

**Untersuchungen zum Wirkspektrum und
Wirkmechanismus von antimikrobiell
wirksamen Dermcidin-abgeleiteten
Peptiden**

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von
Heiko Steffen
aus Troisdorf-Sieglar
vorgelegte

Dissertation

2006

Tag der mündlichen Prüfung:

28.06.2006

Dekan:

Herr Prof. Dr. Friedrich Schöffl

1. Berichterstatterin:

Frau PD Dr. Birgit Schitteck

2. Berichterstatter:

Herr Prof. Dr. Friedrich Götz

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>american type culture collection</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CF	Carboxyfluorescein
CFU	koloniebildende Einheit (<i>colony forming unit</i>)
CM	Zytoplasma Membran (<i>cytoplasm membrane</i>)
DMF	Dimethylformamid
d.h.	das heißt
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (Phosphatidylcholin)
DOPG	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol (Phosphatidylglycerol)
dsDNA	Doppelstrang DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
em	Emission (<i>emission</i>)
EM	Elektronenmikroskopie
ESI	Elektrospray-Ionisierung
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
ex	Anregung (<i>excitation</i>)
FKS	Fötales Kälberserum
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
FPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
h	Stunde (von lateinisch <i>hora</i>)
HBD	humanes beta-Defensin
HNP	humanes neutrophiles Defensin
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IM	innere Membran (<i>inner membrane</i>)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Vollmedium
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation Spektrometrie (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight</i>)
min	Minute/n
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NAPB	Natrium Phosphat Puffer
nm	Nanometer
NMM	N-Methylmorpholin
OM	äußere Membran (<i>outer membrane</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)

PLP	Natrium-Meta-Perjodat-L-Lysin-Paraformaldehyd
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-rac-phosphoglycerol
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP-HPLC	Umkehrphasen- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>reversed-phase- high performance liquid chromatography</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde/n
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetra- fluoroborate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)methylamin
U	Einheiten (<i>unit</i>)
Upm	Umdrehung pro Minute
v/v	Volumenprozent
Wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel
ZW	Zellwand

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	DIE BEDEUTUNG VON ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDEN (AMPs).....	1
1.2.	DAS VORKOMMEN VON ANTIMIKROBIELL WIRKSAMEN PEPTIDEN	2
1.2.1.	Pflanzen	2
1.2.2.	Insekten.....	3
1.2.3.	Amphibien	4
1.2.4.	Säugetiere und Mensch.....	6
1.2.4.1.	Epitheliale AMPs des Menschen.....	7
1.2.4.2.	Defensine	7
1.2.4.3.	Cathelicidine.....	10
1.2.4.4.	Weitere epitheliale AMPs in der Haut des Menschen.....	12
1.2.4.5.	Dermcidin	13
1.3.	WIRKMECHANISMEN VON ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDEN	15
1.3.1.	Die Bakterienzellwand als Zielstruktur von AMPs	16
1.3.2.	Intrazelluläre Wirkungsweisen von antimikrobiellen Peptiden.....	19
1.3.3.	Resistenzmechanismen gegenüber antimikrobiellen Peptiden.....	22
1.4.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	24
2.	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1.	MATERIAL	26
2.1.1.	Phospholipide.....	26
2.1.2.	Synthetische Peptide	26
2.1.3.	Antikörper	28
2.1.4.	Primer und Plasmid.....	28
2.1.5.	Allgemeine Lösungen und Puffer	29
2.1.6.	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kits.....	31
2.1.7.	Kultivierung und Stamm-Haltung von pro- und eukaryontischen Zellen	32
2.1.7.1.	Stamm-Haltung und Kultivierung von Mikroorganismen	32
2.1.7.2.	Medien und Platten für Mikroorganismen	33
2.1.7.3.	Kultivierung der humanen Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3	34
2.1.8.	Datenbankprogramme.....	35
2.2.	METHODEN.....	35

2.2.1. Proteinchemische Methoden.....	35
2.2.1.1. Peptidsynthese	35
2.2.1.2. Fluoreszenzmarkierung eines Peptids	36
2.2.1.3. Sammeln von humanem ekkrinem Schweiß	37
2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
2.2.1.4.1 Bradford-Test	37
2.2.1.4.2 BCA-Test	37
2.2.1.5. Western Blot Analyse.....	38
2.2.1.5.1 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.2.1.5.2 Proteintransfer	38
2.2.1.5.3 Immundetektion	39
2.2.1.6. Anfärbung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel.....	39
2.2.1.6.1 Coomassie-Färbung	39
2.2.1.6.2 Silber-Färbung	40
2.2.1.7. Proteinsequenzierung	40
2.2.1.8. Immunpräzipitation	40
2.2.2. Analytische und chromatographische Methoden	41
2.2.2.1. Analytische und präparative Umkehrphasen-Chromatographie	41
2.2.2.2. Größenausschlußchromatographie	42
2.2.2.3. Massenspektrometrie.....	42
2.2.3. Antimikrobieller Test	43
2.2.4. Spektroskopische Methoden.....	44
2.2.4.1. Feinstrukturanalyse durch (CD)-Spektroskopie.....	44
2.2.4.2. Aggregationsanalyse über Fluoreszenzlöschung (<i>Quenching</i>)	44
2.2.4.3. Membran-Permeabilisierungs-Untersuchungen.....	46
2.2.4.3.1. Permeabilisierung der inneren Membran von <i>E. coli</i>	46
2.2.4.3.2. Permeabilisierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i>	47
2.2.4.3.3. Carboxyfluorescein-Efflux-Experiment mit Liposomen	47
2.2.4.3.4. Permeabilisierung der Zellmembran von Erythrozyten	50
2.2.5. Mikroskopische Methoden	50
2.2.5.1. Transmissionselektronen- und Immun-Elektronen-Mikroskopie	50
2.2.5.2. Konfokale Lasermikroskopie	51
2.2.6. Zellbiologische Methoden	51
2.2.6.1. Herstellung von Zellpellets	51

2.2.6.2.	Herstellung von Zelllysaten.....	51
2.2.6.3.	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	52
2.2.6.4.	Immunfluoreszenz an der Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3.....	53
2.2.6.5.	<i>In situ</i> -Immunlokalisation	53
2.2.6.6.	Isolierung von Erythrocyten	54
2.2.7.	Molekularbiologische Methoden	54
2.2.7.1.	Isolierung von Nukleinsäuren.....	54
2.2.7.1.1.	Isolierung von RNA	54
2.2.7.1.2.	Isolierung von Plasmid-DNA.....	55
2.2.7.1.3.	Isolierung von genomischer DNA.....	56
2.2.7.1.4.	Photometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren..	57
2.2.7.2.	Klonierung von DCD in pBluescript II SK-Vektor.....	57
2.2.7.3.	Sequenzierung von DNA.....	58
2.2.7.4.	Northern Blot Analyse.....	59
2.2.7.4.1.	Herstellung einer Digoxigenin (DIG) markierten <i>DCD</i> -Sonde	59
2.2.7.4.2.	Aufreinigung und Testung der DIG-markierten <i>DCD</i> -Sonde.....	59
2.2.7.4.3.	RNA-Gel	60
2.2.7.4.4.	Hybridisierung.....	60
2.2.7.4.5.	Detektion	61
2.2.7.5.	Genomische Southern Blot Analyse.....	61
3.	ERGEBNISSE	63
3.1.	ÜBERSICHT ÜBER DIE DCD-ABGELEITETEN PEPTIDE IM MENSCHLICHEM SCHWEIß.....	63
3.2.	NACHWEIS DER ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT VON DCD-ABGELEITETEN PEPTIDEN.....	65
3.2.1.	Einfluß der Salzkonzentration auf die antimikrobielle Aktivität.....	65
3.2.2.	Zeitkinetik der antimikrobiellen Aktivität	67
3.2.3.	Analyse des Wirkspektrums	68
3.3.	UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKMECHANISMUS VON DCD-ABGELEITETEN PEPTIDEN	71
3.3.1.	Einfluß von bakteriellen Resistenzmechanismen auf die antimikrobielle Aktivität DCD-abgeleiteter Peptide.....	71
3.3.2.	Membranpermeabilisierungs-Untersuchungen.....	73

3.3.2.1.	Permeabilisierung der äußeren und inneren Bakterien-Membran.....	74
3.3.2.2.	Carboxyfluorescein-Efflux aus artifiziellen Liposomen	76
3.3.2.3.	Elektronenmikroskopische und konfokale Lasermikroskopie Untersuchungen von Peptid behandelten Bakterien.....	78
3.3.2.4.	Permeabilisierung der Zellmembran von Erythrozyten	80
3.4.	UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG	81
3.4.1.	Struktur-Vorhersage von DCD-1L	81
3.4.2.	CD-Spektroskopie	84
3.4.2.1.	Lösungsmittel induzierte α -helikale Konformationsänderung	84
3.4.2.2.	Einfluß der Salzkonzentration auf die Sekundärstruktur von DCD-1L und LEK-45	87
3.4.2.3.	Intermolekulare Wechselwirkungen mit artifiziellen Liposomen.....	88
3.5.	INTRA-UND INTER- MOLEKULARE DCD-PEPTID WECHSELWIRKUNGEN.....	92
3.5.1.	Oligomerisierung	92
3.5.2.	Interaktion von DCD-Peptiden mit Protein im Schweiß	100
3.5.3.	Untersuchung zum Vorkommen von weiteren antimikrobiellen Peptiden oder Proteinen im ekkrinen Schweiß.....	105
3.6.	EXPRESSIONSANALYSE VON DCD	106
3.6.1.	Expressionsanalyse von DCD in der Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3	106
3.6.2.	Homologie-Analyse des <i>DCD</i> -Gens zu anderen Säugern.....	109
4.	DISKUSSION.....	111
4.1.	ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT VON DCD-ABGELEITETEN PEPTIDEN.....	112
4.2.	UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKMECHANISMUS VON DCD-ABGELEITETEN PEPTIDEN	116
4.3.	UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNG	122
4.4.	EXPRESSIONSANALYSE VON DCD	125
4.5	AUSBLICK	127
5.	ZUSAMMENFASSUNG	129
6.	ANHANG.....	130
6.1.	DANKSAGUNG	130
6.2.	PUBLIKATIONEN	131
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	132

