung hatte eine Konzentration von 1 mg/ml. Es wurde versucht, eine Stocklösung von Aspidasept in Kopplungspuffer herzustellen, es wurde aber festgestellt, dass das Peptid in Kopplungspuffer nicht löslich ist. Aus Lysozym wurde eine Stocklösung mit der Konzentration 10 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. NK-2 lag in der Konzentration 1 mg/ml vor.

Tabelle 5: Auflistung der angewendeten Peptide und der jeweiligen Hersteller

Peptide	Hersteller
CK33	Proteogenix, France
Aspidasept® (Pep19-2.5)	Freundliche Gabe von K. Brandenburg
Lysozym	Carl Roth GmbH+Co KG
NK-2	k. A

4.5 Tricin SDS-PAGE

Für diese Arbeit wurden Tricin Gele hergestellt, die aus drei verschiedenen Gelschichten bestehen: Separation, Spacer und Stacking Gel. Die Gele wurden unter dem Abzug gegossen und erst benutzt, wenn sie komplett auspolymerisiert waren (siehe Tabelle 6). Die Gelkammern wurden gemäß der Anleitung von Bio-Rad aufgebaut. Die Gelkammer wurde mit Anode Puffer aufgefüllt (siehe Tabelle 8). Zwischen den Glasplatten wurde Kathode Puffer benutzt (siehe Tabelle 9).

Zuerst wurde das Separation Gel und dann das Spacer und Stacking Gel gegossen. Nach jedem Schritt wurde gewartet, bis die unterliegende Gelschicht auspolymerisiert wurde. TEMED (Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumperoxodisulfat) wurden als letzte pipettiert kurz vor dem Abgießen der Gele, um eine vorzeitige Polymerisation zu verhindern. Der Gelpuffer wurde, wie in der Tabelle 7 erklärt, hergestellt.

Tabelle 6: Die Zusammensetzung von zwei Gelen für Tricin-SDS-PAGE

Lösungen	Separation Gel	Spacer Gel	Stacking Gel
Acrylamid 30%	3 ml	0,4 ml	0,3 ml
Gelpuffer	2 ml	0,43 ml	0,65 ml
Glycerol	1 ml	0,13 ml	-
Wasser demineralisiert	-	0,36 ml	1,05 ml
TEMED	6 µl	1,33 µl	2 µl
APS	15 µl	3,33 µl	5 µl

Tabelle 7: Gelpuffer (3x) für die Tricin-SDS-PAGE Gele, pH-Wert 8,44, Volumen 100 ml

Komponente	Menge für 100 ml
Tris Base (3M)	36,3 g
SDS	0,3 g

Tabelle 8: Anode Puffer (10x) für die Tricin-SDS-PAGE, pH 8,9, Volumen 100 ml

Komponente	Menge für 100 ml
Tris Base (2M)	24,2 g

Tabelle 9: Kathode Puffer (10x) für die Tricin-SDS-PAGE, pH 8,25, Volumen 50 ml

Komponente	Menge für 50 ml
Tris Base (1M)	6,2568 g
Tricine (1M)	8,98 g
SDS (1%)	0,5 g

Es wurde eine Stocklösung des Peptids CK33 in 0,01 % TFA mit der Konzentration 1 mg/ml hergestellt. Daraus wurden zwei anderen Lösungen mit den Konzentrationen 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml hergestellt. Aus diesen drei Stocklösungen und 0,01 % TFA wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, sodass in den Probenbeutchen des Gels die Peptidmengen 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 und 3 µg vorlagen. Dasselbe wurde mit Aspidasept wiederholt. Das genaue Pipettierschema der Verdünnungen A-F ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Volumina zum Ansetzen der Lösungen A-F aus 0,01 % TFA und drei verschiedenen Stocklösungen mit der Konzentration 1 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml. In der Lösung A befindet sich 0,01 µg Peptid, in der Lösung B 0,03 µg, in der Lösung C, D, E und F jeweils 0,1; 0,3; 1; 3 µg Peptid.

	A	B	C	D	E	F
Komponente	Pipettiervolumen in µl					
Stocklösung 1 mg/ml	-	-	-	-	-	6
Stocklösung 0,1 mg/ml	-	-	-	6	20	-
Stocklösung 0,01 mg/ml	2	6	20	-	-	-
0,01 % TFA	18	14	-	14	-	14

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wurden in dieser Arbeit Gele mit 10 Taschen verwendet. Es wurden sowohl nicht reduzierte als auch reduzierte Proben aufgetragen. Für die nicht reduzierten Proben wurde die Probe im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer gemischt. Die Zusammensetzung des Probenpuffers ist in Tabelle 12 dargestellt. Es wurden 20 µl Probe mit 20 µl Probenpuffer gemischt und daraus wurden 20 µl in die Geltasche aufgetragen. Für die reduzierten Proben wurde Probenpuffer mit DTT oder TCEP mit der Probe gemischt. Eine 1 M Lösung DTT wurde 1:10 mit dem Probenpuffer verdünnt. Der Probenpuffer enthielt nach der Verdünnung 100 mM DTT. Für die mit TCEP reduzierte Proben wurde ein Probenpuffer mit 200 mM TCEP angesetzt. Wie bei den nicht reduzierten Proben wurde hier auch 20 µl der Probe mit 20 µl des Probenpuffers mit DTT oder TCEP gemischt und daraus 20 µl auf die Tasche aufgetragen. Der Standardmarker wurde gemäß den Herstellerangaben angesetzt. Der 2X Sample Puffer wurde mit destilliertem Wasser auf 1X Sample Puffer verdünnt. Der Marker wurde 1:20 mit dem 1X Sample Puffer verdünnt. Daraus wurden an den äußersten Probenaschen 10 µl aufgetragen.

Die Elektrophorese startete bei 90 V und dauerte ungefähr 3,5 Stunden. Danach wurden die Gele dreimal je 5 Minuten mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Als Nächstes erfolgte das Fixieren der Peptide im Gel, um ein Auswaschen während der Färbung oder Entfärbung zu vermeiden. Dafür wurden die Gele 30 Minuten in der Fixierlösung (siehe Tabelle 13) gegeben. Danach wurden die Gele für eine weitere halbe Stunde in demineralisiertem Wasser gegeben, um die Fixierlösung auszuwaschen, damit diese die Färbelösung später nicht verfärbt. Die Gele

wurden über Nacht gefärbt und am nächsten Tag 1 Stunde entfärbt. Die Färb- und Entfärbelösung sind in den Tabellen 14 und 15 zu entnehmen.

Tabelle 11: Zusammensetzung von Puffer S

Komponente	Menge für 100 ml
Tris Base	6,1 g
SDS	0,4024 g

Tabelle 12: Zusammensetzung von Probenpuffer

Komponente	Menge für 100 ml
Puffer S	2,5 ml
SDS	2 g
Orange G	40 g
Glycerol (87%)	20 ml

Tabelle 13: Fixierlösung für die Tricin-SDS-PAGE Gele, pH-Wert 8,5, Volumen 500 ml

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

Tabelle 14: Roti-Blue Färbelösung für die Tricin-SDS-PAGE, Volumen 500 ml

Komponente	Menge für 500 ml
Roti-Blue 5x Konzentrat	100 mL
Ethanol (≥99.8 %)	100 mL

Tabelle 15: Entfärbelösung für die Tricin-SDS-PAGE, Volumen 500 ml

Komponente	Menge für 500 ml
Essigsäure (100 %)	50 mL
Ethanol (≥99.8 %)	50 mL

4.6 Kopplung

Dieser Versuch befasst sich mit der Kopplung der antimikrobiellen Peptide CK33 und Aspidasept ans Harz (SulfoLink Resin®). Vor Beginn der Kopplung wurde eine Reduktion der Disulfidbrückenbindungen der Peptide durchgeführt. Dafür wurden 25 µL aus der Stocklösung (1 mg/mL) mit 25 µL der TCEP-Stocklösung für 60 Minuten zusammengegeben. TCEP wurde in Kopplungspuffer gelöst und hat die Konzentration 200 mM. Für die 1 mg/ml Stocklösungen

wurde CK33 bei A und B in 0,01 %TFA gelöst und bei C in Kopplungspuffer. Aspidasept wurde in 0,01 % TFA gelöst. In der Zeit wurde das Harz dreimal mit Kopplungspuffer gewaschen. Dafür wurde das fünffache Volumen des Harzsuspensionsvolumens benutzt. Es wurde dreimal je 5 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert und nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand verworfen.

Laut Herstellerangaben (ThermoFisher Scientific) bindet 1 ml Harz oder 2 ml Harzsuspension 1 mg sulfhydrylhaltiges Peptid. Das wurde jedoch in der Masterarbeit von Lesniewski nicht nachgewiesen. Die Kopplung war nicht erfolgreich. In der Bachelorarbeit von Poku wurde nach verschiedenen Modifikationen des Herstellerprotokolls eine nicht vollständige Kopplung erzielt. Das Ergebnis erfolgte bei einem Peptid-Harzsuspensions-Verhältnis von 1:4 und einer Drehzahl von 1050 rpm. In dieser Arbeit werden weitere Anpassungen der Parameter Drehzahl im Thermomixer, die Menge des verwendeten Harzes sowie die Inkubationszeit ausprobiert.

Die folgenden Kombinationen wurden ausprobiert.

A: Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis von 1:4 und eine Stunde bei Drehzahl 1150 rpm im Thermomixer geschwenkt. CK33 wurde in 0,01 % TFA gelöst. Es wurden 25 µL von der mit TCEP reduzierte Lösung zu 100 µL Harzsuspension gegeben.

B: Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis von 1:4 und Erhöhung der Schüttelzeit auf zwei Stunden bei Drehzahl 1150 rpm im Thermomixer. CK33 wurde in 0,01 % TFA gelöst. Es wurden 25 µL von der mit TCEP reduzierte Lösung zu 100 µL Harzsuspension gegeben.

C: Erhöhung von Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis auf 1:5, Erhöhung der Schüttelzeit auf zwei Stunden und Drehzahl auf 1110 rpm im Thermomixer. CK33 wurde in Kopplungspuffer gelöst. Es wurden 25 µL von der mit TCEP reduzierten Lösung zu 125 µL Harzsuspension gegeben.

D: Peptid Aspidasept-Harzsuspension-Verhältnis von 1:5, Schüttelzeit von zwei Stunden und Drehzahl 1110 rpm im Thermomixer. Aspidasept wurde in 0,01 % TFA gelöst. Es wurden 25 µL von der mit TCEP reduzierte Lösung zu 125 µL Harzsuspension gegeben.

Nachdem sie im Thermomixer geschwenkt wurden, standen die Proben für eine Stunde in Raumtemperatur. Analog zum Kopplungsansatz gab es für jede Probe einen Kontrollansatz. Die Peptide in der Kontrolle wurden genauso wie die Peptide im Kopplungsansatz vorbereitet, mit

dem einzigen Unterschied, dass anstatt von der Harzsuspension die entsprechende Menge an Kopplungspuffer zugegeben wurde. Der Überstand vom Kopplungsansatz und die Kontrolle werden aufbewahrt und mit der Tricin-SDS-PAGE Methode analysiert. Es wurden Gele mit 10 Taschen benutzt. Der Überstand und die Kontrolle wurden einmal unverdünnt wie in Abschnitt 4.5 aufgetragen und einmal 1:1 mit Kopplungspuffer verdünnt und aufgetragen.

Das Harz mit dem gebundenen Peptid CK33 (Kombination C) wird mit dem Mikrodilutionstest analysiert (siehe Abschnitt 4.8).