1. Einleitung

1.1. Die Bedeutung von antimikrobiellen Peptiden (AMPs)

Erstmalig entdeckte der schottische Bakteriologe Alexander Flemming (*1881, †1955) nicht nur das Lysozym (1922), sondern auch im Jahre 1928 das Antibiotikum Penicillin. Nachfolgend entschlüsselte der Chemiker Ernst Chain die chemische Formel des Penicillins, und unter der Leitung des Pathologen Howard Florey wurde das Antibiotikum 1941 industriell hergestellt. In dieser Zeit wurden Antibiotika als Sekundärmetabolite aus Bakterien und Pilzen isoliert, später erst wurden Peptid-Antibiotika bzw. antimikrobielle Peptide (AMPs) in höheren Organismen aufgespürt. Die AMPs sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet und übernehmen als **Effektormoleküle des natürlichen Abwehrsystems** (Boman, H. G. 1995) eine Kontrollfunktion im Wachstum von Mikroorganismen. Sie werden in verschiedenen Zelltypen gebildet, insbesondere in Abwehrzellen wie Makrophagen oder Neutrophilen sowie in Epithelzellen von Säugetieren (Cathelicidine, Histatine, Säugetier-Defensine), Insekten (Cecropine, Ceratoxine, Mellitine und Insekten-Defensine), Amphibien (Bombinin, Tigerinine und Magainin) und sogar Pflanzen (Thionine und Pflanzen-Defensine) (Boman, H. G. 1995; Schroder, J. M. 1999b). Da AMPs bei einer Infektion sehr schnell aktiviert werden, stellen sie als effizientes Abwehrsystem eine erste Schutzbarriere gegen eine Vielzahl von Eindringlingen wie Bakterien, Pilze, Protozoen, Viren und Nematoden dar (Bulet, P. et al. 2004). Insbesondere bei den Invertebraten, die im Gegensatz zu den Vertebraten über kein zusätzliches adaptives Immunsystem verfügen, nehmen die AMPs eine Schlüsselfunktion in der Immunabwehr ein. Die Expression der AMPs kann sowohl konstitutiv erfolgen, um somit als vorbeugender Schutz gegen Infektionen zu dienen, als auch durch Bakterien bzw. deren Produkte (z.B. Lipopolysaccharide, LPS) induziert werden (Gallo, R. L. et al. 1994; Harder, J. et al. 1997; Stolzenberg, E. D. et al. 1997). AMPs können nicht nur Mikroorganismen abtöten, sondern üben noch weitere Funktionen aus. Dazu gehört die Fähigkeit, die Zellproliferation (Murphy, C. J. et al. 1993), die extrazelluläre Matrixproduktion sowie die Wundheilung (Gallo, R. L. et al. 1994; Stolzenberg, E. D. et al. 1997; Schroder, J. M. 1999a), die Angiogenese (Li, J. et al. 2000) und die zelluläre Immunantwort zu beeinflussen (Huang, H. J. et al. 1997; Yang, D. et al. 1999; Yang, D. et al. 1999; Yang, D. et al. 2001).

1.2. Das Vorkommen von antimikrobiell wirksamen Peptiden

1.2.1. Pflanzen

Pflanzliche Oberflächen stehen im ständigen Kontakt mit Mikroorganismen und vor allem mit Pilzsporen. Neben der physikalischen Barriere (durch Lipidschichten) besitzen die Pflanzen ein natürliches Abwehrsystem, welches überwiegend aus genkodierte antimikrobiellen Peptiden und Proteinen besteht. Die Hauptgruppen der AMPs in Pflanzen werden durch die Thionine (Broekaert, W. F. et al. 1995; Garcia-Olmedo, F. et al. 1998), Defensine (Osborn, R. W. et al. 1995; Epple, P. et al. 1997) und Lipid-Transfer-Proteine (LTPs) (Molina, A. und Garcia-Olmedo, F. 1993; Garcia-Olmedo, F. et al. 1995) repräsentiert.

(1) Die **Thionine** zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an stark basischen und schwefelhaltigen Aminosäuren wie Arginin, Lysin und Cystein aus. Sie bestehen aus 45-47 Aminosäuren und bilden 4 Disulfidbrücken aus. Als kationische Peptide mit einer amphipathischer Struktur wirken sie toxisch auf Gram-positive/-negative Bakterien, Pilze und Hefen (Garcia-Olmedo, F. et al. 1995; Florack, D. E. und Stiekema, W. J. 1994; Bohlmann, H. et al. 1988). So konnte gezeigt werden, dass die Thionine gegen phytopathogene Bakterien wie *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* e *Corynebacterium* (Fernandez, de Caley et al. 1972), gegen verschiedene Hefen wie *Saccharomyces uvarum*, *S. cerevisiae* (Hernandez-Lucas, C. et al. 1974) und phytopathogene Pilze wie *Thielaviopsis paradoxa* und *Drechslera teres* eine antimikrobielle Wirkung haben (Bohlmann, H. et al. 1988). Neben der antimikrobiellen Aktivität wurden zytotoxische Effekte, die sich in einer gesteigerten Zellwand-Permeabilisierung zeigten, auf verschiedene Säugetierzellen beobachtet (Castro, M. S. und Fontes, W. 2005).

(2) Zu der zweiten Peptidgruppe gehören die **Pflanzen-Defensine** (45-54AS; früher als γ -Thionine bezeichnet), die wegen ihres ähnlichen strukturellen Aufbaus in der Namensgebung den Defensinen aus Insekten und Säugern zugeordnet wurden (Broekaert, W. F. et al. 1995; Osborn, R. W. et al. 1995; Epple, P. et al. 1997). Viele Pflanzen-Defensine besitzen im Gegensatz zu den Defensinen der Insekten und Säuger eine hohe antimykotische Wirkung, welche für das natürliche Abwehrsystem der Pflanzen eine bedeutende Rolle spielt (Terras, F. R. et al. 1992; Thevissen, K. et al. 1999). Diese Peptide werden zudem permanent gebildet, so dass ein exzessives Wachstum von Mikroben auf den Pflanzenoberflächen verhindert werden kann.

(3) Die dritte Gruppe der AMPs in Pflanzen wird von den **Lipid-Transfer-Proteinen (LTPs)** gebildet, welche sich wiederum in zwei Subklassen mit einem Molekulargewicht von 9kDa

(LTP1s) und 7kDa (LTP2s) unterteilen lassen. Diese Proteine sind an dem Transfer von polaren Lipiden - wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol und Galaktolipiden - vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu anderen Organellen (Chloroplasten und Mitochondrien) beteiligt. Darüber hinaus nehmen die LTPs eine bedeutende Rolle in der Abwehr gegen pathogene Erreger der Gattung *Pseudomonas* ein (Molina, A. und Garcia-Olmedo, F. 1993; Garcia-Olmedo, F. et al. 1995) oder inhibieren die Sporenbildung von Reis-Pathogenen wie *Pyricularia oryzae* (Ge, X. et al. 2003).

1.2.2. Insekten

Bereits 1981 zeigten Untersuchungen der Arbeitsgruppe von H. Boman, dass die Expression von AMPs durch verschiedene Bakterien induziert werden kann. So führte eine Injektion von Bakterien in die Hämolymphe der Raupe des Seidenspinners, *Hyalophora cecropia*, zu einer Induktion der Synthese von antimikrobiellen Proteinen (sog. Cecropine) (Hultmark, D. et al. 1980). Die **Cecropine** sind kationische α -helikale Peptide mit einer Länge von 29-42 Aminosäuren und wirken hauptsächlich gegen Gram-negative Bakterien sowie gegen Pilze (Boman, H. G. 1991). Seit ihrer Entdeckung wurden insgesamt 60 Cecropine und Cecropin-ähnliche Moleküle aus den Gattungen *Diptera* und *Lepidoptera* identifiziert (Bulet, P. und Stocklin, R. 2005). Die gemeinsamen strukturellen Eigenschaften der Cecropine zeigen sich in dem Vorkommen von Tryptophan in den ersten zwei AS-Positionen und in der C-terminalen Amidierung, welche zur Stabilität und zur kationischen Ladungseigenschaft beiträgt. Das kürzeste α -helikale AMP aus Insekten ist das **Ceratoxin**, welches in der Fliege *Ceratitis capitata* in den weiblichen akzessorischen Fortpflanzungsdrüsen gebildet wird, um die abgelegten Eier vor Gram-negativen und Gram-positiven Pathogenen zu schützen (Rosetto, M. et al. 1996; Marchini, D. et al. 1997). Das längste Peptid **Stomoxyn** mit 42 Aminosäuren wird konstitutiv in den Ovarien, im Vorderdarm und in den Hämocyten von *Stomoxys calcitrans* gebildet (Boulanger, N. et al. 2002). Stomoxyn bildet eine amphipathische, helikale Struktur aus und weist ein breites antimikrobielles Spektrum auf (Landon, C. et al. 2006).

Neben den Cecropinen wurden noch weitere induzierbare AMPs in der Hämolymphe von *Drosophila melanogaster* identifiziert. Diese wirken selektiv entweder gegen Gram-positive Bakterien (**Insekten-Defensine**) oder gegen Gram-negative Bakterien (**Diptericin**, **Drosocin**, **Attacine**, **Cecropine**) oder gegen Pilze (**Drosomycin**) (Bulet, P. und Stocklin, R. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser Peptide möglicherweise abhängig von dem jeweiligen Erreger induziert wird. So wurden nach Kontakt mit Pilzen in Epithelien, wie z.B. den Tracheen, antimykotische Peptide und nach Kontakt mit Bakterien antibakterielle Peptide

gebildet (Fehlbaum, P. et al. 1994; Lemaitre, B. et al. 1997). Diese selektive Erkennung von verschiedenen Mikroorganismen wird über zwei verschiedene Signalkaskaden gesteuert (Hoffmann, J. A. 2003; Royet, J. und Reichhart, J. M. 2003). So bewirkte sowohl eine Pilzinfektion als auch eine Infektion mit Gram-positiven Bakterien eine Aktivierung von membranständigen Toll-Rezeptoren, deren Aktivierung eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt (Imler, J. L. und Hoffmann, J. A. 2000b; Imler, J. L. und Hoffmann, J. A. 2000a; Ferrandon, D. et al. 1998). In deren Verlauf führt die Translokation von einem NF- κ B ähnlichen Transkriptionsfaktor DIF (*dorsal immunity factor*) in den Nukleus zur gezielten Transkription der Gensequenz von Drosomycin. Diesbezüglich konnte an einer Drosophila-Mutante mit defektem Toll-Rezeptor, der indirekt der Erkennung von Hefen diente, gezeigt werden, dass diese Taufliege nach systemischer Pilzapplikation starb (Imler, J. L. und Hoffmann, J. A. 2000a). Hingegen übernimmt der Imd (*immune deficiency*)-Signalweg eine regulatorische Rolle bei der Aktivierung von Genen, welche die antibakteriellen Peptide (Diptericin, Drosocin, Attacine, Cecropine) gegen Gram-negative Bakterien kodieren.

Die bisher 60 identifizierten **Insekten-Defensine** lassen sich hinsichtlich ihrer Wirkung in zwei Untergruppen aufteilen. Zum einen besitzen die meisten der Insekten-Defensine eine antimikrobielle Wirkung gegen Gram-positive Bakterien, zum anderen wirken 4 Defensine ausschließlich gegen Pilze (Bulet, P. et al. 2004; Lemaitre, B. et al. 1997; Dimarcq, J. L. et al. 1998). Zu diesen antimykotischen Peptiden gehören Drosomycin, Heliomycin, Gallerimycin, Termicin und Alo-3 (Schuhmann, B. et al. 2003; Barbault, F. et al. 2003). Die Insekten-Defensine bestehen aus 33-46 Aminosäuren und verfügen über die gleichen Struktureigenschaften wie die Defensine aus Säugern.

Weiterhin konnten Untersuchungen zeigen, dass in den Giftdrüsen verschiedener Insektenarten wie Bienen (Melittine) ((Habermann, E. und Zeuner, G. 1971; Wade, D. et al. 1992; Tossi, A. et al. 2000), Hornissen (Crabrolin) (Krishnakumari, V. und Nagaraj, R. 1997) Spinnen (Oxyopinine, Cupiennine) (Corzo, G. et al. 2002; Kuhn-Nentwig, L. et al. 2002) und Skorpione (Hadrurin, Opistoporin) (Torres-Larios, A. et al. 2000; Moerman, L. et al. 2002) kationische Peptide mit antimikrobieller und hämolytischer Wirkung exprimiert werden.

1.2.3. Amphibien

Schon 1970 wurde ein antimikrobiell wirkendes Peptid namens **Bombinin** aus Fröschen der Gattung *Bombina* isoliert. Es folgten in dieser Gattung weitere Entdeckungen von AMPs (BLPs, *bombinin like peptides*), die zur selben Peptid-Familie gehören (Simmaco, M. et al. 1991; Simmaco, M. et al. 1998). Diese BLPs besitzen 25-27 Aminosäuren und bilden als

kationische Peptide eine α -helikale Struktur aus. Kürzlich konnte aus Hautsekreten der Gattung *Bombina maxima* neben den kationischen Peptiden **Maximine** H1-H4 ein weiteres genkodierte Peptid namens Maximin H5 mit einer anionischen Nettoladung isoliert werden (Lai, R. et al. 2002). Dieses anionische Peptid besitzt eine antimikrobielle Wirkung gegen den Gram-positiven Stamm *S. aureus*, nicht jedoch gegen Gram-negative Bakterien oder gegen *C. albicans*. Aus verschiedenen Froschspezies wurden eine Reihe von α -helikalen AMPs mit deutlich unterschiedlichen Aminosäuresequenzen isoliert (Simmaco, M. et al. 1998), welche eine unterschiedliche Wirkung auf Bakterien und Pilze besitzen. Zu diesen Peptiden gehören beispielsweise Peptide mit einer Glycin-Leucin-Amidierung (**PGLa**, *peptide glycine leucine amide*), Peptidfragmente aus Hormonen (Proxenopsin, Prolevitide) und **Bombinin**, **Dermaseptin**, Adenoregulin, Maculatin, Citropin, Aurein, Temporin, etc. Weiterhin wurden aus der Gattung *Rana* stark kationische Peptide mit Ausbildung einer β -Haarnadel-Struktur und einer Disulfidbrücke isoliert. Diese Peptide lassen sich nach Bulet *et al.* (2005) in vier Gruppen gliedern: (1) Zu der ersten Gruppe gehören die **Brevinine**, **Gaegurine**, **Ranalexine** und **Esculentine**, welche aus 20 oder 20-24 Aminosäuren bestehen. (2) Die zweite Gruppe bilden die **längeren Esculentine** mit 36-46 Aminosäuren. (3) Die **Ranaturine** gehören der dritten und (4) die **Tigerinine** mit 11-12 Aminosäuren der vierten Gruppe an. Während sich die Brevinine von den Esculentinen in nur wenigen Aminosäuren unterscheiden, besitzen die Tigerinine keine vergleichbaren strukturellen Eigenschaften zu anderen AMPs in Amphibien (Sai, K. P. et al. 2001). Ein Hauptcharakteristikum aller Doppelstrang- β -Faltblatt-Peptide besteht in der Ausbildung eines C-terminalen Ringes, welcher *Rana*-Box genannt wird (Park, J. M. et al. 1994). Bei Verlust dieser Haarnadel-Struktur infolge einer Reduzierung der Disulfidbrücke geht die antimikrobielle Aktivität verloren (Sitaram, N. et al. 2002). Insgesamt besitzen diese Peptide die Eigenschaft, Gram-negative und Gram-positive Bakterien sowie Pilze in micromolaren Konzentrationen äußerst effektiv abzutöten. Die hämolytische Aktivität auf Erythrozyten ist unterschiedlich, so besitzt z.B. Brevinin-1 eine starke hämolytische Wirkung, wohingegen Brevinin-2, Esculentine und Tigerinine keine zeigen (Bulet, P. et al. 2004).

Im Jahre 1987 beobachteten M. Zasloff und seine Mitarbeiter, dass Frösche, die nach einer Entnahme der Oozyten in ihr natürliches Habitat zurückgesetzt wurden, trotz der frischen, nur notdürftig und unsteril versorgten Wunden, keine nennenswerten Infektionen aufwiesen (Zasloff, M. 1987). Dieses Phänomen konnte durch die Isolierung von AMPs (**Magainine**) aus den Schleimdrüsen der Froschhaut von *Xenopus laevis* aufgeklärt werden (Zasloff, M. 1987). Diese Magainine (hebräisch: Schutzschild) sind α -helikale Peptide mit einer Länge

von 23-27 Aminosäuren. Sie sind induzierbar und zeigen ein breites Wirkspektrum gegen Bakterien, Pilze, Protozoen, Viren und auch Tumorzellen (Tossi, A. et al. 2000).

1.2.4. Säugetiere und Mensch

Die AMPs der Säuger und des Menschen werden von verschiedenen Zelltypen synthetisiert, z.B. von Granulozyten, Neutrophilen, Makrophagen, Paneth-Zellen (Epithelien des Dünndarms), vaginale Epithelien, Zellen des männlichen Reproduktionstrakts, Bronchialgewebe und Kerationozyten (Gallo, R. L. und Huttner, K. M. 1998; Li, P. et al. 2001).

Untersuchungen an Rinderepithelien führte zur Identifizierung von mehreren induzierbaren AMPs, die aufgrund ihrer sechs, durch intramolekulare Disulfidbrücken verbundenen Cysteine, der Klasse der sogenannten **β -Defensine** zugeordnet wurden (Lehrer, R. I. et al. 1993). So konnte aus Epithelien der Luftröhre von Rindern das **TAP** (*tracheal antimicrobial peptide*) isoliert werden (Diamond, G. et al. 1991). Dieses kationische Peptid besitzt die Fähigkeit, Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Mykobakterien sowie einige Viren und Pilze abzutöten. Ein weiteres Defensin wurde in Rindern und Vögeln entdeckt (Schonwetter, B. S. et al. 1995). Dieses als **LAP** (*lingual antimicrobial peptide*) bezeichnete AMP wird primär in Zellen der Zungenepithelien exprimiert. LAP sorgt dafür, dass die Zunge der Rinder trotz auftretender Verletzungen beim Ausrupfen scharfkantiger Gräser nur selten mit Mikroorganismen infiziert wird, und Wunden rasch verheilen. LAP wird nicht nur in der Zunge, sondern auch im Lungengewebe einschließlich der Bronchien, in Luftröhre, Kolon und Rektum gebildet, nicht im Urogenitaltrakt. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch primäre Zytokine und Bakterien eine Induktion der Expression von TAP bzw. LAP in entzündeter Haut von Rindern erfolgt (Stolzenberg, E. D. et al. 1997). Untersuchungen zum Mechanismus dieser Induktion ergaben, dass das bakterielle Endotoxin (LPS) die Expression von antimikrobiellen Proteinen induziert und dass dieser Prozeß über NF- κ B vermittelt wird (Diamond, G. et al. 2000).

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass in Zellen der Epithelien des Ileums und des Kolons von Rindern das **EBD** (*enteric β -defensin*) exprimiert wird (O'Neil, D. A. 2003). Die Expression der mRNA von EBD scheint durch Bakterien induziert zu werden. Untersuchungen zum Mechanismus der Induktion ergaben, dass wahrscheinlich bakterielles L-Isoleucin und verschiedene L-Isoleucin Derivate (L-Isoleucin-Hydroxamat, DL,2-Keto-3-Methylvalerinsäure) als Stimulus fungieren können (Fehlbaum, P. et al. 2000). Die epithelialen induzierbaren β -Defensine weisen eine mehr oder weniger breite Wirksamkeit gegenüber verschiedenartigen Bakterien und Pilze auf.

Beim Menschen kommen die AMPs der **Defensin-** (Harder, J. et al. 1997; Gallo, R. L. und Huttner, K. M. 1998), **Cathelicidin-** (Gudmundsson, G. H. et al. 1996) und **Histatinfamilie** (Oppenheim, F. G. et al. 1988) sowie das **Dermcidin (DCD)** vor (Bals, R. 2000; Beisswenger, C. und Bals, R. 2005; Schitteck, B. et al. 2001). Diese Peptid-Gruppen besitzen ein breites Aktivitätsspektrum gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie gegen Pilze und Viren (Bals, R. 2000; Beisswenger, C. und Bals, R. 2005).

1.2.4.1. Epitheliale AMPs des Menschen

Die Epithelien des Menschen sind permanent verschiedensten Mikroorganismen ausgesetzt. So übernehmen AMPs vorwiegend in Epithelien des Dünndarms, des Urogenitaltraktes, der Niere, der Lunge und der Haut eine wichtige Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen. AMPs werden in erster Linie in menschlicher Haut von Keratinozyten, Schweißdrüsen und neutrophilen Granulozyten produziert (Boman, H. G. 1995; Gallo, R. L. und Huttner, K. M. 1998). Zu den von Keratinozyten konstitutiv sezernierten AMPs in gesunder Haut gehören der Proteaseinhibitor Antileukoprotease (ALP) (Wingens, M. et al. 1998; Wiedow, O. et al. 1998), RNase7, Psoriasin, Lysozym (Chen, V. L. et al. 1986), β -Defensin-1 (HBD-1) (Zhao, C. et al. 1996) und die sekretorische Phospholipase A2 (Qu, X. D. und Lehrer, R. I. 1998), die gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen eine antimikrobielle Wirkung aufweisen (Schroder, J. M. 2002) den induzierbaren AMPs in der Haut beim Menschen gehören das **Cathelicidin LL-37** (Gallo, R. L. et al. 2002), welches in den Keratinozyten gebildet wird, die **α -Defensine (HNP-1-4, *human neutrophil peptides*)**, die in neutrophilen Granulozyten gelagert werden, (Ganz, T. et al. 1985; Ganz, T. 1987) und die **β -Defensine (HBD-2-3)** (Harder, J. und Schroder, J. M. 2005). Diese Peptide werden nach einem inflammatorischen Stimulus exprimiert bzw. ausgeschüttet und wirken sowohl antibakteriell als auch antimykotisch. Sie kontrollieren das Wachstum von Mikroorganismen in den ersten Stunden nach epithelialer Verletzung, während der Wundheilung und bei inflammatorischen Erkrankungen wie Psoriasis oder bei Ekzemen (Frohm, M. et al. 1997). Neueste Studien konnten ein AMP in der Haut des Menschen nachweisen (**Dermcidin**), welches in ekkrinen Schweißdrüsen konstitutiv synthetisiert und in den Schweiß sezerniert wird (Schitteck, B. et al. 2001).