Tabelle 16: Kopplungspuffer, pH-Wert 8,5, Volumen 500 ml

Komponente	Anteil	Menge für 50 ml
EDTA-Na ₂ Dihydrat	5 mM	0,0931 g
Tris-Base	50 mM	0,3029 g

Immobilisierungsschema

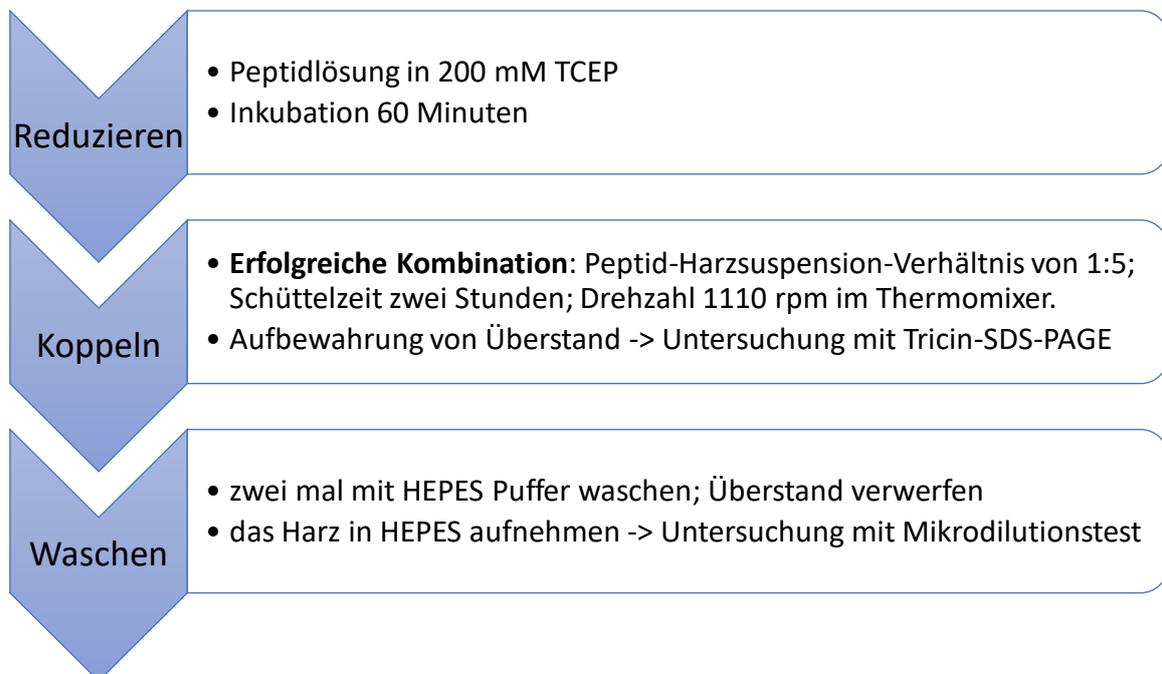


Abbildung 6: Schrittweise Schema der Kopplung. Der erste Schritt stellt die Vorbereitung der Proben dar. Der zweite Schritt zeigt die Parameter, die kombiniert wurden, um eine erfolgreiche Kopplung zu erzielen. Der letzte Schritt wurde durchgeführt, um die Kopplung des Peptids ans Harz mit dem Mikrodilutionstest zu bestätigen (siehe Abschnitt 4.8).

4.7 Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektroskopie ist eine weitere Nachweismethode, die in Erwägung gezogen wurde. Diese Methode hat den Vorteil, dass feste Proben genauso wie flüssige Proben untersucht werden können.

Die Proben, die untersucht wurden, sind Lysozym aus Hühnereiweiß in lyophilisierter Form, DMSO und Lysozym in DMSO in der Konzentration von 10 mg/mL. Die feste Probe wurde mit einem kleinen Spatel auf den Kristall des Geräts aufgebracht und es wurde sichergestellt, dass die Probe direkten Kontakt zum Kristall hat. Von den reinen DMSO und das Lysozym in DMSO-Lösungen wurden jeweils 5 µL auf den Kristall gegeben und es wurde die Transmission gemessen. Für die Messung wurde eine Verstärkung von 205 gewählt. Der Kristall wurde vor und nach jeder Messung mit 99% vergälltem Ethanol sauber gemacht.

4.8 Mikrodilutionstest

Um die antimikrobielle Aktivität der Peptide zu überprüfen, wurde ein Mikrodilutionstest durchgeführt. Dazu wurde ein Schikane-Kolben mit Luria Bertani (LB) Medium (siehe Tabelle 17) mit *E. coli* BL21 angeimpft und über Nacht bei 37°C und 170 rpm inkubiert. Am nächsten Tag, als sich die Kultur in der exponentiellen Phase befand, wurde die optische Dichte bei 620 nm am Photometer bestimmt. Da die optische Dichte von *E. coli* bei ungefähr $8,8 \cdot 10^8$ Colony Forming Unit (CFU)·m⁻¹ eins beträgt, wurde das als Umrechnungsfaktor benutzt. Die gemessene optische Dichte von der Kultur wurde in die CFU·m⁻¹ umgerechnet und entsprechend der Zielzellzahl von 10^7 CFU·m⁻¹ wurde die Kultur mit LB-Medium verdünnt.

In der Mikrotiterplatte wurde eine Verdünnungsreihe von den Peptiden CK33 und NK-2 hergestellt. In der ersten Vertiefung der Spalte wurden 90 µl Peptidlösung mit der Konzentration 64 µg/ml pipettiert. Ab der zweiten bis zu der achten Vertiefung der Spalte wurden 90 µl HEPES Puffer vorgelegt (siehe Tabelle 18). Dann wurden in der zweiten Vertiefung 90 µl von der Peptidlösung mit der Konzentration 64 µg/ml hinzugegeben. Aus der zweiten Vertiefung wurden 90 µl in die dritte pipettiert, aus der dritten Vertiefung 90 µl in die vierten usw. bis zur achten Vertiefung. So wurde eine Verdünnungsreihe mit der Konzentration 64 µg/ml bis 0,5 µg/ml hergestellt. Nach der Erstellung der Verdünnungsreihe wurde in jede Vertiefung 10 µl einer 10^7 CFU·ml⁻¹ Bakteriensuspension hinzugefügt.

Die Mikrotiterplatte wurde mit einer gaspermeablen Membran verschlossen und es wurde die Absorption gemessen. Als Nächstes wurde die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag wurden erneut die OD-Werte bei 620 nm gemessen. Es wurde die Differenz berechnet und die MIC der Peptide bestimmt. Die Proben wurden in Doppelbestimmung analysiert und das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Nachdem die antimikrobielle Aktivität der Peptide überprüft wurde, wurde die optische Dichte des Harzes mit dem gebundenen Peptid CK33 gemessen (siehe Abschnitt 4.6). Kein Nachwuchs der Bakterien auf dem Harz würde die erfolgreiche Kopplung bestätigen. Zuerst musste aber festgestellt werden, dass die Trübung des Harzes den OD-Wert nicht beeinflusst. Dafür wurde als Kontrolle die Harzsuspension einmal ohne Bakterien und einmal mit Bakterien gemessen. Die Kontrolle wurde genauso wie die Harzprobe mit dem gebundenen Peptid CK33 behandelt.

Es wurde Kopplungspuffer im Verhältnis 1:5 mit Harzsuspension zusammengesetzt. Als Nächstes wurden die Proben so behandelt:

Kontrolle 1: Harzsuspension ohne Bakterienkultur

Aus der Kopplungspuffer im Verhältnis 1:5 mit Harzsuspension wurden 200 µl genommen und zwei Mal mit HEPES Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen. Als Nächstes wurde die Harzsuspension mit Kopplungspuffer in 720 µl HEPES Puffer aufgenommen. In einer Spalte wurden in jeder Vertiefung 90 µl Lösung pipettiert. Die Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen.

Kontrolle 2: Harzsuspension mit Bakterienkultur

Aus der Kopplungspuffer im Verhältnis 1:5 mit Harzsuspension wurden 50 µl genommen und zweimal mit HEPES Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen. Als Nächstes wurde die Harzsuspension mit Kopplungspuffer in 180 µl HEPES Puffer aufgenommen. In zwei Vertiefungen in der Mikrotiterplatte wurden jeweils 90 µl pipettiert und dazu wurden 10 µl einer 10^7 CFU·ml⁻¹ Bakteriensuspension hinzugegeben.

Harz mit gebundenem CK33 Peptid

Die Harzprobe mit dem gebundenen Peptid wurde zweimal mit HEPES Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen. Als Nächstes wurden 50 µl in 180 µl HEPES Puffer aufgenommen. In zwei Vertiefungen in der Mikrotiterplatte wurden jeweils 90 µl pipettiert und dazu wurden 10 µl einer 10^7 CFU·ml⁻¹ *E. Coli* Suspension hinzugegeben.

Die Mikrotiterplatte wurde mit Gas permeablen Membran abgedeckt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die OD-Werte bei 620 nm gemessen.

Tabelle 17: LB-Medium, Volumen 1 l

Komponente	Anteil	Menge für 1 l
Hefeextrakt	0,5 %	5 g/L
Pepton	1 %	10 g/L
NaCl	0,5 %	5 g/L

Tabelle 18: HEPES Puffer, pH-Wert 7,0, Volumen 200 ml

Komponente	Anteil	Menge für 200 ml
HEPES	20 mM	0,9532 g
NaCl	150 mM	1,7532 g

5. Ergebnisse

5.1 Reduktion der Peptide CK33 und Aspidasept mittels DTT und TCEP und Bestimmung der Nachweisgrenze durch SDS-PAGE

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Tricin-SDS-PAGE Gele präsentiert. Mit dieser Methode wurde die Nachweisgrenze sowie die Reduktion der Peptide CK33 und Aspidasept mittels DTT und TCEP dargestellt. In den Abbildungen 7-9 wurde die Fläche unter der Bande 6500 Da, sowie die leeren Probenaschen der Gele abgeschnitten, um eine bessere Darstellung der Ergebnisse zu gewährleisten. In den Abbildungen 10-12 wurden die leeren Probenaschen abgeschnitten.

In Abbildung 7 ist die Verdünnungsreihe des nicht reduzierten Peptids CK33 dargestellt. Die geringen Peptidmengen von 0,01 µg bis 0,1 µg sind nicht erkennbar. In den anderen Probenaschen die eine Peptidmenge von 0,3 µg, 1 µg und 3 µg haben, sind jeweils drei Banden zu sehen. Bei der Peptidmenge 0,3 µg sind die Banden schwer zu erkennen. Die Bandbreite nimmt mit der Peptidmenge zu. In Abbildung 8 und 9 sind die mit DTT und TCEP reduzierten Peptidproben dargestellt. In beiden Abbildungen sind die Peptidmengen von 0,1 µg bis 3 µg zu sehen. Die Bande bei 0,1 µg ist sehr schwach, während die Bande bei 3 µg sehr gut erkennbar ist. Die Probenasche bei 3 µg ist aber überladen, deswegen sieht die Bande im Gel höher aus als es tatsächlich ist. Das führt zur Schlussfolgerung, dass eine geeignete Peptidmenge von 0,5 µg bis 1,5 µg ist. In beiden Abbildungen 8 und 9 ist in den Probenaschen nur eine Bande zu sehen, im Vergleich zu Abbildung 7 wobei jeweils drei Banden zu sehen sind. Das liegt daran, dass in der nicht reduzierten Form die Disulfidbrücken der Cysteinreste intakt sind und dadurch werden Dimere und Oligomere gebildet. In der reduzierten Form sind die Disulfidbrücken reduziert, deswegen können sich keine Dimere und Oligomere bilden und CK33 bleibt in seiner Form als Monomer. Das ist daran zu erkennen, dass diese Bande auf der gleichen Höhe, sowohl in der reduzierten als auch in der nicht reduzierten Form scheint. Es lässt sich sagen, dass die

Reduktion des Peptids mit DTT und TCEP erfolgreich war. Auch hier ist die Peptidmenge zwischen 0,5 µg und 1,5 µg geeignet als Arbeitsmenge für die nachfolgenden Versuche. In der Abbildung 10 ist die nicht reduzierte Verdünnungsreihe von Aspidasept dargestellt. Hier ist das Peptid in der Menge 0,1 µg bis 3 µg zu sehen. Es fällt auf, dass in den kleinen Konzentrationen die erste Bande in der Höhe von ungefähr 9000 Da deutlicher zu sehen ist. Hier ist die Zunahme der Bandbreite mit erhöhter Peptidmenge minimal. In den Abbildungen 11 und 12 sind die mit DTT und TCEP reduzierten Aspidaseptproben dargestellt. Die erkennbare Peptidmenge ist zwischen 0,1 µg und 3 µg, wobei 0,1 µg sehr schwer sichtbar ist. Eine angemessene Arbeitsmenge wäre wie bei CK33 zwischen 0,5 µg und 1,5 µg. In den Abbildungen 10, 11 und 12 sind zwei Banden zu sehen. Die Banden in der Abbildung 10 liegen jedoch nicht in der gleichen Höhe im Gel wie die Banden der reduzierten Proben. Es kann angenommen werden, dass die Bande mit dem Molekulargewicht von 9000 Da (unreduziertes Peptid) das Dimer von Aspidasept darstellt, weil sie in den reduzierten Proben nicht mehr zu sehen ist. Die andere Bande bei ungefähr 5000 Da sollte das Monomer von Aspidasept darstellen. Sie kommt in der reduzierten Form wieder vor. Die zweite Bande in den Abbildungen 11 und 12, die sehr nah am Monomer liegt, könnte das Peptid mit anderer Konformation darstellen.