1.2.4.2 Defensine

Beim Menschen sind bislang sechs α - und vier β -Defensine identifiziert worden, deren Gene in einem Cluster auf Chromosom 8p21-23 lokalisiert sind (Kaiser, V. und Diamond, G. 2000; Schutte, B. C. et al. 2002). Weitere Gensequenzen mit dem für β -Defensine typischen

Cystein-Motiv wurden auf den Chromosomen 6 und 20 identifiziert (Schutte, B. C. et al. 2002; Radhakrishnan, Y. et al. 2005; Rodriguez-Jimenez, F. J. et al. 2003). Die humanen Defensine sind kationische AMPs, die drei konservierte intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden und hauptsächlich eine β -Faltblattstruktur aufweisen. Je nach relativer Position und Verknüpfung der Cysteine werden zwischen den α - und β -Defensinen unterschieden. Bei α -Defensinen sind die Cysteine C₁-C₆, C₂-C₄ und C₃-C₅ verbrückt, bei β -Defensinen dagegen die Cysteine C₁-C₅, C₂-C₄ und C₃-C₆ (Diamond, G. und Bevins, C. L. 1998). Die Stabilisierung der Tertiärstruktur der Defensine ist hauptsächlich den drei Disulfidbrücken zuzuschreiben. Desweiteren besitzen Defensine eine kurze N-terminale α -Helix sowie eine dreisträngige β -Faltblattstruktur, die in Länge und relativer Anordnung untereinander sehr ähnlich sind (Bauer, F. et al. 2001). Auch α -Defensine besitzen diese Sekundärstrukturelemente, wobei allerdings dem humanen α -Defensin HNP-3 und dem bovinen β -Defensin BNBD-12 die kurze α -Helix fehlt.

Vertreter der α -Defensine wurden bisher nur bei Säugetieren beschrieben, während β -Defensine auch bei Vögeln, Insekten und Pflanzen nachgewiesen wurden (Ganz, T. et al. 1990). Darüber hinaus wurde in Rhesusaffen eine dritte Defensinfamilie, das sogenannte θ -Defensin entdeckt. Es wird durch eine posttranslationale Verknüpfung von zwei α -Defensin-ähnlichen Peptiden gebildet und trägt drei intramolekulare Disulfidbrücken (Tran, M. H. et al. 2002). Die α -Defensine des Menschen (Selsted, M. E. et al. 1985; Wilde, C. G. et al. 1989) sind zwischen 29 und 35 Aminosäuren lang und werden vor allem in den primären Granula neutrophiler Granulozyten synthetisiert, die in infizierten Gewebestellen akkumulieren (Lehrer, R. I. et al. 1991). Die α -Defensine HNP-5 und HNP-6 werden von epithelialen Granulozyten des Dünndarms (den Paneth-Zellen) produziert (Boman, H. G. 1995) und sind an der Inaktivierung von Erregern durch Phagozytose beteiligt (Risso, A. 2000).

Anders als die α -Defensine werden die vier bisher bekannten humanen β -Defensine HBD-1 (Bensch, K. W. et al. 1995), HBD-2 (Harder, J. et al. 1997), HBD-3 (Harder, J. et al. 2001; Jia, H. P. et al. 2001; Garcia, J. R. et al. 2001a) und HBD-4 (Yanagi, S. et al. 2005) hauptsächlich in epithelialen Geweben der Haut, der Atemwege, des Urogenitaltrakts und des Gastrointestinaltrakts gebildet (Nizet, V. et al. 2001; Peschel, A. und Collins, L. V. 2001). β -Defensine sind zwischen 36 und 42 Aminosäuren lang und besitzen sowohl eine antibakterielle als auch eine antimykotische Aktivität. Die β -Defensine HBD-2 und HBD-4 (Harder, J. und Schroder, J. M. 2005) gehören zu den wichtigsten induzierbaren AMPs in der Haut des Menschen. Diesbezüglich konnte HBD-2 sowohl in erkrankten Hautarealen von Psoriasis

Patienten nachgewiesen als auch dessen Expression in Keratinozyten nach Behandlung mit TNF- α induziert werden (Liu, L. et al. 1998; Harder, J. et al. 1997; Schroder, J. M. und Harder, J. 1999). Zeitgleich wurde auch das humane β -Defensin HBD-3 aus psoriatischer Haut isoliert. Es wird nach Induktion in Keratinozyten und Lungenepithelzellen produziert (Harder, J. et al. 2001; Garcia, J. R. et al. 2001a). Das neu entdeckte HBD-4 wurde alleine durch genomische Sequenzanalysen identifiziert (Garcia, J. R. et al. 2001a). Die Expression von HBD-4 wird in Lungenepithelzellen nach Induktion hochreguliert (Yanagi, S. et al. 2005). Die Expression dieser β -Defensine wird durch die inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , Interferon- γ sowie durch Kontakt mit Mikroorganismen, insbesondere durch LPS, ausgelöst (Bals, R. 2000; Harder, J. et al. 2000). Durch die Bindung von Bestandteilen der Mikroorganismen an sogenannte membranständige Toll-like Rezeptoren, die auf Effektorzellen wie Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen exprimiert werden, wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt und letztendlich zur Transkription der Gensequenzen von proinflammatorischen Molekülen und der indizierbaren β -Defensine (Medzhitov, R. und Janeway, C. Jr 2000; Takeda, K. et al. 2003). Das HBD-1 unterscheidet sich von den anderen humanen β -Defensinen durch seine konstitutive Expression in epithelialen Zellen der Haut, im Urogenital-, Gastrointestinal- und Respirationstrakt (Bensch, K. W. et al. 1995; Zhao, C. et al. 1996; Hancock, R. E. und Lehrer, R. 1998; Valore, E. V. et al. 1998; Goldman, M. J. et al. 1997; Ali, R. S. et al. 2001).

Die Peptide der β -Defensin-Familie zeigen antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive/negative Bakterien und Hefen, wobei HBD-4 die schwächste antimikrobielle Aktivität aufweist (Harder, J. et al. 2001; Harder, J. et al. 1997; Garcia, J. R. et al. 2001b). HBD-1 und HBD-2 zeigen vorwiegend auf Gram-negative Bakterien wie *E. coli* und vor allem auf *P. aeruginosa* eine hohe antimikrobielle Aktivität, jedoch eine geringe Aktivität auf Gram-positive Erreger wie *S. aureus*. HBD-3 und HBD-4 besitzen ein breites antimikrobielles Spektrum gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien. Mit Ausnahme von HBD-3 zeigen die humanen β -Defensine in ihrer antimikrobiellen Aktivität eine starke Abhängigkeit von der Salzkonzentration (Goldman, M. J. et al. 1997; Bals, R. et al. 1998a; Garcia, J. R. et al. 2001a; Harder, J. et al. 2001). Die chemotaktische Wirkung von HBD-2 (Yang, D. et al. 1999) und HBD-3 (Garcia, J. R. et al. 2001a) auf T-Zellen und dendritische Zellen, sowie die Wirkung von HBD-4 auf Monozyten (Garcia, J. R. et al. 2001b) deutet darauf hin, dass diesen Peptiden neben der direkten Inaktivierung pathogener Erreger noch weitere wichtige

Funktionen im menschlichen Immunsystem zukommen (Ganz, T. 1999; Yang, D. et al. 1999; Lillard, J. W., Jr. et al. 1999; Yang, D. et al. 2002).

1.2.4.3. Cathelicidine

Die Cathelicidine repräsentieren eine weitere Gruppe von AMPs in Säugetieren (Zanetti, M. et al. 1995; Lehrer, R. I. und Ganz, T. 2002; Ganz, T. und Lehrer, R. I. 1998; Ramanathan, B. et al. 2002). Zu diesem Zeitpunkt wurden insgesamt 35 Mitglieder in Schweinen (Protegrine, PR-39), Rindern (Indolicidin), Schafen (SMAP-29), Ziegen (ChBac5), Pferden (eCATH-2), Mäusen (CRAMP), Kaninchen (CAP-18), Meerschweinchen (CAP-11) und Menschen identifiziert, wobei der Mensch nur ein Cathelicidin bildet, das hCAP-18/LL-37 (*human cationic antimicrobial peptide*) (Nizet, V. und Gallo, R. L. 2002; Larrick, J. W. et al. 1996; Zanetti, M. 2004). Die Gemeinsamkeit dieser Cathelicidine liegt in ihrer hoch konservierten N-terminalen Proregion (sog. Cathelin-ähnliche Domäne) und einer wenig konservierten C-terminalen antimikrobiellen Region (Zanetti, M. et al. 1995). Die Cathelicidine werden vorwiegend in den Granula von Neutrophilen intrazellulär gespeichert und können nach Aktivierung der Neutrophilen prozessiert und anschließend sezerniert werden (Zanetti, M. et al. 1995; Cowland, J. B. et al. 1995). An der Prozessierung und der damit verbundenen Aktivierung der C-terminalen AMPs sind neutrophile Proteasen, meist Elastase, beteiligt (Gallo, R. L. und Huttner, K. M. 1998).

Die C-terminalen AMPs der verschiedenen Mitglieder der Cathelicidine sind in ihrer Struktur sehr variabel. So können die Peptide sowohl eine α -helikale (hCAP-18/LL-37, CAP-18, CRAMP etc.) als auch eine β -Faltblatt-Konformation (Protegrine) einnehmen (Frohm, M. et al. 1997; Fahrner, R. L. et al. 1996; Aumelas, A. et al. 1996). Zudem zeichnen sich einige Cathelicidine, wie PR-39 oder Bactenecin 5, durch einen hohen Anteil an Prolin und Arginin in der Aminosäuresequenz aus.

Das humane Cathelicidin (hCAP18/LL-37) wird durch die Protease 3 gespalten, so dass das antimikrobiell aktive C-terminale Peptid LL-37 entstehen kann (Sorensen, O. E. et al. 2001; Gudmundsson, G. H. et al. 1996). Die Namensgebung für LL-37 resultiert aus der Eigenschaft des Peptids, in den ersten zwei AS-Positionen zwei Leucine zu besitzen und 37AS lang zu sein. hCAP-18/LL-37 wird nicht nur von Neutrophilen im Knochenmark und im Hoden (Agerberth, B. et al. 1995) synthetisiert, sondern auch in den Epithelien der Atemwege und in Monozyten, NK-Zellen, B-Zellen sowie $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert (Bals, R. und Wilson, J. M. 2003; Agerberth, B. et al. 2000). Desweiteren wird LL-37 in Hautkeratinozyten in geringen Konzentrationen konstitutiv synthetisiert und nach einem inflammatorischen Stimulus in

Erkrankungen - wie Psoriasis, Kontaktdermatitis und systemischer Lupus Erythematosus – vermehrt gebildet (Frohm, M. et al. 1997; Hancock, R. E. und Lehrer, R. 1998). LL-37 wird in geringem Maße in Schweißdrüsen exprimiert und in den Schweiß sezerniert, wo es durch Serin-Proteasen in kleinere antimikrobiell wirksame Peptide KR-20, RK-31 und KS-30 prozessiert wird (Murakami, M. et al. 2004). LL-37 besitzt ein breites Wirkspektrum gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, darunter auch vancomycin-resistente *Enterokokken faecium* (VRE), methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) sowie gegen *C. albicans*. In Konzentrationen, die deutlich über der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) liegen, ist hCAP18/LL-37 toxisch für eukaryontische Zellen, darunter Tumorzellen und Erythrozyten (Skerlavaj, B. et al. 1996; Johansson, J. et al. 1998). Die Zytotoxizität wird durch die Anwesenheit von Serum unterbunden (Johansson, J. et al. 1998; Risso, A. 2000). Es konnte in unterschiedlichen Untersuchungen gezeigt werden, dass LL-37 mit einer hohen Affinität an die freigesetzten Endotoxine, LPS aus Gram-negativen Bakterien und Lipoteichonsäuren aus Gram-positiven Bakterien, binden kann und somit deren biologische Aktivität neutralisiert (Turner, J. et al. 1998; Larrick, J. W. et al. 1995). Ohne diese Neutralisierung würden diese Bakterienkomponenten zu einer hohen Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-1 β und IL-8 in Immunzellen führen. Somit können durch die Bindung an LPS und der resultierenden Inaktivierung Überreaktionen des adaptiven Immunsystems, die zur Sepsis oder zum Tode führen können, möglicherweise unterbunden werden (Scott, M. G. et al. 2002; Scott, M. G. und Hancock, R. E. 2000). Auch zeigt LL-37 chemotaktische Aktivität auf Neutrophile, Monozyten und T-Zellen sowie phagozytierende Zellen (Agerberth, B. et al. 2000; Yang, D. et al. 2001; Yang, D. et al. 2000). So wirkt LL-37 einerseits chemotaktisch und somit proinflammatorisch auf Makrophagen, wodurch dann die Phagozytose von eingedrungenen Mikroorganismen gesteigert wird. Andererseits kann es das bei der Lyse der Bakterienzellen freigewordene LPS binden und so in Makrophagen die durch das LPS induzierte Freisetzung von TNF- α hemmen.

Für die konservierte N-terminale Cathelin-ähnliche Domäne von hCAP18/LL-37 sind weniger Untersuchungsergebnisse vorhanden. Es konnte gezeigt werden, dass dieser konservierte Bereich einerseits als Cystein-Protease-Inhibitor fungiert und dadurch Gewebeschädigungen durch Cystein-Proteasen unterbinden kann, andererseits auch eine antimikrobielle Aktivität in höheren Konzentrationen als LL-37 (>16-32 μ M) gegen *E. coli* und methicillin-resistenten *S. aureus* zeigt (Zaiou, M. et al. 2003).

1.2.4.4. Weitere epitheliale AMPs in der Haut des Menschen

Neben der Identifizierung der humanen Defensine und des Cathelicidins LL-37 gelang es, weitere antimikrobiell aktive Proteine in der Haut des Menschen nachzuweisen. So konnten im Jahre 1998 Mitglieder der **RNase A Familie**, ECP (RNase3, *eosinophil cationic protein*) und EDN (RNase2, *eosinophil derived neurotoxin*), die eine hohe antibakterielle und antivirale Aktivität besitzen, in eosinophilen Granulozyten identifiziert werden (Domachowske, J. B. et al. 1998a; Domachowske, J. B. et al. 1998b; Rosenberg, H. F. und Domachowske, J. B. 2001). Aus dem *Stratum corneum* gesunder Haut wurde eine weitere antimikrobiell aktive RNase isoliert (Harder, J. und Schroder, J. M. 2002). Diese **RNase7** wird in Keratinozyten und respiratorischen Epithelien exprimiert und zeigt neben ihrer Ribonuklease-Aktivität ein breites antimikrobielles Spektrum gegen pathogene Erreger, wie *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Propionibacterium acnes* und *C. albicans*, sowie gegen den vancomycin-resistenten *E. faecium* (Harder, J. und Schroder, J. M. 2002). Nach Kontakt der Keratinozyten mit *P. aeruginosa* oder *S. aureus* wird eine Erhöhung der RNase7 Expression beobachtet. Auch in der Haut von Psoriasis-Patienten ist eine erhöhte RNase7 Expression nachweisbar. Durch Blockierung der RNase-Aktivität durch Verwendung eines löslichen RNase-Inhibitor konnte weiterhin gezeigt werden, dass die RNase-Aktivität von RNase7 und RNase3 nicht für die antimikrobielle Aktivität notwendig ist (Harder, J. und Schroder, J. M. 2002; Harder, J. und Schroder, J. M. 2005).

Auch von Keratinozyten der menschlichen Haut konstitutiv exprimierte antimikrobielle Proteine wurden bereits nachgewiesen. Neben den Befunden von Chen *et al.* (1986), die zeigten, dass **Lysozym** in der Epidermis menschlicher Haut exprimiert wird, wurde auch die sekretorische **Phospholipase A2** (Qu, X. D. und Lehrer, R. I. 1998) mit Wirkung gegen Gram-positive Bakterien nachgewiesen (Schadow, A. et al. 2001). Neben AMPs exprimieren humane Keratinozyten konstitutiv **Proteaseinhibitoren**, die humane Proteasen, wie z.B. Elastase, inhibieren und somit einer Gewebsschädigung durch körpereigene Proteasen (z.B. aus neutrophilen Granulozyten) oder bakteriellen Proteasen (z.B. Metalloproteinase) möglicherweise vorbeugen. Es wurden die Serinprotease-Inhibitoren Elafin (Wiedow, O. et al. 1990) und Antileukoprotease (ALP) (Wiedow, O. et al. 1998; Wingens, M. et al. 1998), auch bezeichnet als SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*), identifiziert und eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen. Ferner konnte kürzlich ein AMP, namens **Psoriasin**, aus Keratinozyten isoliert werden (Glaser, R. et al. 2005). Psoriasin (S100A7) gehört zur S100 Familie und wird durch *E. coli* in den Keratinozyten vermehrt gebildet und wirkt spezifisch gegen verschiedene *E. coli*-Stämme. Es konnte keine Aktivität gegen *S. aureus*, *S.*

epidermidis oder *P. aeruginosa* sowie gegen *C. albicans* festgestellt werden. Die antimikrobielle Aktivität ist abhängig von der Fähigkeit, Zn^{2+} -Ionen, die für die Bakterien lebenswichtig sind, zu binden bzw. ihnen zu entziehen (Glaser, R. et al. 2005).

1.2.4.5. Dermcidin

Bei differentiellen Untersuchungen zur Genexpression mittels subtraktiver Hybridisierung von Primärmelanomen versus benignen melanozytären Nävi konnte ein Klon identifiziert werden, der vermehrt in melanozytären Nävi exprimiert wurde (Hipfel, R. et al. 2000). Zu diesem Zeitpunkt der Isolierung waren keine Sequenzhomologien zu bekannten Genen vorhanden. Nach einer funktionellen Charakterisierung dieses Klones wurde dieser Dermcidin (DCD) genannt (Schitteck, B. et al. 2001).

Das *DCD*-Gen besteht aus 5 Exons und 4 Introns mit einer Gesamtlänge von 3714bp und ist auf Chromosom 12q13 lokalisiert. Die cDNA von Dermcidin hat eine Länge von 458bp mit einem offenen Leseraster von 330bp. Es werden insgesamt 110 Aminosäuren kodiert, wovon die N-terminalen 19AS das Signalpeptid kodieren (**Abb. 1**).

Mit Hilfe von RT-PCR Analysen verschiedener humaner Gewebe konnte gezeigt werden, dass das *DCD*-Gen besonders stark in menschlicher Haut transkribiert wird (Schitteck, B. et al. 2001). Mittels Immunhistochemie, *in situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenz von gesunder Haut konnte eine spezifische und konstitutive Expression von DCD in dunklen Zellen des sekretorischen Endstücks von ekkrinen Schweißdrüsenzellen, nicht aber in Keratinozyten, nachgewiesen werden. In den Schweißdrüsenzellen wurde DCD innerhalb des Golgi-Apparates und in den sekretorischen Granula lokalisiert. Nach proteolytischer Prozessierung wird DCD über sekretorische Granula in den Schweiß sezerniert (Schitteck, B. et al. 2001). Eine Induktion der DCD-Expression in primären Keratinozyten, Fibroblasten und Melanozyten über oxidativen Stress (H_2O_2) oder inflammatorische Stimuli ($TNF\alpha$, LPS) zeigte keine Wirkung. (Rieg, S. et al. 2004). Hingegen konnte die Expression von *DCD*-mRNA in Melanomzelllinien in geringem Maße induziert werden (Rieg, S. et al. 2004).

Wie die Defensine und Cathelicidine wird Dermcidin posttranslational prozessiert, wodurch am C-terminalen Ende die antimikrobiellen Peptide **DCD-1L** (48AS) und das um ein Leucin verkürzte Peptid **DCD-1** (47AS) generiert werden (Flad, T. et al. 2002; Rieg, S. et al. 2005). Mittels SELDI-TOF (*surface enhanced laser desorption ionisation-time of flight*)-Analysen konnte gezeigt werden, dass insgesamt 14 DCD-Peptide durch postsekretorische Prozessierung im ekkrinen Schweiß entstehen (Rieg, S. et al. 2006). Es wurden 13 C-terminale Peptide (AS-Positionen: 63-110) und ein N-terminales Peptid namens **YDP-42** (AS-

Position: 20-61) sowie dessen Dimer identifiziert. Die C-terminal abgeleiteten DCD-Peptide unterscheiden sich voneinander in ihrer Peptidlänge und in ihrer Nettoladung bei neutralem pH-Wert. So besitzen neun von dreizehn Peptiden eine anionische, zwei Peptide eine neutrale und wiederum zwei Peptide eine kationische Nettoladung (Rieg, S. et al. 2005).

Kürzlich wurde nachgewiesen, dass an der postsekretorischen Prozessierung der C-terminalen DCD-Peptide sowohl die Aspartat Proteinase Cathepsin D und eine 1,10-Phenanthrolin (Metalloprotease-Inhibitor) sensitive Carboxypeptidase, welche beide im Schweiß zu finden sind, involviert sind (Baechle, D. et al. 2006). Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob die Abspaltung der aktiven C-terminalen Region noch intrazellulär in den Schweißdrüsenzellen oder womöglich erst nach Sezernierung in den Schweiß geschieht.

Die prozessierte Form DCD-1 ist im ekkrinen Schweiß in einer Konzentration von 1-10 µg/ml vorhanden und weist ein breites antimikrobielles Spektrum gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie gegen Pilze auf (Schittek, B. et al. 2001). So wurde eine konzentrationsabhängige antimikrobielle Aktivität auf die Keime *E. coli*, *E. faecalis*, methicillin-sensitiver *S. aureus* (MSSA) und *C. albicans* nachgewiesen. Die Aktivität blieb innerhalb eines pH-Bereichs von 5,5 bis 7,4 in Phosphatpuffer und unter Zusatz von Natriumchlorid (25 bis 150 mM) sowie in einem Puffer, der in der Zusammensetzung dem menschlichem Schweiß ähnelt (sog. Schweißpuffer) mit einem pH-Wert von 5,5 oder 6,5, erhalten. Im Laufe dieser Arbeit erweiterten Untersuchungen das Wirkspektrum von DCD-1L und DCD-1 durch die antimikrobielle Aktivität auf *S. epidermidis* (Vuong, C. et al. 2004), *Pseudomonas putida*, methicillin-resistenter *S. aureus*, rifampicin- and isoniazid-resistenter *M. tuberculosis* (Lai, Y. P. et al. 2005) sowie *Listeria monocytogenes* und *Salmonella typhimurium* (Cipakova, I. et al. 2005).