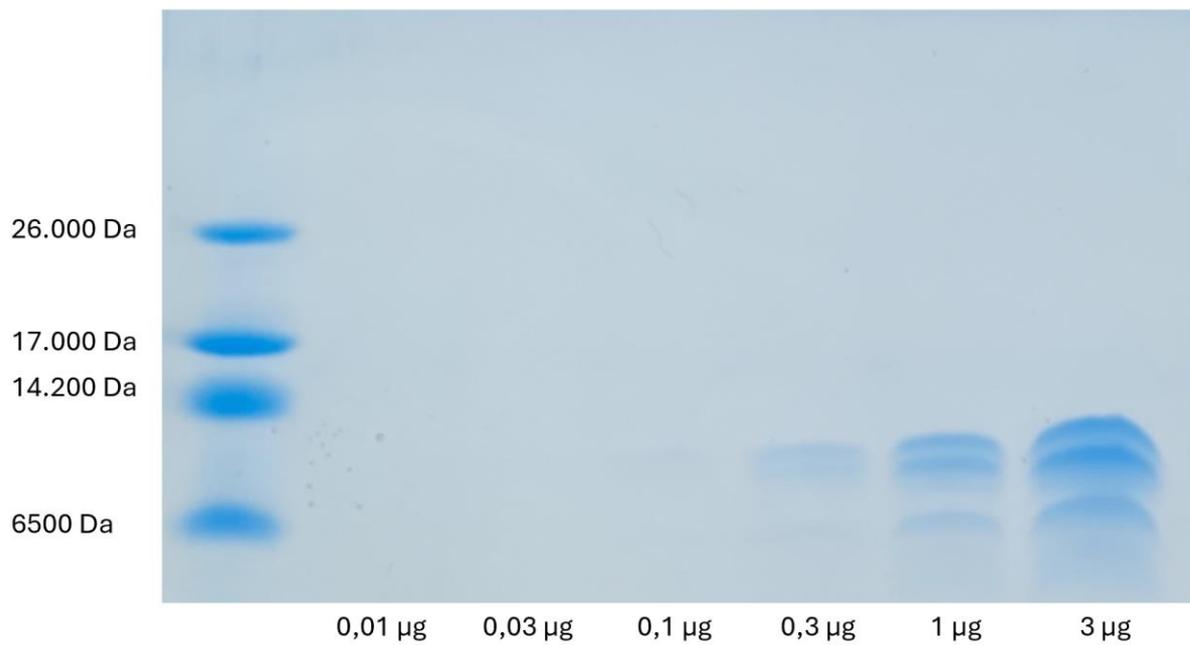


Abbildung 7: Tricin-SDS-PAGE Analyse der nicht reduzierten Proben des Peptids CK33. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.

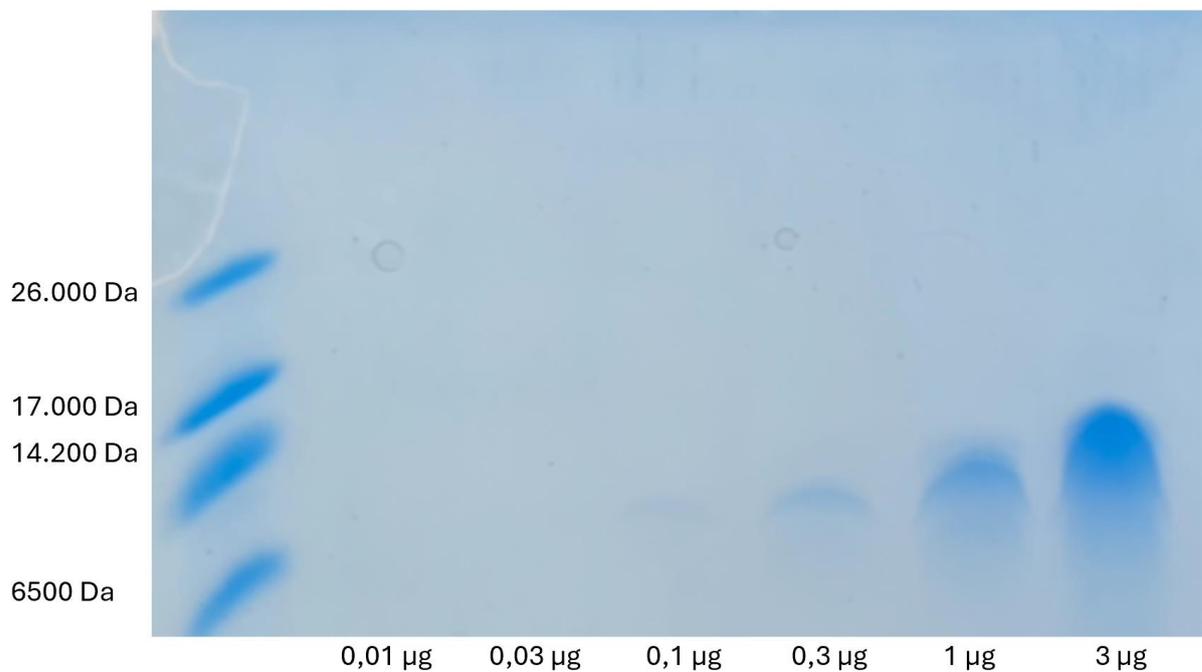


Abbildung 8: Tricin-SDS-PAGE Analyse der mit DTT reduzierten Proben des Peptids CK33. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Proben wurden mit 100 mM DTT reduziert. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.

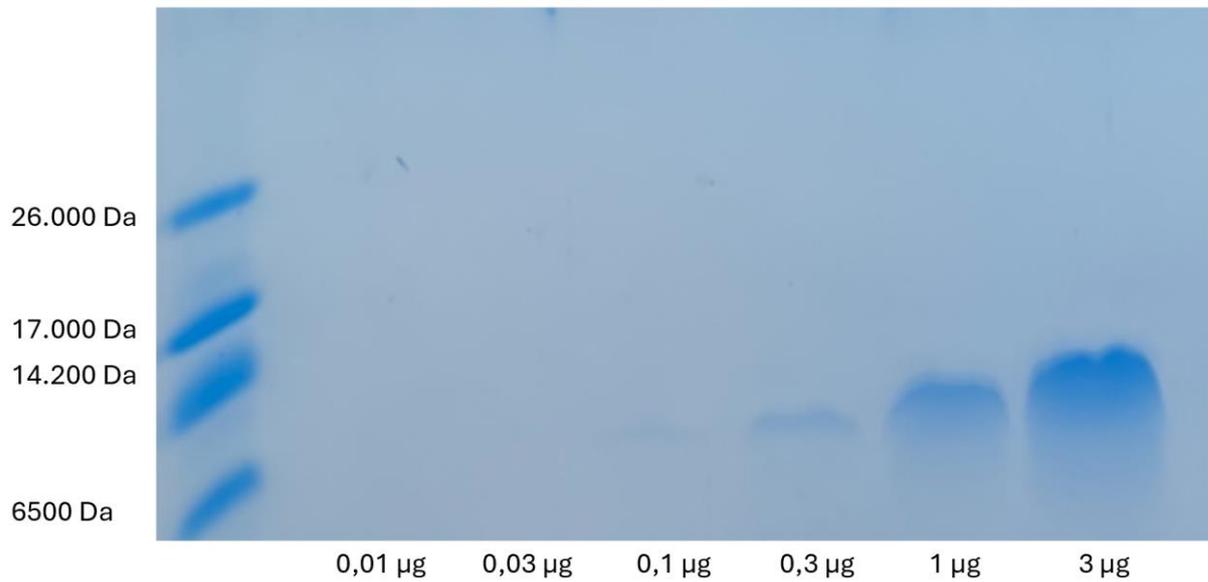


Abbildung 9: Tricin-SDS-PAGE Analyse der mit TCEP reduzierten Proben des Peptids CK33. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Proben wurden mit 200 mM TCEP reduziert. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.

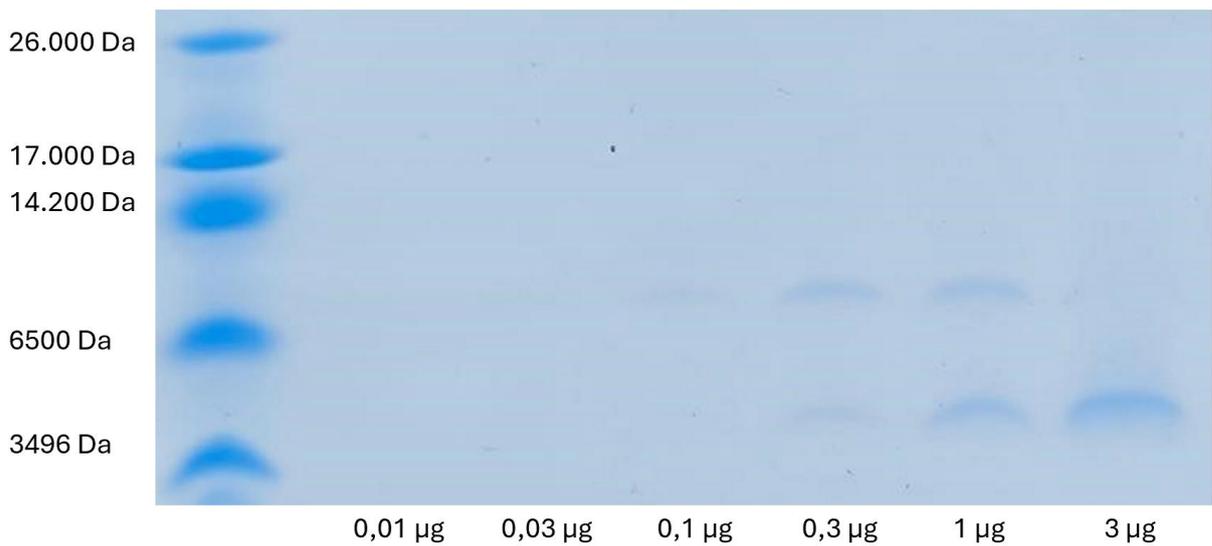


Abbildung 10: Tricin-SDS-PAGE Analyse der nicht reduzierten Proben des Peptids Aspidasept. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.