Die Prozessierung des volle Länge Dermcidin Proteins generiert in anderen Zelltypen noch weitere N-terminal abgeleitete DCD-Peptide (**Abb. 1**). Zum einen wurde das Überlebensfördernde Peptid **Y-P30** (AS-Pos. 20-49) in Neuronalzellen (Cunningham, T. J. et al. 1998; Cunningham, T. J. et al. 2000) und zum anderen das kachexia-assoziierte Protein **PIF** (*proteolysis inducing factor*, AS-Pos. 20-39) in Melanomzellen, sowie in Leber und Skelettmuskel identifiziert (Todorov, P. T. et al. 1999).

Y-P30 und PIF werden nicht in ekkrinen Schweißdrüsen generiert. Y-P30 wird von oxidativ (H₂O₂) gestressten neuronalen Zellen und Retinoblastom-Zelllinien nach Induktion produziert und liefert einen Überlebensvorteil gegenüber den Zellen, die Y-P30 nicht produzieren (Cunningham, T. J. et al. 1998; Cunningham, T. J. et al. 2000). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Y-P30 von mononukleären Zellen schwangerer Ratten gebildet und zum

Embryo transportiert wird. Dort beeinflusst es die Differenzierung von Nervenzellen. PIF ist ein sulfiertes Proteoglykan und wurde als ein kachektischer Faktor identifiziert, der von Tumorzellen der Prostata (Wang, Z. et al. 2003), des gastrointestinalen Trakts (Caball-Manzano, R. et al. 2001) und von Melanomzellen (Todorov, P. T. et al. 1999) produziert wird und nach Applikation den Muskelabbau in Mäuse hervorruft (Todorov, P. et al. 1996; Wyke, S. M. und Tisdale, M. J. 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß etwa 10% von invasiven Mammakarzinomzellen DCD- RNA exprimieren (Porter, D. et al. 2003). Eine erhöhte Expression von DCD-RNA in diesen Zellen förderte das Zellwachstum und das Überleben nach Behandlung mit Menadion, ein Induktor für die Produktion von mitochondrialer reaktiver Sauerstoff-Spezies ROS (*reactive oxygen species*). Es wurde spekuliert, dass DCD seine Wirkung über eine Bindung an Oberflächenrezeptoren auf den Tumorzellen ausübt, wobei mögliche Rezeptoren bislang noch nicht beschrieben wurden. Diese Befunde zeigen, dass DCD scheinbar in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich prozessiert wird.

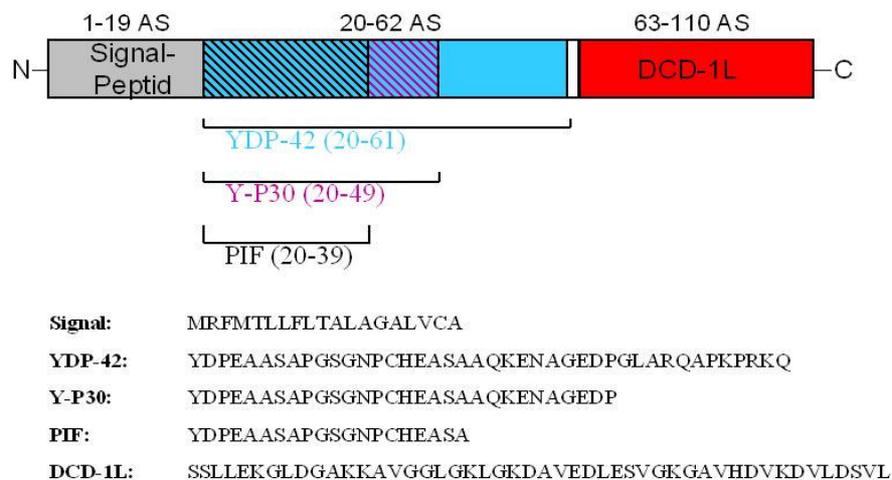


Abbildung 1: Schematische Darstellung der generierten DCD-Peptide

Es werden verschiedene Peptide nach Abspaltung des Signalpeptids generiert. So wurden im ekkrinen Schweiß das C-terminale AMP **DCD-1L** und das N-terminale Peptid **YDP-42** nachgewiesen, während weitere N-terminal generierte Peptide wie das **Y-P30** (AS-Positionen:20-49) in Neuronalzellen und das PIF (*proteolysis inducing factor*, AS-Positionen: 20-39) in Tumorzellen identifiziert wurden

1.3. Wirkmechanismen von antimikrobiellen Peptiden

Es gibt unterschiedliche Wirkmechanismen von AMPs, die zum Tode der Mikroorganismen führen. Zum einen können AMPs die Bakterienmembran permeabilisieren, so daß ein Zusammenbruch des Membranpotentials und schließlich der Tod der Zelle die Folge ist. Zum anderen können die AMPs an periplasmatische Rezeptoren oder intrazelluläre Moleküle wie

Nukleinsäuren und Enzyme binden, so dass lebenswichtige bakterielle Funktionen gestört werden.

1.3.1. Die Bakterienzellwand als Zielstruktur von AMPs

Die Bakterienzellwand ist Zielstruktur für viele AMPs. Besonders kationische antimikrobielle Peptide (CAMPs) interagieren über elektrostatische Wechselwirkungen mit der gegensätzlich geladenen Bakterienmembran. Die bakterielle Zellhülle besteht im Wesentlichen aus der Zytoplasmamembran und einer vorgelagerten Peptidoglykanschicht (Mureinschicht). Bei Gram-negativen Bakterien ist die Dicke der Peptidoglykanschicht (PG-Schicht) deutlich geringer (ca. 2nm) als bei Gram-positiven Bakterien (ca. 20-28nm), dafür besitzen Gram-negative Bakterien aber eine zweite, der Peptidoglykanschicht vorgelagerte äußere Membran (**Abb.2**), die aus Proteinen, Phospholipiden und Lipopolysacchariden (LPS) besteht.

Die innere Membran Gram-negativer Bakterien besteht ebenso wie die Innenseite der äußeren Membran im Wesentlichen aus den Phospholipiden Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Diphosphatidylglycerol. Die dünn-schichtige PG-Struktur ist im Periplasma zwischen der inneren und äußeren Membran eingebettet. An der Außenseite der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien sind Lipopolysaccharide (LPS) über die hydrophoben Enden in die Phospholipidschicht verankert (Nikaido, H. und Vaara, M. 1985). LPS wird auch als Endotoxin bezeichnet und spielt als integraler Virulenzfaktor aller Gram-negativen Bakterien bei der Immunabwehr eine große Rolle. Prinzipiell sind Lipopolysaccharide aus drei Teilkomponenten aufgebaut (Rietschel, E. T. et al. 1994): (1) der Membrananker, Lipid A (Phosphoglykolipid), (2) eine relativ konstante Polysaccharid-Kern-Region, die mit dem Lipid A in Verbindung steht und (3) eine äußere Polysaccharidkette, die von Keim zu Keim sehr variieren kann.

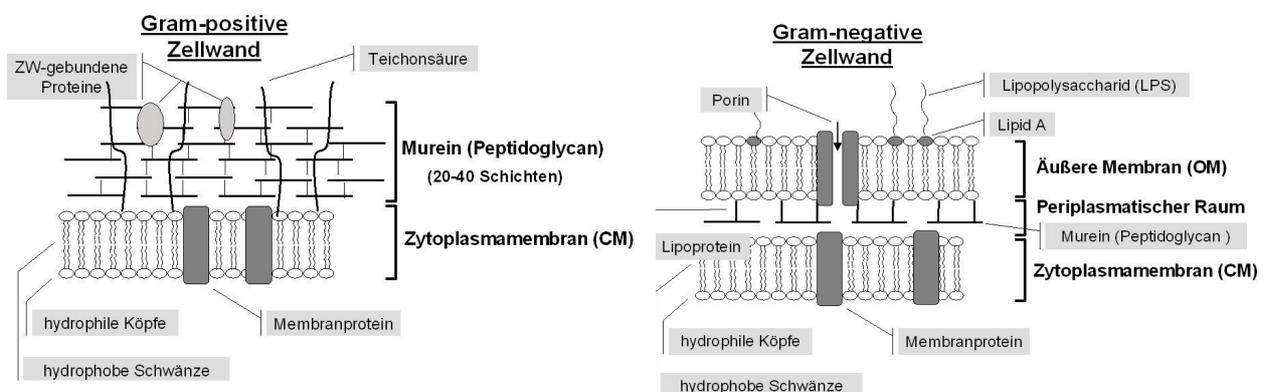


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zellwandaufbaus Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien

Als integraler Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Nikaido, H. und Vaara, M. 1985) kommen Transmembrankanäle, sogenannte Porine, vor. In der Regel bilden diese Proteine Homotrimere und stellen für hydrophobe Moleküle den wichtigsten Zugang zum Zellinneren dar. Durch die faßartige Struktur ermöglichen sie Molekülen bis etwa 600Da einen Durchtritt durch die ansonsten nahezu undurchlässige äußere Membran.

Die Zellwände Gram-positiver Bakterien besitzen eine massive dicke PG-Schicht, in die große Mengen an Teichonsäuren (TS) eingelagert sind. Teichonsäuren sind ein molekulares Markenzeichen der Gram-positiven Zellwand und sind meistens kovalent im PG verankert. Sie bestehen aus Ribitol-Phosphat-Polymeren (Ribitol-Ts) und Glycerol-Phosphat-Polymeren (Glycerol-TS), die als Kette nach außen ragen. Glycerol-TS können auch kovalent an Glycolipide der Plasmamembran gekoppelt sein und die gesamte PG-Schicht durchdringen; sie werden in diesem Fall als Lipoteichonsäuren bezeichnet. Zwischen der Plasmamembran und der äußeren Zellwand-PG liegt der sog. periplasmatische Spalt.

Ein allgemein anerkanntes Modell für AMPs zur Interaktion mit der Bakterienmembran konnte für einzelne Peptide (**Tab. 1**) bestätigt werden (Hancock, R. E. und Chapple, D. S. 1999; Hancock, R. E. und Scott, M. G. 2000; Wu, M. et al. 1999; Haukland, H. H. et al. 2001; Brogden, K. A. 2005). Die meisten AMPs besitzen wegen des Vorkommens kationischer, d.h. basischer Aminosäuren (Arginin und Lysin) unter physiologischen Bedingungen eine positive Nettoladung. Bei dem Modell wird davon ausgegangen, dass es durch die positive Ladung des Peptids zur elektrostatischen Interaktionen mit negativ geladenen Komponenten der Bakterienmembran, wie den Lipopolysacchariden (LPS) bei Gram-negativen und den Lipoteichonsäuren bei Gram-positiven Bakterien, kommt. Eine wesentliche Voraussetzung für die anschließende Einlagerung der Peptide in die Membran, ist die Ausbildung einer amphipathischen Peptidstruktur, d.h. die räumliche Trennung des kationischen und des hydrophoben Anteils (Hancock, R. E. und Diamond, G. 2000). Anschließend werden Peptid-Aggregate in der Weise gebildet, dass sich die hydrophoben Aminosäureketten des Peptids nach außen und die hydrophilen nach innen in der Bakterienmembran ausrichten. So entsteht in aggregierten Komplexen mit mehreren Peptiden ein äußerer lipophiler Ring, der sich in die Membranschicht der Bakterien einfügt. Die nach innen gerichteten Ionenladungen bilden einen hydrophilen Kanal, bzw. eine Pore, welche verschiedenen, wasserlöslichen Zellbestandteilen den Durchtritt ermöglicht. Der Vorgang, der schließlich zum Tod der betroffenen Zelle führt, besteht in der Ausbildung von Kanälen durch die zytoplasmatische Membran, die den Zusammenbruch des Membranpotentials bewirken (Yeaman, M. R. und Yount, N. Y. 2003; Brogden, K. A. 2005). Dieses allgemein anerkannte Modell zur Erklärung der

antimikrobiellen Wirkung der Peptide auf die Bakterienmembran wird nochmals in drei weitere theoretische Modelle (**Abb.3**) unterteilt (Brogden, K. A. 2005).