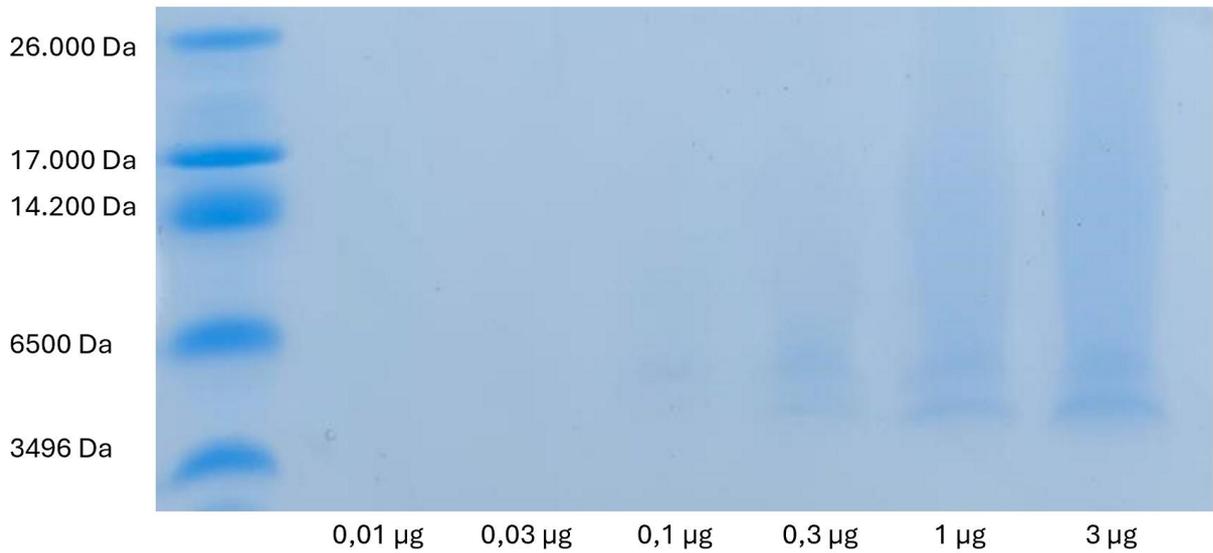


Abbildung 11: Tricin-SDS-PAGE Analyse der mit DTT reduzierten Proben des Peptids Aspidasept. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Proben wurden mit 100 mM DTT reduziert. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.

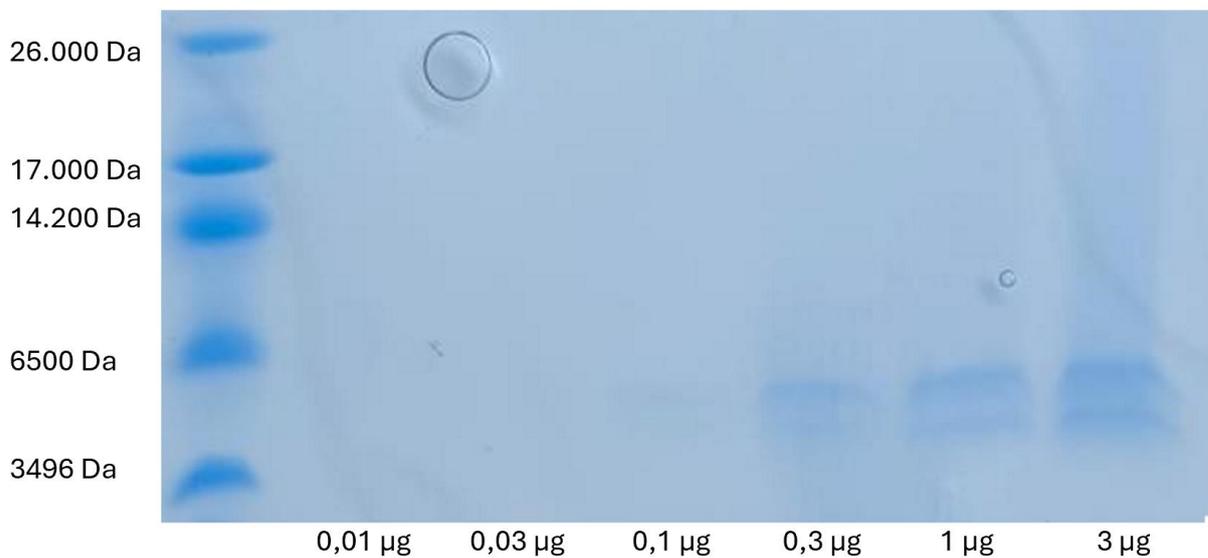


Abbildung 12: Tricin-SDS-PAGE Analyse der mit TCEP reduzierten Proben des Peptids Aspidasept. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Proben wurden mit 200 mM TCEP reduziert. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.

5.2 Kopplung

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der vorgenommenen Modifikationen dargestellt. Nach der Kopplung wurde mittels Tricin-SDS-PAGE der Überstand und die negative Kontrolle analysiert. Um eine bessere Darstellung zu gewährleisten, wurden die leeren Probestaschen, sowie die Fläche unter der Bande 6500 Da abgeschnitten. Die Ergebnisse der Kopplungsversuche von den Peptiden CK33 und Aspidasept ans Harz sind in den Abbildungen 13-16 dargestellt. Dabei wurden die Drehzahl im Thermomixer, die Menge des verwendeten Harzes sowie die Inkubationszeiten variiert. Es wurden folgende Kombinationen ausprobiert:

A: Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis von 1:4 und eine Stunde bei Drehzahl 1150 rpm im Thermomixer geschwenkt. CK33 wurde in 0,01 % TFA gelöst.

B: Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis von 1:4 und Erhöhung der Inkubationszeit auf zwei Stunden bei Drehzahl 1150 rpm im Thermomixer. CK33 wurde in 0,01 % TFA gelöst.

C: Erhöhung von Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis auf 1:5, Erhöhung der Inkubationszeit auf zwei Stunden und Drehzahl auf 1110 rpm im Thermomixer. CK33 wurde in Kopplungspuffer gelöst.

D: Peptid Aspidasept-Harzsuspension-Verhältnis von 1:5, Inkubationszeit von zwei Stunden und Drehzahl 1110 rpm im Thermomixer. Aspidasept wurde in 0,01 % TFA gelöst.

Im Abschnitt 5.1 wurde festgestellt, dass zwischen Peptidmenge und Farbintensität ein Zusammenhang besteht. Da es in Abbildung 13 keine Änderung der Farbintensität zwischen Kopplungsansatz und Kontrolle zu beobachten ist, deutet das auf eine nicht erfolgreiche Kopplung des Peptids CK33 an das Harz hin. Es befindet sich genauso viel Peptid im Überstand wie in der Kontrolle.

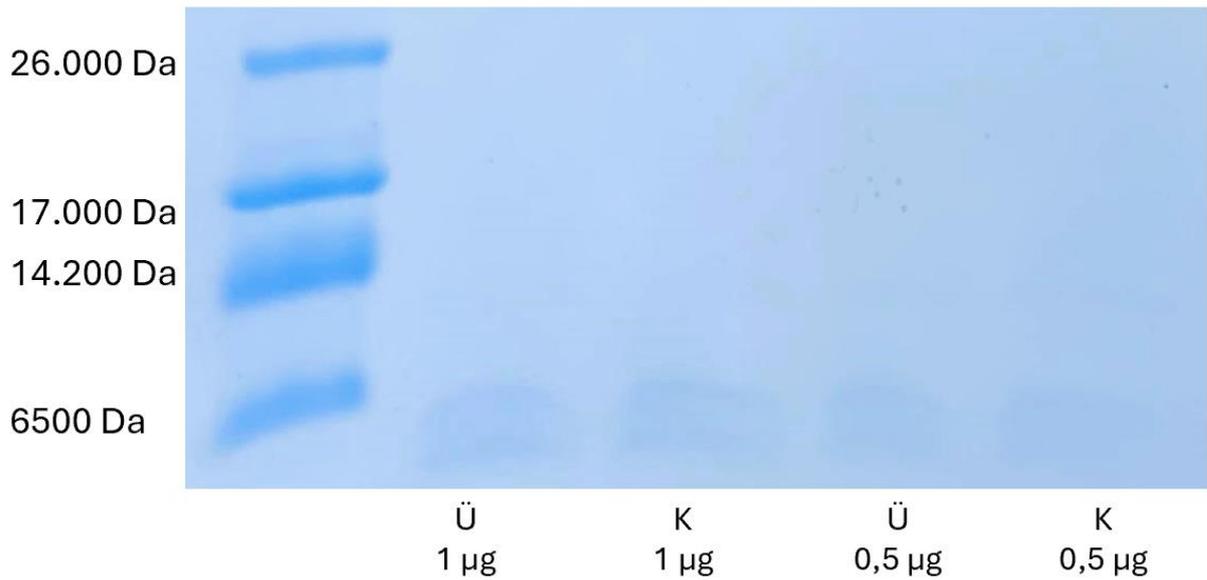


Abbildung 13: Analyse der Kopplung von CK33 an Harz mithilfe von Tricine-SDS-PAGE. Analog zum Kopplungsansatz wird als Referenz der Kontrollansatz, hier als K bezeichnet, dargestellt. Ü steht für Überstand, der nach der Kopplungsreaktion entnommen wurde. Es wurden die folgenden Parameter kombiniert: Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis von 1:4 und eine Stunde bei der Drehzahl 1150 rpm im Thermomixer geschwenkt. CK33 wurde in 0,01 % TFA gelöst. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 90 V und die Gele wurden abschließend mit Roti-Blue Färbelösung gefärbt.

In Abbildung 14 hingegen ist ein deutlicher Unterschied in der Farbintensität zwischen Überstand und Kontrolle zu sehen. Im Überstand befindet sich weniger Peptid, was auf eine nicht vollständige Kopplung hinweist. Dieser Farbunterschied ist sehr schwer erkennbar bei der Peptidmenge von 0,5 µg. Anders als in Abbildung 9 sind hier und in der Abbildung 13 nach der Reduktion mit TCEP zwei dicke Banden und eine dritte sehr schmale Bande zu beobachten. Das lässt sich möglicherweise auf die Aggregation der Disulfidbrücken zurückführen.

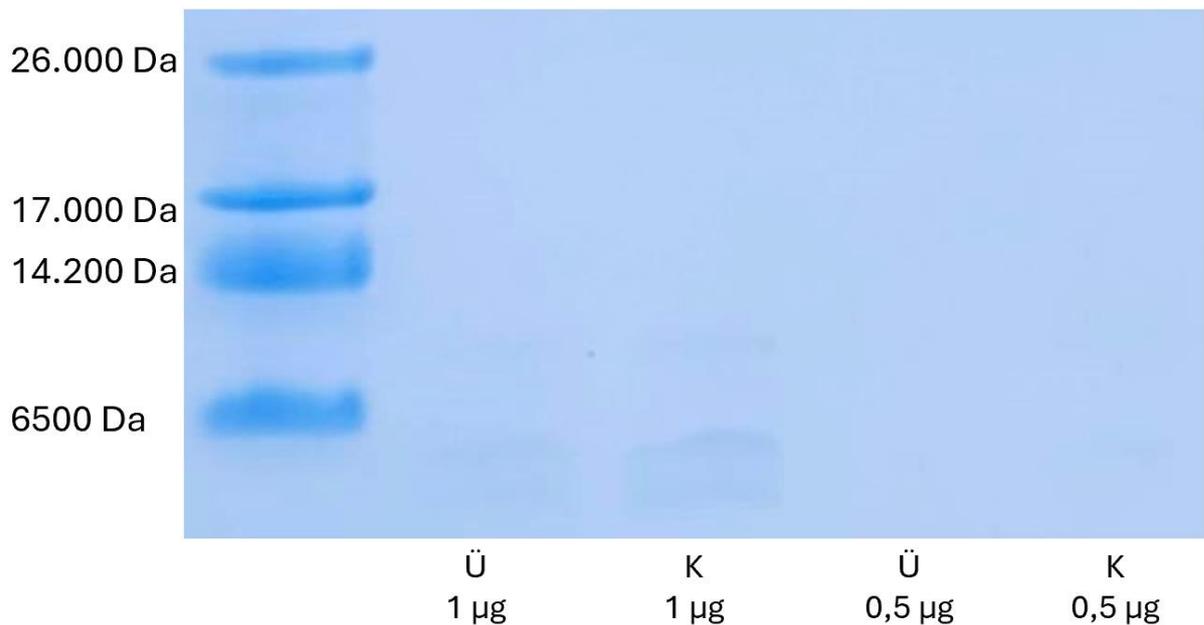


Abbildung 14: Analyse der Kopplung von CK33 an Harz mithilfe von Tricin-SDS-PAGE. Analog zum Kopplungsansatz wird als Referenz der Kontrollansatz, hier als K bezeichnet, dargestellt. Ü steht für Überstand, der nach der Kopplungsreaktion entnommen wurde. Es wurden die folgenden Parameter kombiniert: Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis von 1:4, Erhöhung der Inkubationszeit auf zwei Stunden und Schwenkung bei der Drehzahl 1150 rpm im Thermomixer. CK33 wurde in 0,01 % TFA gelöst. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 90 V und die Gele wurden abschließend mit Roti-Blue Färbelösung gefärbt.

In Abbildung 15 ist das Ergebnis des Experiments dargestellt, das gemäß der Kombination C durchgeführt wurde: Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis 1:5, Inkubationszeit von zwei Stunden und Drehzahl 1110 rpm. CK33 wurde in Kopplungspuffer gelöst. Hier ist das Peptid in der Menge von 0,83 µg nur in der Kontrolle zu sehen und nicht im Überstand. Das lässt auf eine erfolgreiche Kopplung schließen. Die kleine Peptidmenge von 0,42 µg ist nicht sichtbar.

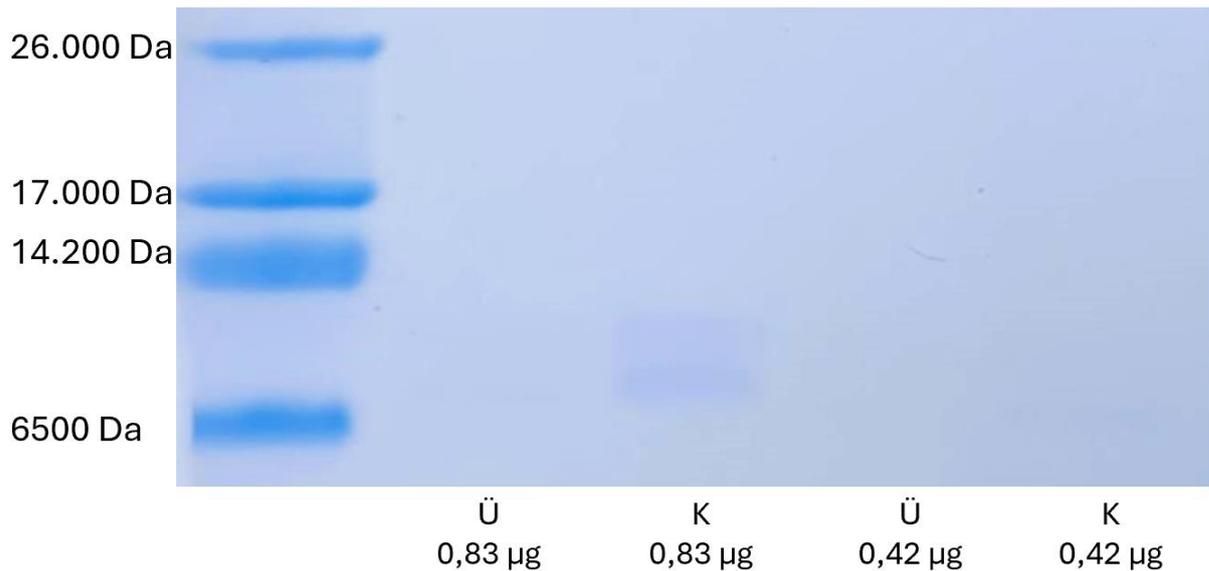


Abbildung 15: Analyse der Kopplung von CK33 an Harz mithilfe von Tricin-SDS-PAGE. Analog zum Kopplungsansatz wird als Referenz der Kontrollansatz, hier als K bezeichnet, dargestellt. Ü steht für Überstand, der nach der Kopplungsreaktion entnommen wurde. Es wurden die folgenden Parameter kombiniert: Erhöhung von Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis auf 1:5, Erhöhung der Inkubationszeit auf zwei Stunden und Drehzahl auf 1110 rpm im Thermomixer. CK33 wurde in Kopplungspuffer gelöst. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 90 V und die Gele wurden abschließend mit Roti-Blue Färbelösung gefärbt.

In der Abbildung 16 ist die teilweise erfolgreiche Kopplung von Aspidasept an Harz dargestellt. Es ist eine signifikante Abnahme der Farbintensität des Überstands im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Wie in der Abbildung 12 sind hier auch nach der Reduktion mit TCEP, sowohl in der Kontrolle als auch im Kopplungsansatz zwei Banden gut sichtbar.

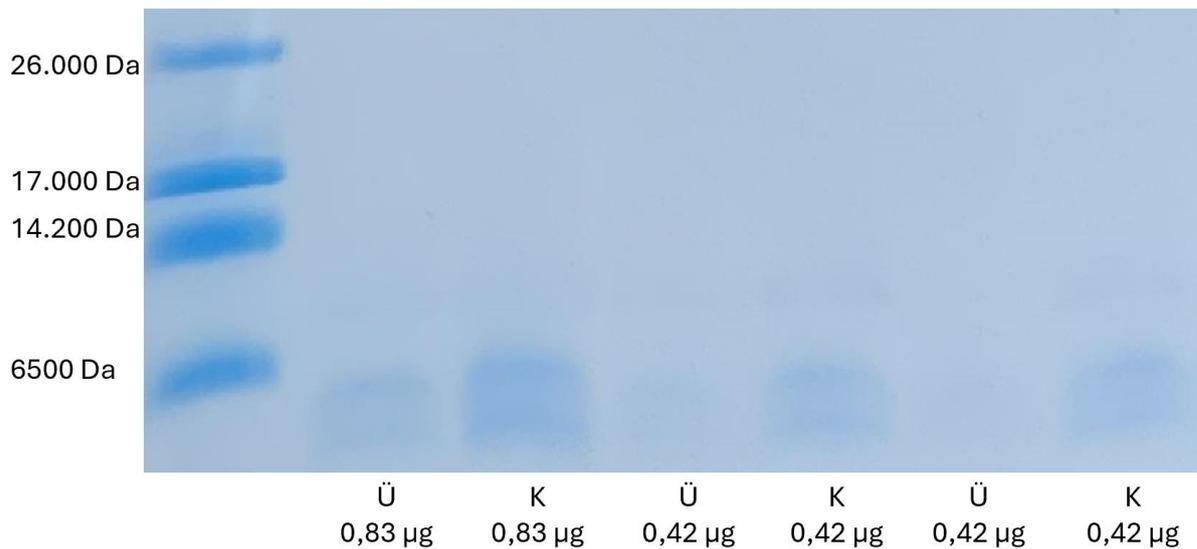


Abbildung 16: Analyse der Kopplung von Aspidasept ans Harz mithilfe von Tricin-SDS-PAGE. Analog zum Kopplungsansatz wird als Referenz der Kontrollansatz, hier als K bezeichnet, dargestellt. Ü steht für Überstand, der nach der Kopplungsreaktion entnommen wurde. Es wurden die folgenden Parameter kombiniert: Peptid Aspidasept-Harzsuspension-Verhältnis von 1:5, Inkubationszeit von zwei Stunden und Drehzahl 1110 rpm im Thermomixer. Aspidasept wurde in 0,01 % TFA gelöst. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 90 V und die Gele wurden abschließend mit Roti-Blue Färbelösung gefärbt.

5.3 Einfluss von 0,01 % TFA auf die Kopplung

Um sicherzustellen, dass der 0,01 % TFA, worin die Peptide gelöst sind, den pH nicht heruntersetzt und somit keinen negativen Einfluss auf die Kopplung hat, wurden die pH-Werte von folgenden Lösungen gemessen:

- 0,01% TFA
- Kopplungspuffer
- 0,01 % TFA und Kopplungspuffer im Verhältnis 1:4

Wie in Abbildung 18 dargestellt, ist der pH von der Lösung aus 0,01 % TFA und Kopplungspuffer im Verhältnis 1:4, gleich wie der pH-Wert vom Kopplungspuffer. Das bedeutet, dass der 0,01 % TFA die Kopplung nicht hindert.

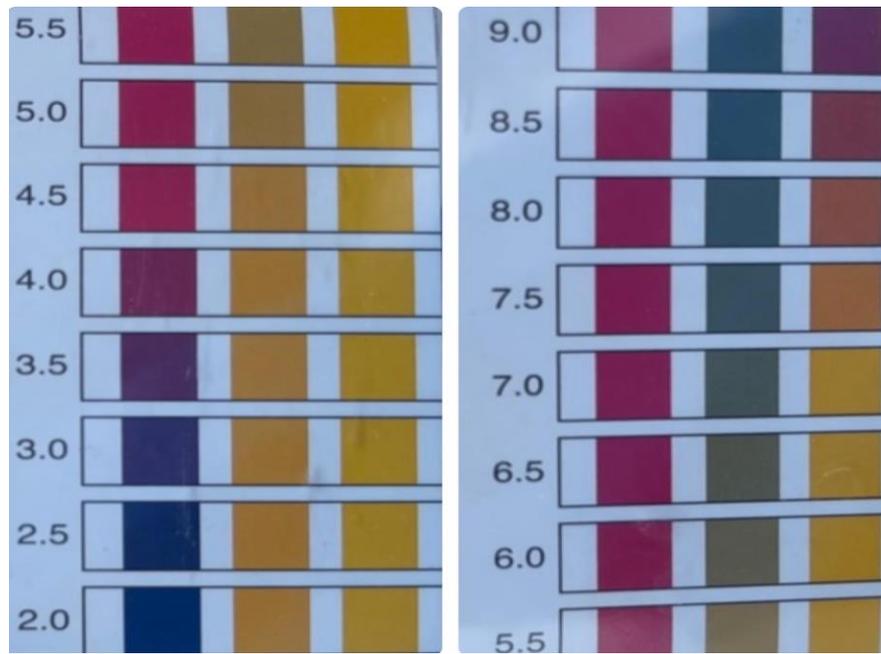


Abbildung 17: Farbreferenzskala von pH 2 bis pH 9

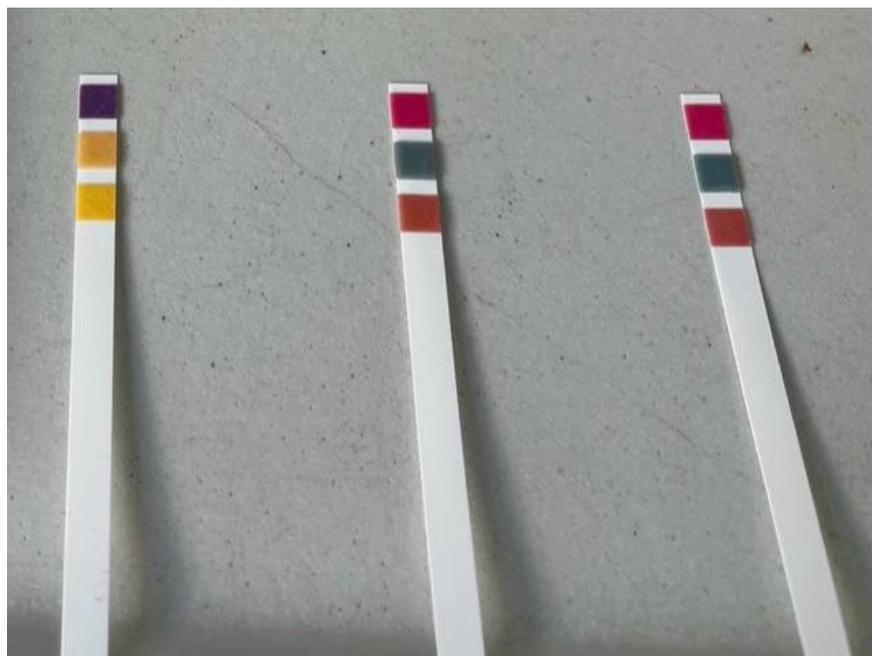


Abbildung 18: Ergebnisse der pH-Messung der Proben mit pH-Papier. Links ist der pH-Messung von 0,01 % TFA, in der Mitte von 0,01 % TFA im Verhältnis 1:4 mit Kopplungspuffer und rechts die Messung vom Kopplungspuffer dargestellt. 0,01 % TFA hat ein pH von ungefähr 3, während 0,01 % TFA im Verhältnis 1:4 mit Kopplungspuffer und der Kopplungspuffer ein pH-Wert von ungefähr 8 zeigen.