(1) Beim Teppich-Modell (*carpet-like*) bedecken die Peptidmoleküle die bakterielle Membranoberfläche und interagieren mit der Membran über den hydrophoben Peptid-Anteil. Nach Überschreiten einer sog. Grenzkonzentration dringen die Moleküle ungeordnet in das Membraninnere ein und zerstören so die Integrität der Membran.

(2) Das Fassdauben-Modell (*barrel-stave*) beschreibt die Bildung einer Transmembranpore, die über die Interaktion des hydrophoben Anteils und der weiteren Einlagerung des positiv geladenen Anteils der Peptide in das Innere der Membran induziert wird.

(3) Ein weiteres Modell (*toroidal-pore*) beruht darauf, dass AMPs Aggregate auf der Bakterienoberfläche bilden und in die Phospholipidschicht eine Pore wie beim *barrel-stave*-Modell induzieren. Jedoch ordnen sich die hydrophilen Köpfe der Phospholipidschicht in der Weise an, dass sie die Außenseite der Pore auskleiden.

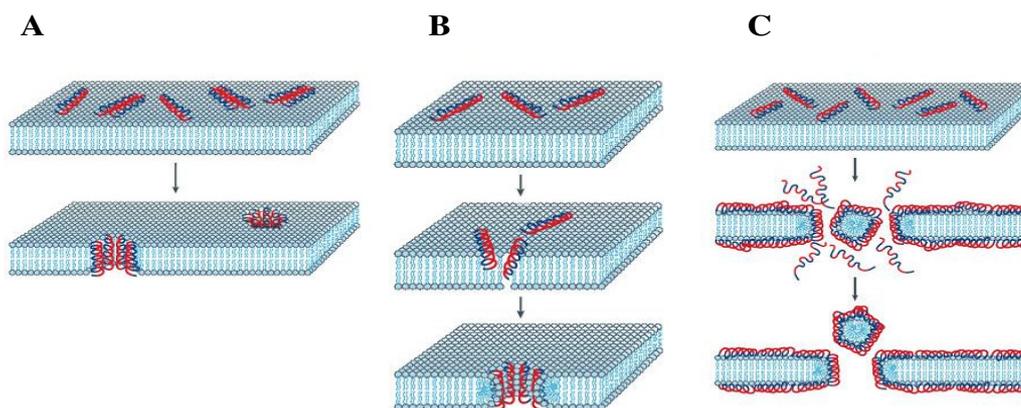


Abbildung 3: Permeabilisierungs-Modelle der Peptid-induzierten Tötung von Bakterien

Die Modelle A (*barrel-stave*), B (*toroidal-pore*) und C (*carpet-like*) beschreiben die Interaktion der AMPs mit der Bakterienmembran. Die **hydrophilen** Regionen der Peptide sind rot und die **hydrophoben** Regionen blau markiert. (modifiziert nach Brogden, 2005)

Bei allen drei genannten Modellen führt die Permeabilisierung der Bakterienmembran dazu, dass das Membranpotential aufgehoben wird und die Zelle stirbt. In der **Tab. 1** sind diejenigen Peptide aufgeführt, für die diese Modelle zur Beschreibung der Peptidinteraktion mit der äußeren Bakterienmembran zutreffen (Gazit, E. et al. 1995; Henzler Wildman, K. A. et al. 2003; Bechinger, B. 1999; Yamaguchi, S. et al. 2002; Naito, A. et al. 2000; Kang, J. H. et al. 1998).

Gegenüber Säugerzellen zeigen AMPs im allgemeinen eine geringe Zytotoxizität auf. Dies scheint auf dem unterschiedlichen Aufbau der Zellmembranen zu beruhen. So enthält die

bakterielle Membran anionische Phospholipide und trägt eine höhere Anzahl negativer Ladungen als die aus zwitterionischen Phospholipiden und Cholesterol aufgebaute Zellmembran der Säugerzellen. Die insgesamt geringere negative Ladung der Zellmembran reduziert die Interaktion mit den positiv geladenen Peptiden und so eine Schädigung der körpereigenen Zellen (Schroder, J. M. 2002).

Tabelle 1: AMPs wirken über verschiedene Bakterienmembran-Permeabilisierungstechniken (modifiziert nach Brogden, 2005)

Modell der AMP-Wirkung	AMPs	Referenz
<i>barrel-stave</i>	Alamethicin	Bechinger et al., 1999
<i>toroidal-pore</i>	Magainin II, Protegrin-1, Melittin, LL-37	Kang et al., 1998; Yamaguchi et al., 2002; Kang et al., 2001; Henzler Wildman et al., 2003
<i>carpet-like</i>	Cecropin, Melittin, Ovispirin	Gazit et al., 1995; Naito et al., 2000; Yamaguchi et al., 2001

1.3.2. Intrazelluläre Wirkungsweisen von antimikrobiellen Peptiden

Im Gegensatz zu den Permeabilisierungs-Modellen (*carpet-like*, *barrel-stave*, *toroidal-pore*), in denen der Zusammenbruch des Membranpotentials der Bakterienzelle als tödlicher Schritt angesehen wird, wurden weitere Wirkmechanismen von AMPs postuliert, wie z.B. die intrazelluläre Bindung an Rezeptormoleküle oder an essentielle Proteine und Nukleinsäuren (Hancock, R. E. und Diamond, G. 2000; Zhang, G. et al. 2000; Brogden, K. A. 2005; Hancock, R. E. und Rozek, A. 2002). Diese Bindung führt zur Hemmung von essentiellen Stoffwechselaktivitäten und schließlich zum Tode des Bakteriums (**Abb. 4**).

So konnte gezeigt werden, dass die arginin- und prolinreichen Cathelicidine, **PR-39** und bovines **Indolicidin**, die bakterielle DNA-Synthese blockieren. Das PR-39 inhibiert dabei die DNA-Synthese in der Weise, dass es die Degradierung von Proteinen induziert, die für die DNA-Replikation notwendig sind (Boman, H. G. et al. 1993). Weiterhin zeigten Untersuchungen von Park *et al.* (1998), dass **Buforin II** und Buforin abgeleitete Peptide *E. coli*-Zellen, ohne erkennbare Permeabilisierung der Bakterienmembran, abtöten. Buforin besitzt die Fähigkeit die Membran zu durchdringen, um dann im Zytoplasma an DNA und RNA zu binden. Als Voraussetzung für diese Eigenschaft, keinen Schaden an der Bakterienmembran zu verursachen, scheint das Vorhandensein von einem einzigen Prolin inmitten der 21 Aminosäuren zu sein (Park, C. B. et al. 2000; Park, C. B. et al. 1998). Ein Austausch von Prolin mit

Alanin führte nicht mehr zu einer intrazellulären Bindung an Nucleinsäuren sondern zu einer Magainin-ähnlichen Membranpermeabilisierung (Park, C. B. et al. 2000). Andererseits bewirkte der zusätzliche Einbau von Prolin in ein α -helikales AMP eine verminderte Fähigkeit, die Zytoplasmamembran zu permeabilisieren (Park, C. B. et al. 2000).

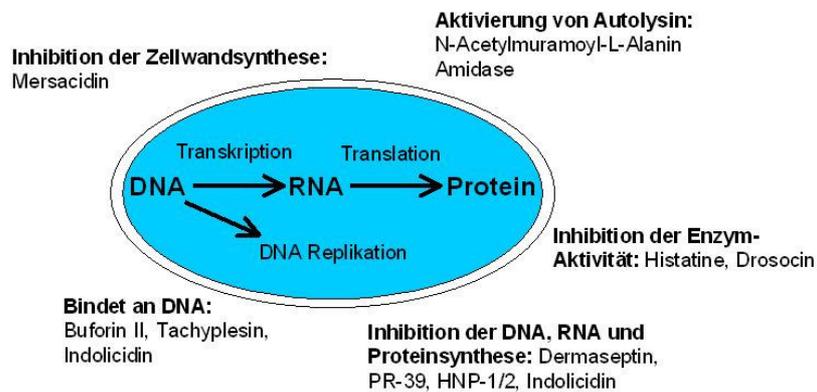


Abbildung 4: Intrazelluläre Wirkung von AMPs auf verschiedene Bakterienfunktionen

(modifiziert nach Brogden, 2005)

Ähnlich wie Buforin verhält sich das neutrophile **α -Defensin-1** (HNP-1), welches intrazellulär sowohl die Protein- als auch die DNA-Synthese von *S. aureus* hemmt (Xiong, Y. Q. et al. 1999). HNP-1 besitzt zwar eine Aktivität auf die Zytoplasmamembran, bewirkt jedoch über diese keine direkte Zellyse sondern leitet über die Inhibition von essentiellen Synthesen im Zellinneren, durch Bindung an die ribosomale Untereinheit 50S, den Zelltod ein (Xiong, Y. Q. et al. 1999; Koo, S. P. et al. 2001; Otvos, L., Jr. 2005). Auch das aus Fröschen isolierte **Dermaseptin** ist in der Lage die Bakterienmembran zu durchdringen, ohne dadurch einen offensichtlichen Schaden an der Membran zu verursachen (Patrzykat, A. et al. 2002). Dermaseptin inhibiert die RNA-Synthese im Bakterium. Weiterhin konnte für das prolinreiche **Apidaecin** gezeigt werden, dass es zunächst unspezifisch an die äußere Bakterienmembran bindet, durch diese ohne Membranschädigung hindurchwandert, um dann irreversibel an einen im Periplasma befindlichen Rezeptor zu binden. Schließlich wird das Peptid in den zytoplasmatischen Raum überführt und kann dort an noch unbekannte Zielstrukturen binden (Castle, M. et al. 1999). Die prolinreichen Peptide **Pyrrhocoricin** und **Drosocin** töten die Bakterien, indem sie spezifisch das 70kDa große *Heatshock*-Protein DnaK inaktivieren und unspezifisch die 60kDa großen Chaperone GroEL, welche für die Faltung von Proteinen notwendig sind, inhibieren (Otvos, L., Jr. et al. 2000; Kragol, G. et al. 2001). Die **Histatine** besitzen hauptsächlich antimykotische Eigenschaften. Sie binden an Membranrezeptoren von Hefen und gelangen in das Zytoplasma, wo sie am Mitochondrium der Hefe

einen ATP-Verlust induzieren (Kavanagh, K. und Dowd, S. 2004). Dieser Verlust an ATP, welches allgemein für die Biosynthese von vielen Molekülen essentiell ist, kann zum Tode der Zelle führen. Zusätzlich wird der Zellzyklus unterbrochen und die Freisetzung von reaktiver Sauerstoff-Spezies ROS (*reactive oxygen spesies*) in der Zelle ausgelöst (Andreu, D. und Rivas, L. 1998). Für das bakterielle Peptid **Nisin** wurde gezeigt, dass es eine bakterielle Autolyse durch Aktivierung der N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase induziert (Bierbaum, G. und Sahl, H. G. 1987).