5.4 Charakterisierung der Peptidbindungen mittels Infrarotspektroskopie und Mikrodilutionstest

5.4.1 Infrarotspektroskopie

In dem Infrarotspektrum von Lysozym als Feststoff sind drei charakteristische Peaks für eine Proteinstruktur zu erkennen.

Zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} befindet sich ein Peak, das auf die C=O Streckung der Amid-Bindung hindeutet. Das ist die Amid-I-Bande.

Die Amid-II- Bande befindet sich zwischen 1500 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} und zeigt die N-H-Biegeschwingungen und C-N-Streckschwingungen.

In der Amid-III-Bande zwischen 1200 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} befinden sich die N-H-Biegungen und C-C-Schwingungen der Peptidkette, sowie C-N-Streckschwingungen (siehe Abbildung 19) (Tabelle IR-Spektrum).

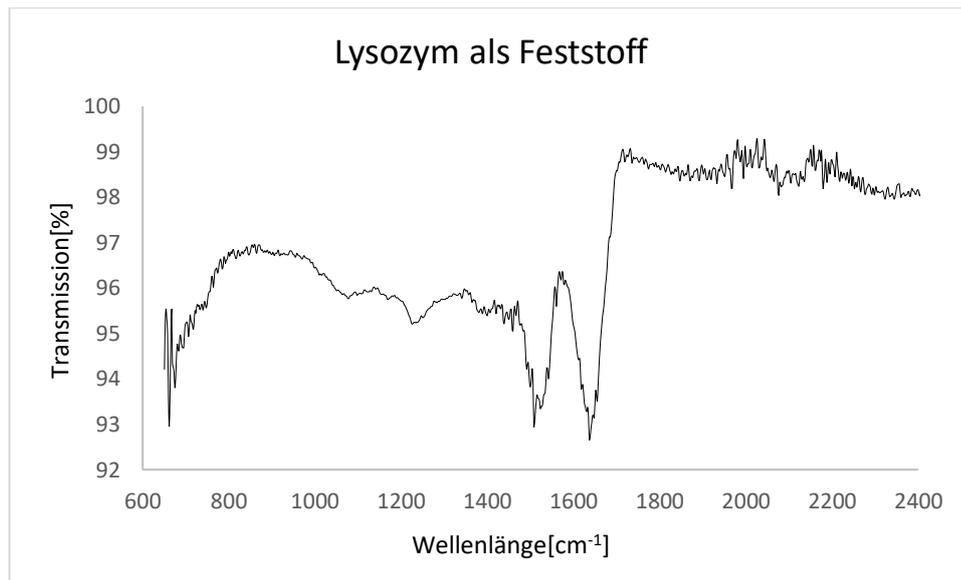


Abbildung 19: IR-Spektrum von Lysozym als Feststoff. Im Bereich $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ist die Amid-I-Bande. Die Amid-II- Bande befindet sich zwischen 1500 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} und die Amid-III-Bande zwischen 1200 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} .

In Abbildung 20 sind die Infrarotspektren von DMSO (rot) und Lysozym gelöst in DMSO in der Konzentration 10 µg/µl (blau) dargestellt. Die beiden IR-Spektren sind fast identisch. Sie unterscheidet nur die Anwesenheit eines zusätzlichen kleinen Peaks im Bereich 1600-1700 cm⁻¹ im blauen Spektrum, was auf die C=O-Streckung Schwingung zurückzuführen ist. Der große Peak bei 1000 cm⁻¹ ist der S=O Streckung der Sulfoxid Gruppe im DMSO zuzuordnen.

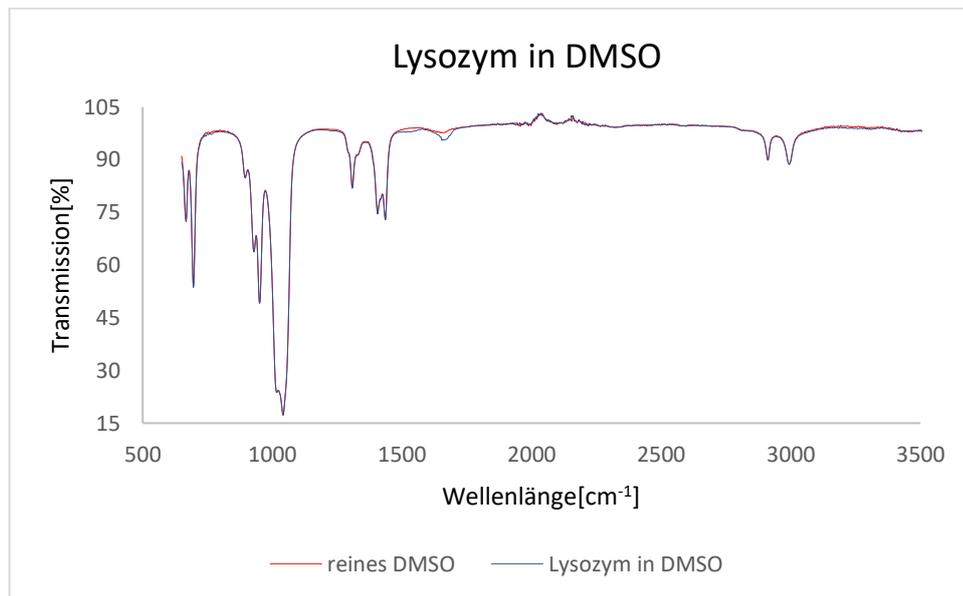


Abbildung 20: IR-Spektrum von Lysozym gelöst in DMSO in der Konzentration 10 µg/µl (blau) und reines DMSO (rot). Bei 1000 cm⁻¹ in beiden Spektren befindet sich der S=O Streckung der Sulfoxid Gruppe im DMSO und bei 1600-1700 cm⁻¹ im blauen Spektrum befindet sich der C=O-Streckung Schwingung.

5.4.2 Mikrodilutionstest

Der Mikrodilutionstest wurde als Methode benutzt, um die antimikrobielle Aktivität von Peptiden zu bestimmen, sowie die Kopplung des Peptids CK33 an Harz nachzuweisen (siehe Abbildung 15). In der Tabelle 19 sind die MIC-Werte des Peptids CK33 und NK-2 dargestellt. NK-2 deutet mit den MIC-Werten zwischen 4 und 8 µg/ml auf eine stärkere Aktivität hin als CK33.

Tabelle 19: Werte der minimalen Hemmkonzentration MIC von Peptiden CK33 und NK-2. Das Experiment wurde dreifach durchgeführt, wobei jede Messung in Doppelbestimmung erfolgte. Die verwendete Bakterienkultur ist *E. Coli* BL21. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Peptid	MIC in µg/ml
CK33	8-16
NK-2	4-8

Als Nächstes wurde die OD₆₂₀ vom Harz mit gebundenen Peptid CK33 gemessen. Um zu überprüfen, ob die Trübung vom Harz einen Störfaktor darstellt, wurde die Harzsuspension einmal ohne Bakterien und einmal mit Bakterien gemessen. Wie in Tabelle 20 dargestellt, zeigt die Harzsuspension bereits ohne Bakterien einen hohen OD-Wert. Zum Vergleich, der OD-Wert einer klaren Lösung wie z. B. Wasser beträgt ungefähr 0,04. Die Trübung des Harzes könnte also das Ergebnis fälschen. Es wird jedoch ein Unterschied zwischen den OD-Werten von den beiden Kontrollen ohne und mit Bakterien bemerkt. Die Kontrolle mit Bakterien hat einen höheren OD-Wert, was auf ein Wachstum von *E. Coli* Kultur hindeutet. Die Harzprobe mit gebundenen CK33 weist einen noch höheren OD-Wert als die Kontrolle auf. Das deutet auf Bakterienwachstum hin.

Tabelle 20: Die OD-Werte gemessen bei 620 nm von Harzsuspensionsproben, einmal ohne und einmal mit Bakterien, sowie vom Harz mit dem gebundenen CK33 Peptid. Die Harzsuspensionsproben wurden genauso wie das Harz mit CK33 behandelt und in der dieselben Menge vom HEPES Puffer aufgenommen. Die verwendete Bakterienkultur ist *E. Coli* BL21. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Probe	OD ₆₂₀
Harzsuspension ohne Bakterien	0,098
Harzsuspension mit Bakterien	0,155
Harz mit gebundenem Peptid CK33	0,254

6. Diskussion

Reduktion

Bei den mit DTT und TCEP reduzierten Proben von Peptid CK33 zeigte sich im Gel eine einzige Bande in jeder Tasche. Das deutet darauf hin, dass die Reduktion der Disulfidbrücken erfolgreich war und keine Dimere oder Multimere mehr vorhanden sind.

Anders sieht das bei der Reduktion von Aspidasept aus, wobei in jeder Geltasche zwei Banden sichtbar sind. Die Banden der reduzierten Proben liegen jedoch sehr nah aneinander, fast auf derselben Höhe im Gel. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob die Reduktion der Disulfidbrücken erfolgreich war. Da die Bande bei 9000 Da in den reduzierten Proben nicht mehr zu beobachten ist, könnte das auf eine erfolgreiche Reduktion der Disulfidbrücken hindeuten. Die zwei Banden bei den mit DTT und TCEP reduzierten Proben, stellen möglicherweise das ursprüngliche Peptid als Monomer und eine andere Konformation des Peptids dar. Diese Konformation könnte womöglich ohne Disulfidbrückenbindungen oder als Veränderung des Peptids durch die Reduktionsmittel zustande gekommen sein. Um die Natur der Banden zu klären und den Erfolg der Reduktion von Aspidasept genauer zu bewerten, wäre es ratsam eine andere Methode wie zum Beispiel die RP-HPLC anzuwenden und die Ergebnisse zu vergleichen.

Auffallend ist, dass die beiden Peptide in der reduzierten Form viel höher im Gel wandern als ihre repräsentativen molekularen Massen von 3,6 kDa und 2,7 kDa erwarten lassen würden. Anscheinend gelingt es dem negativ geladenen SDS-PAGE-Gel nicht, die stark positive Eigenladung der Peptide vollständig zu überdecken. Die noch geladenen Peptide werden im Gel retardiert und eventuell in Monomere, Dimere oder Oligomere getrennt. Die nicht reduzierten Peptide wandern noch höher im Gel, aufgrund der Bildung von Dimeren und Oligomeren und der dadurch bedingten Zunahme der Molekülgröße.

Immobilisierung an Harz

Eine erfolgreiche Kopplung von AMP auf Harzpartikeln wurde bereits von Bagheri et al. dokumentiert. In seiner Arbeit wurden MK5E und KLAL unter Anwendung von oximbildenden Ligationsstrategien sowie Thioalkylierungsstrategien an TentaGel immobilisiert. Es wurde gezeigt, dass die Immobilisierung auf der Harzoberfläche beschränkt ist (Bagheri et al., 2009). Ein weiteres Beispiel für eine erfolgreiche Immobilisierung von antimikrobiellen Peptiden auf einer Harzoberfläche wurde in der Arbeit von Haynie et al. dokumentiert. In dieser Forschung wurde eine andere Kopplungsstrategie verwendet. Die carboxyterminale Aminosäure des Peptids wurde an ein mit Ethylendiamin modifiziertes Polyamidharz (PepsynK) gebunden (Haynie, Crum und Doele, 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine erfolgreiche Kopplung des Peptids CK33 ans Harz erreicht. Im Unterschied zu Kombination A wurde im Kombination B die Inkubationszeit verdoppelt (siehe Abschnitt 5.2). Das wirkte sich positiv auf die Immobilisierung aus. Eine vollständige Immobilisierung des CK33 Peptids ans Harz wurde jedoch erreicht, nachdem die Harzmenge, die Inkubationszeit und die Drehzahl im Thermomixer erhöht wurden. Dies wurde durch die Beobachtung festgestellt, dass im SDS-PAGE-Gel nur bei der Kontrolle eine Bande sichtbar war. Es ist anzunehmen, dass die Peptidmoleküle nicht mehr im Überstand gelöst vorliegen, sondern durch Thioetherbindungen ans Harz gekoppelt sind. Die Herstellerangabe, dass 1 mL Harzpartikel 1 mg Peptid binden soll, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es war ein höheres Peptid-Harz-Verhältnis erforderlich.

Es wurde festgestellt, dass 0,01 % TFA keinen negativen Einfluss auf die Kopplung hat. Allerdings hat sich gezeigt, dass eine bessere Immobilisierung des Peptids CK33 ans Harz erzielt wird, wenn das Peptid in Kopplungspuffer gelöst wird, im Vergleich zur Lösung in 0,01 % TFA.

Aspidasept zeigte im Kopplungsversuch mehrere Banden im Gel, trotz Reduktion durch TCEP. Dies könnte vermutlich an der Aggregation der Disulfidbrücken liegen. Eine nicht erfolgreiche Reduzierung durch TCEP ist weniger wahrscheinlich, da es eine Kopplung stattgefunden hat, was auf die Anwesenheit freier Sulfhydrylgruppen zurückzuführen ist.

Obwohl das Peptid-Harz-Verhältnis, die Inkubationszeit und die Drehzahl im Thermomixer gleich wie beim Kopplungsversuch von CK33 Peptid waren, konnte im Rahmen dieser Arbeit keine vollständige Kopplung des Aspidasept Peptids beobachtet werden. Allerdings ist eine

deutliche Abnahme der Farbintensität im Überstand im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Die nicht vollständige Kopplung könnte wahrscheinlich an die Peptidsequenz des Peptids Aspidasept liegen. Im Vergleich zu CK33 hat Aspidasept eine kürzere Aminosäuresequenz. Noch dazu hat CK33 einen zusätzlichen Spacer von fünf Aminosäuren zwischen dem Cystein und der Leitsequenz. Diese Unterschiede und vielleicht eine vorteilhaftere räumliche Anordnung der Cysteinreste können für eine erfolgreichere Kopplung des CK33 Peptids sorgen.

Nachweismethoden

Die Infrarotspektroskopie hat sich in dieser Arbeit als keine geeignete Nachweismethode für die immobilisierten AMP erwiesen. Obwohl die charakteristische C=O-Streckung im Bereich 1600-1700 cm^{-1} zu sehen ist, ist diese sehr schwach ausgeprägt und vermutlich auf die hohe Konzentration 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ von Lysozym in DMSO zurückzuführen. Dies wäre jedoch nicht aussagekräftig, da die Konzentration der gebundenen Peptide ans Harz normalerweise deutlich niedriger ist. Die Untersuchung von Lysozym als Feststoff mit der IR-Spektroskopie hat besser funktioniert und die Peptidbindungen nachgewiesen.

Der Mikrodilutionstest wurde nicht nur als Nachweismethode evaluiert, sondern auch dafür durchgeführt, um die antimikrobielle Aktivität der CK33 und NK-2 zu bestimmen. Nach wiederholten Experimenten wurde festgestellt, dass NK-2 in einer geringeren Peptidkonzentration das bakterielle Wachstum hemmt und somit eine höhere antimikrobielle Effektivität als CK33 aufweist. Die MIC-Werte liegen bei 4–8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für NK-2 und bei 8–16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für CK33. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Masterarbeit von Lesniewski beobachtet, wobei die MIC-Werte der fast allen untersuchten C-Terminus amidierten Peptide im Bereich von 4 bis 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lagen. Überraschenderweise zeigte in derselben Arbeit ein am C-Terminus nicht amidiertes Peptid eine stärkere antimikrobielle Aktivität.

Als Nachweismethode für die immobilisierten AMP hat sich der Mikrodilutionstest nur bedingt geeignet erwiesen. Es hat sich herausgestellt, dass das Harz einen hohen OD-Wert zeigt. Durch die Trübung des Harzes könnte die Messung der antimikrobiellen Aktivität von den gekoppelten Peptiden im Mikrodilutionstest verfälscht werden. Darüber hinaus stellt die geringe Peptidkonzentration eine Herausforderung dar. Zudem wurde in der Arbeit von Bagheri et al. gezeigt, dass die antimikrobielle Aktivität von gebundenen Peptiden in einem

Mikrodilutionstest um zwei Größenordnungen im Vergleich zu den freien Peptiden verringert wurde. Das könnte ein der Gründe sein, warum keine antimikrobielle Wirksamkeit nachgewiesen wurde (Bagheri et al., 2009).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine alternative Nachweismethode zur Bestätigung der Immobilisierung antimikrobieller Peptiden ans Harz in Betracht zu ziehen. Die Massenspektrometrie könnte eine gute Möglichkeit für die Analyse und Charakterisierung der immobilisierten Peptide sein (Shah et al., 2015).

7. Fazit und Ausblick

Diese Bachelorarbeit befasste sich mit der Immobilisierung von cysteinhaltigen antimikrobiellen Peptide CK33 und Aspidasept auf Agarosebeads. Nach verschiedenen Anpassungen und Versuchen wurde das Peptid CK33 erfolgreich und vollständig ans Harz immobilisiert, während Aspidasept nur teilweise auf die Harzpartikeln gekoppelt wurde.

Auch bei der Reduktion der Peptide mittels DTT und TCEP zeigte das CK33 Peptid im Vergleich zu Aspidasept zufriedenstellendere Ergebnisse. Es konnte abschließend nicht geklärt werden, warum Aspidasept nach der Reduktion zwei Banden im Gel zeigt. Für Aspidasept besteht weiterer Forschungsbedarf, sowohl um das Reduktionsverhalten des Peptids besser zu verstehen als auch um eine vollständige Immobilisierung ans Harz zu erzielen.

Durch einen Mikrodilutionstest wurden die MIC-Werte der Peptide NK-2 und CK33 bestimmt und es wurde festgestellt, dass NK-2 eine höhere antimikrobielle Wirksamkeit zeigt. Die in dieser Arbeit zur Bestätigung der Kopplung evaluierten Nachweismethoden, die Infrarotspektroskopie und der Mikrodilutionstest zeigten keinen Erfolg.

Zukünftige Schritte könnten die Identifizierung einer geeigneten Nachweismethode zur Bestätigung der Immobilisierung umfassen. Die Massenspektrometrie könnte hierfür angewendet werden.

8. Literaturverzeichnis

Andersson, M. et al. (1995) 'NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity.', *The EMBO Journal*, 14(8), pp. 1615–1625. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07150.x>.

Andrä, J. et al. (2004) 'Biophysical characterization of endotoxin inactivation by NK-2, an antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5), pp. 1593–1599. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1593-1599.2004>.

Andrä, J. et al. (2024) 'Structural analysis of the NK-lysin-derived peptide NK-2 upon interaction with bacterial membrane mimetics consisting of phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1866(3), p. 184267. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2023.184267>.

Andrade, C.A. (2016) 'Chemical immobilization of antimicrobial peptides on biomaterial surfaces', *Frontiers in Bioscience*, 8(1), pp. 129–142. Available at: <https://doi.org/10.2741/s453>.

ATR-FTIR Spectroscopy, FTIR Sampling Techniques | Agilent (no date). Available at: <https://www.agilent.com/en/product/molecular-spectroscopy/ftir-spectroscopy/atr-ftir-spectroscopy> (Accessed: 15 July 2024).

Bagheri, M., Beyermann, M. and 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), pp. 1132–1141. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01254-08>.

Bellotti, D. and Remelli, M. (2022) 'Lights and Shadows on the Therapeutic Use of Antimicrobial Peptides', *Molecules*, 27(14), p. 4584. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules27144584>.

Chen, C.H. and Lu, T.K. (2020) 'Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications', *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(1), p. 24. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024>.

Cho, W.-M. et al. (2007) 'Design and synthesis of novel antibacterial peptide-resin conjugates', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(21), pp. 5772–5776. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.08.056>.

Escobar, A., Muzzio, N. and Moya, S.E. (2020) 'Antibacterial Layer-by-Layer Coatings for Medical Implants', *Pharmaceutics*, 13(1), p. 16. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010016>.

Etienne, O. et al. (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), pp. 3662–3669. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3662-3669.2004>.

Gutsmann, T. et al. (2010) 'New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9), pp. 3817–3824. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00534-10>.

Haynie, S.L., Crum, G.A. and Doele, B.A. (1995) 'Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(2), pp. 301–307. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.39.2.301>.

Heinbockel, L. et al. (2015) 'Therapeutical Administration of Peptide Pep19-2.5 and Ibuprofen Reduces Inflammation and Prevents Lethal Sepsis', *PLoS One*, 10(7), p. e0133291. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133291>.

Huan, Y. et al. (2020) 'Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields', *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 582779. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>.

Ivanov, I.E. et al. (2012) 'Creating antibacterial surfaces with the peptide chrysopsin-1', *ACS applied materials & interfaces*, 4(11), pp. 5891–5897. Available at: <https://doi.org/10.1021/am301530a>.

Karmakar, S., Maity, P. and Halder, A. (2017) 'Charge-Driven Interaction of Antimicrobial Peptide NK-2 with Phospholipid Membranes', *ACS omega*, 2(12), pp. 8859–8867. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01222>.

Luo, Y. and Song, Y. (2021) 'Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), p. 11401. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>.

Müller, D. (2021) 'Smart peptides — innovative Anwendungen in Biotechnologie und Pharmazie', *BIOspektrum*, 27(7), pp. 776–779. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12268-021-1673-6>.

Nicolas, M. et al. (2021) 'Strategies for Antimicrobial Peptides Immobilization on Surfaces to Prevent Biofilm Growth on Biomedical Devices', *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(1), p. 13. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010013>.

Pasupuleti, M., Schmidtchen, A. and Malmsten, M. (2012) 'Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system', *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2), pp. 143–171. Available at: <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>.

Rapsch, K. et al. (2014) 'Identification of antimicrobial peptides and immobilization strategy suitable for a covalent surface coating with biocompatible properties', *Bioconjugate Chemistry*, 25(2), pp. 308–319. Available at: <https://doi.org/10.1021/bc4004469>.

Riool, M. et al. (2017) 'Antimicrobial Peptides in Biomedical Device Manufacturing', *Frontiers in Chemistry*, 5, p. 63. Available at: <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00063>.

Schägger, H. (2006) 'Tricine–SDS–PAGE', *Nature Protocols*, 1(1), pp. 16–22. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>.

Schuerholz, T. et al. (2013) 'The anti-inflammatory effect of the synthetic antimicrobial peptide 19-2.5 in a murine sepsis model: a prospective randomized study', *Critical Care (London, England)*, 17(1), p. R3. Available at: <https://doi.org/10.1186/cc11920>.

Shah, P. et al. (2015) 'Tissue proteomics using chemical immobilization and mass spectrometry', *Analytical Biochemistry*, 469, pp. 27–33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.09.017>.

Singh, B.P. et al. (2023) 'Nano-Conjugated Food-Derived Antimicrobial Peptides As Natural Biopreservatives: A Review of Technology and Applications', *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(2), p. 244. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020244>.

Stewart, C. et al. (2019) 'A review of biomimetic surface functionalization for bone-integrating orthopedic implants: Mechanisms, current approaches, and future directions', *Progress in Materials Science*, 106, p. 100588. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2019.100588>.

Table IR-Spektrum (no date). Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table?report=reader> (Accessed: 18 July 2024).

Von Deuster, C.I.E. and Knecht, V. (2012) 'Antimicrobial selectivity based on zwitterionic lipids and underlying balance of interactions', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(9), pp. 2192–2201. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.012>.

Willcox, M.D.P. et al. (2008) 'A novel cationic-peptide coating for the prevention of microbial colonization on contact lenses', *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), pp. 1817–1825. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03942.x>.

Wu, M. et al. (1999) 'Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*', *Biochemistry*, 38(22), pp. 7235–7242. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi9826299>.

Yasir, M. et al. (2020) 'Mechanism of Action of Surface Immobilized Antimicrobial Peptides Against *Pseudomonas aeruginosa*', *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 3053. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03053>.

9. ANHANG

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der angewandten Peptide und dessen Sequenzen im Einbuchstabencode. Die fettgedruckten Buchstaben stellen die Unterschiede in Aminosäuresequenz zwischen den Leitsequenz NK-2 und CK33.....	6
Tabelle 2: Auflistung der angewendeten Materialien und der jeweiligen Hersteller	7
Tabelle 3: Auflistung der angewendeten Geräte und der jeweiligen Hersteller	8
Tabelle 4: Auflistung der angewendeten Chemikalien und der jeweiligen Hersteller	19
Tabelle 5: Auflistung der angewendeten Peptide und der jeweiligen Hersteller.....	20
Tabelle 6: Die Zusammensetzung von zwei Gelen für Tricin-SDS-PAGE.....	21
Tabelle 7: Gelpuffer (3x) für die Tricin-SDS-PAGE Gele, pH-Wert 8,44, Volumen 100 ml	21
Tabelle 8: Anode Puffer (10x) für die Tricin-SDS-PAGE, pH 8,9, Volumen 100 ml.....	21
Tabelle 9: Kathode Puffer (10x) für die Tricin-SDS-PAGE, pH 8,25, Volumen 50 ml	21
Tabelle 10: Volumina zum Ansetzen der Lösungen A-F aus 0,01 % TFA und drei verschiedenen Stocklösungen mit der Konzentration 1 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml. In der Lösung A befindet sich 0,01 µg Peptid, in der Lösung B 0,03 µg, in der Lösung C, D, E und F jeweils 0,1; 0,3; 1; 3 µg Peptid.....	22
Tabelle 11: Zusammensetzung von Puffer S.....	23
Tabelle 12: Zusammensetzung von Probenpuffer.....	23
Tabelle 13: Fixierlösung für die Tricin-SDS-PAGE Gele, pH-Wert 8,5, Volumen 500 ml	23
Tabelle 14: Roti-Blue Färbelösung für die Tricin-SDS-PAGE, Volumen 500 ml	23
Tabelle 15: Entfärbelösung für die Tricin-SDS-PAGE, Volumen 500 ml	23
Tabelle 16: Kopplungspuffer, pH-Wert 8,5, Volumen 500 ml.....	25
Tabelle 17: LB-Medium, Volumen 1 l	28
Tabelle 18: HEPES Puffer, pH-Wert 7,0, Volumen 200 ml.....	29
Tabelle 19: Werte der minimalen Hemmkonzentration MIC von Peptiden CK33 und NK2 von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die verwendete Bakterienkultur ist <i>E. Coli</i> BL21. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.	42
Tabelle 20: Die OD-Werte gemessen bei 620 nm von zwei Kontrollen ohne und mit Bakterien, sowie vom Harz mit CK33. Die Kontrollen wurden genauso wie das Harz mit CK33 behandelt	

und in der dieselben Menge vom HEPES Puffer aufgenommen. Die verwendete Bakterienkultur ist *E. Coli* BL21. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert..... 42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Graphische Darstellung der Wirkungsmechanismen von antimikrobiellen Peptiden. A) Barrel-Stave-Modell: Die Peptide dringen parallel zu den Phospholipiden in die Membran ein und verursachen einen Verlust von Cytoplasma, bis die Membran zerstört ist. Die hydrophoben Bereiche der Peptide sind dem Lipidkern zugewandt und die hydrophilen Bereiche befinden sich im Inneren der Pore. B) Das Carpet-Modell: Die AMP bilden eine teppichartige Form auf der Membranoberfläche und interagieren mit den Phospholipiden. Sobald eine Schwellenkonzentration der Peptide erreicht ist, zerfällt die Membran in Mizellen. C) Toroidales-Modell: Die antimikrobiellen Peptide destabilisieren die Membran, indem sie die Phospholipid Moleküle zwingen, sich nach innen zu krümmen und Poren zu bilden (Nicolas et al., 2021).	4
Abbildung 2: Darstellung der Layer-by-Layer-Methode. Die AMP sind in mehrschichtigen Polymerfilmen eingebettet. Nach einer zeitlich kontrollierten Freisetzung der AMP in bioabbaubaren Polymeren werden die Bakterien abgetötet, indem die Integrität der bakteriellen Zellmembran zerstört wird (Müller, 2021).	8
Abbildung 3: Reaktionsschema der Kopplung eines Peptids mit einem Harzpartikel. Die Kopplung basiert auf einer Thioetherbindung. Quelle: Bedienungsanleitung von Thermo Scientific SulfoLink® Coupling Resin.	11
Abbildung 4: Die Schematische Darstellung von einer kovalenten Immobilisierung eines Proteins an einer Oberfläche mithilfe von PEG. Schritt 1: Das hydroxylierte Substrat wird in einer PEG-Lösung ausgesetzt. Schritt 2: PEG wird entweder über eine Kondensationsreaktion oder über elektrostatische Wechselwirkungen an die Substratoberfläche gebunden. Schritt 3: Das gewünschte Protein wird über die chemische Funktionsgruppe am PEG gekoppelt (Stewart et al., 2019).	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines FTIR-Spektrometers. Ein Strahlteiler teilt das IR-Licht im Interferometer in zwei Strahlen auf. Ein Strahl wird von einem festen Spiegel reflektiert und der andere Strahl von einem beweglichen Spiegel. Die Strahlen treffen sich am Strahlteiler und interferieren miteinander. Aufgrund der variierenden Weglänge des zweiten Strahls, hat das austretende IR-Licht eine variierende Frequenzverteilung. Der Detektor zeichnet ein Interferogramm und durch die Fourier-Transformation wird ein IR-Spektrum erhalten (ATR-FTIR Spectroscopy, FTIR Sampling Techniques Agilent).	15

Abbildung 6: Schrittweise Schema der Kopplung. Der erste Schritt stellt die Vorbereitung der Proben dar. Der zweite Schritt zeigt die Parameter, die kombiniert wurden, um eine erfolgreiche Kopplung zu erzielen. Der letzte Schritt wurde durchgeführt, um die Kopplung des Peptids ans Harz mit dem Mikrodilutionstest zu bestätigen (siehe Abschnitt 4.8).	25
Abbildung 7: Tricin-SDS-PAGE Analyse der nicht reduzierten Proben des Peptids CK33. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.	31
Abbildung 8: Tricin-SDS-PAGE Analyse der mit DTT reduzierten Proben des Peptids CK33. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Proben wurden mit 100 mM DTT reduziert. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.	31
Abbildung 9: Tricin-SDS-PAGE Analyse der mit TCEP reduzierten Proben des Peptids CK33. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Proben wurden mit 200 mM TCEP reduziert. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.....	32
Abbildung 10: Tricin-SDS-PAGE Analyse der nicht reduzierten Proben des Peptids Aspidasept. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.	32
Abbildung 11: Tricin-SDS-PAGE Analyse der mit DTT reduzierten Proben des Peptids Aspidasept. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Proben wurden mit 100 mM DTT reduziert. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.....	33
Abbildung 12: Tricin-SDS-PAGE Analyse der mit TCEP reduzierten Proben des Peptids Aspidasept. Die aufgetragenen Peptidmengen sind 0,01 µg; 0,03 µg; 0,1 µg; 0,3 µg; 1 µg und 3 µg. Die Proben wurden mit 200 mM TCEP reduziert. Die Analyse wurde mit SDS-PAGE durchgeführt.....	33
Abbildung 13: Analyse der Kopplung von CK33 an Harz mithilfe von Tricin-SDS-PAGE. Analog zum Kopplungsansatz wird als Referenz der Kontrollansatz, hier als K bezeichnet, dargestellt. Ü steht für Überstand, der nach der Kopplungsreaktion entnommen wurde. Es wurden die folgenden Parameter kombiniert: Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis von 1:4 und eine Stunde bei der Drehzahl 1150 rpm im Thermomixer geschwenkt. CK33 wurde in 0,01 % TFA gelöst. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 90 V und die Gele wurden abschließend mit Roti-Blue Färbelösung gefärbt.....	35

Abbildung 14: Analyse der Kopplung von CK33 an Harz mithilfe von Tricin-SDS-PAGE. Analog zum Kopplungsansatz wird als Referenz der Kontrollansatz, hier als K bezeichnet, dargestellt. Ü steht für Überstand, der nach der Kopplungsreaktion entnommen wurde. Es wurden die folgenden Parameter kombiniert: Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis von 1:4, Erhöhung der Inkubationszeit auf zwei Stunden und Schwenkung bei der Drehzahl 1150 rpm im Thermomixer. CK33 wurde in 0,01 % TFA gelöst. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 90 V und die Gele wurden abschließend mit Roti-Blue Färbelösung gefärbt.....	36
Abbildung 15: Analyse der Kopplung von CK33 an Harz mithilfe von Tricin-SDS-PAGE. Analog zum Kopplungsansatz wird als Referenz der Kontrollansatz, hier als K bezeichnet, dargestellt. Ü steht für Überstand, der nach der Kopplungsreaktion entnommen wurde. Es wurden die folgenden Parameter kombiniert: Erhöhung von Peptid CK33-Harzsuspension-Verhältnis auf 1:5, Erhöhung der Inkubationszeit auf zwei Stunden und Drehzahl auf 1110 rpm im Thermomixer. CK33 wurde in Kopplungspuffer gelöst. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 90 V und die Gele wurden abschließend mit Roti-Blue Färbelösung gefärbt.	37
Abbildung 16: Analyse der Kopplung von Aspidasept ans Harz mithilfe von Tricin-SDS-PAGE. Analog zum Kopplungsansatz wird als Referenz der Kontrollansatz, hier als K bezeichnet, dargestellt. Ü steht für Überstand, der nach der Kopplungsreaktion entnommen wurde. Es wurden die folgenden Parameter kombiniert: Peptid Aspidasept-Harzsuspension-Verhältnis von 1:5, Inkubationszeit von zwei Stunden und Drehzahl 1110 rpm im Thermomixer. Aspidasept wurde in 0,01 % TFA gelöst. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 90 V und die Gele wurden abschließend mit Roti-Blue Färbelösung gefärbt.	38
Abbildung 17: Farbreferenzskala von pH 2 bis pH 9	39
Abbildung 18: Ergebnisse der pH-Messung der Proben mit pH-Papier. Links ist der pH-Messung von 0,01 % TFA, in der Mitte von 0,01 % TFA im Verhältnis 1:4 mit Kopplungspuffer und rechts die Messung vom Kopplungspuffer dargestellt. 0,01 % TFA hat ein pH von ungefähr 3, während 0,01 % TFA im Verhältnis 1:4 mit Kopplungspuffer und der Kopplungspuffer ein pH-Wert von ungefähr 8 zeigen.	39
Abbildung 19: IR-Spektrum von Lysozym als Feststoff. Im Bereich $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ ist die Amid-I-Bande. Die Amid-II- Bande befindet sich zwischen 1500 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} und die Amid-III-Bande zwischen 1200 cm^{-1} und 1300 cm^{-1}	40

Abbildung 20: IR-Spektrum von Lysozym gelöst in DMSO in der Konzentration 10 µg/µl (blau) und reines DMSO (rot). Bei 1000 cm⁻¹ in beiden Spektren befindet sich der S=O Streckung der Sulfoxid Gruppe im DMSO und bei 1600-1700 cm⁻¹ im blauen Spektrum befindet sich der C=O-Streckung Schwingung.....41

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Immobilisierung von cysteinhaltigen Peptidantibiotika CK33 und Aspidasept an Agarosebeads“ ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder den Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, den 28. August 2024

Sara Jashari