Desweiterm können AMPs, wie **Lysozym**, **Elastase**, **Cathepsin G** und **Phospholipase A2**, über die Aktivierung ihrer autolytischen Zellwandenzyme (Murimidase) Bakterien töten (Ginsburg, I. 2004). Diese bakterizide Fähigkeit, die auf der Störung des komplexen Vorgangs der Zellwandsynthese auf wachsende Zellen beruht, ähnelt dem Wirkmechanismus von β -Laktam-Antibiotika, wie Penicilline und Cephalosporine.

Tabelle 2: Antimikrobielle Peptide und ihre Wirkungsweisen auf Bakterien

(modifiziert nach Brogden, 2005 und Otvos, 2005); k.A.: keine Angaben

Herkunft	AMPs	Aktivität auf Bakterienmembran	Intrazelluläre Zielstrukturen / Inhibition	Referenz
Insekten	Cecropin	+	k.A.	Gazit et al., 1995; Shai et al., 1995
	Drosocin	k.A.	<i>heatshock</i> Protein DnaK	Otvos et al., 2000
	Melittin	+	k.A.	Kang et al., 2001 Lee et al., 2004
	Dermaseptin	-	RNA-Synthese	Patrzykat et al., 2002
	Pleurocidin	(niedrige Konz.)		
Amphibien	Buforin II	-	Nukleinsäuren	Park et al., 1998
	Magainin II	+	k.A.	Matsuzaki et al., 1996 Hallock et a., 2003
Säuger/ Mensch	PR-39	k.A.	Proteinsynthese, induziert Filamentbildung	Boman, Agerberth 1993; Chan et al., 2001
	LL-37	+	k.A.	Henzler Wildman et al., 2003
	Protegrin-1	+	k.A.	Yamaguchi et al., 2002
	Indolicidin	-	Inhibierung der Zellteilung DNA-Synthese	Subbalakshmi, Sitaram 1998
	HNP-1	+	ribosomale Untereinheit 50S	Xiong et al., 1999
	HBD-2	+	k.A.	Hoover et al., 2000; Schröder1999; Yang et al., 1999
	Histatin	k.A.	Bindet an Hefe-Receptor, Mitochondrium	Andreu , Rivas, 1998; Kavanagh, Dowd, 2004

1.3.3. Resistenzmechanismen gegenüber antimikrobiellen Peptiden

Resistenzmechanismen gegen AMPs spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenität der Bakterien (Peschel, A. 2002). Es konnten verschiedene Resistenzmechanismen für Gram-positive und Gram-negative Bakterien gegenüber AMPs beschrieben werden.

(1) Ein wichtiger Abwehrmechanismus von Bakterien gegenüber AMPs besteht in der **Modifizierung von Membrankomponenten**. Dazu zählen Genprodukte, die die Zellhülle des Bakteriums chemisch so modifizieren, dass positive Ladungen eingefügt und somit Wechselwirkungen mit kationischen antimikrobiellen Peptiden (CAMPs) reduziert werden (Guo, L. et al. 1998; Peschel, A. et al. 1999; Peschel, A. et al. 2001).

Bei dem Biofilm-bildenden *S. aureus* spielt die Veränderung der Oberflächenladung bei der Entwicklung persistierender und chronischer Infektionen eine wichtige Rolle (Goldman, M. J. et al. 1997; Peschel, A. 2002). Der Stamm *S. aureus* besitzt wie auch viele andere Gram-positive Bakterien neben dem vielschichtigen Peptidoglycan (PG) anionische Teichonsäure-Polymere, die aus Glycerol- oder Ribitolphosphateinheiten aufgebaut sind. Es konnten vier Proteine identifiziert werden, die die Teichonsäuren mit D-Alanin verestern (Abb. 5) und somit positive Aminogruppen einfügen (Peschel, A. et al. 1999; Kristian, S. A. et al. 2005).

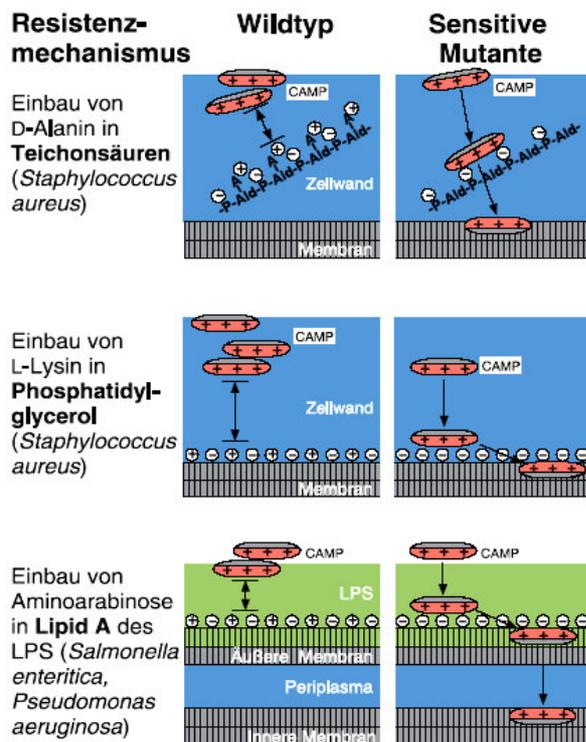


Abbildung 5: Resistenz gegen kationische antimikrobielle Peptide (CAMP) durch Modifizierung der Zellhülle.

Die bakterielle Zellhülle ist überwiegend aus anionischen Molekülen wie Peptidoglykan (blau), Phospholipiden (Grau) und Teichonsäuren (die Alditolphosphat-Untereinheiten sind mit Ald-P bezeichnet) oder Lipopolysaccharid (LPS; grün) aufgebaut. CAMP können aufgrund ihrer kationischen Eigenschaften gut mit diesen Komponenten interagieren. Die hydrophoben und hydrophilen CAMP-Bereiche sind grau beziehungsweise rot gezeichnet. Durch Modifizierung von Teichonsäuren mit D-Alanin, Phospholipiden mit L-Lysin oder Lipid A, dem Glycolipid des LPS, mit Aminoarabinose kann diese Interaktion vermindert werden (Peschel, A. 2002).

Die Proteine werden über das *dltABCD*-Operon gesteuert (Peschel, A. et al. 1999). Die *S. aureus-dltA*-Mutanten, welche eine Mutation im *dltA*-Operon tragen, zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Vancomycin und CAMPs, wie Defensine, Protegrine, Magainin II und

Nisin. Zusätzlich können die negativ geladenen Phospholipide der Zytoplasmamembran von *S. aureus* mit der basischen Aminosäure L-Lysin modifiziert werden (**Abb. 5**). Dies führt zu einer partiellen Neutralisierung der Membran und damit zur Reduzierung der Membranschädigung durch CAMPs (Peschel, A. und Collins, L. V. 2001). Der Einbau von L-Lysin in Phosphatidylglycerol wird über das *mprF*-Gen reguliert, welches anscheinend homolog zu Genen in anderen humanen Pathogenen wie *Mycobacterium tuberculosis*, *P. aeruginosa*, und *Enterococcus faecalis* ist (Yeaman, M. R. und Yount, N. Y. 2003). Beide Resistenzsysteme des *S. aureus* Stammes sind vergleichbar mit denen Gram-negativer Bakterien. Bei *Salmonella enteritica* und *P. aeruginosa* wurde nachgewiesen, dass das anionische Lipid A des LPS der äußeren Membran durch kationische Aminoarabinose modifiziert wird (**Abb. 5**), was ebenfalls zur ladungsabhängigen Abstoßung von CAMP führt (Belden, W. J. und Miller, S. I. 1994; Guo, L. et al. 1998; Ernst, R. K. et al. 1999; Guina, T. et al. 2000). Die Synthese von Aminoarabinose und dessen Transfer zu Lipid A wird über die Gene *pmrE* und *pmrHFIJKL* reguliert (Gunn, J. S. et al. 1998).

Entscheidend für die Virulenz von Mikroorganismen ist die Fähigkeit Biofilme zu bilden. Diese schützen die Bakterien vor der Immunabwehr der befallenden Organismen und vor eingesetzten Antibiotika. Die Voraussetzung, einen Biofilm zu bilden, sind erstens die Adhäsion der Zellen an eine Oberfläche und zweitens die Vernetzung und Ansammlung von mehreren Zellschichten. Im Biofilm-produzierenden *S. epidermidis* Stamm 1457 konnte ein Schleimpolymer namens PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) identifiziert werden (Mack, D. et al. 1996), welches für die Adhäsion der Zelle verantwortlich ist. Die Biosynthese des Polymers PIA erfolgt über das *icaABCD*-Gen und wird über den Regulator *icaR* gesteuert. Eine Mutation im *ica*-Gen von *S. epidermidis* führt dazu, dass die Biofilmbildung gestört und die Sensitivität gegenüber CAMPs erhöht wird (Vuong, C. et al. 2004; Gotz, F. 2002).

(2) Ein weiterer Resistenzmechanismus besteht in der gezielten Produktion und Sezernierung von bakteriellen **Proteasen**, welche AMPs enzymatisch inaktivieren können (Guina, T. et al. 2000; Sieprawska-Lupa, M. et al. 2004; Jin, T. et al. 2004). So konnte gezeigt werden, dass eine Außenmembran-Protease von *Salmonella enteritica*, namens PgtE der OmpT-Familie, spezifisch α -helikale CAMPs, wie das synthetische C18G (Peschel, A. 2002), enzymatisch schneidet und dadurch inaktiviert. Wiederum führte eine Inaktivierung dieser PgtE-Protease zu einer Sensibilisierung gegenüber den AMPs C18G, LL-37 und CRAMP. Für das LL-37 konnte weiterhin gezeigt werden, dass es spezifisch durch eine Metalloproteinase, namens Aureolysin, von *S. aureus* inaktiviert werden kann (Sieprawska-Lupa, M. et al. 2004). Eine

andere Metalloproteinase aus der Gattung *Salmonella*, die in der Aktivität der Magaininase ähnelt, konnte sowohl für die Inaktivierung der Magainine als auch von weiteren AMPs in der Haut von Amphibien verantwortlich gemacht werden (Groisman, E. A. 1994; Jarosz, J. 1997). Das Cecropin aus Insekten wird spezifisch durch ein Enzym, welches von dem pathogenen Erreger *Bacillus larvae* und von *Pseudomonas aeruginosa* produziert wird, enzymatisch inaktiviert (Jarosz, J. 1997; Jarosz, J. und Glinski, Z. 1990).

(3) Weiterhin können die eingedrungenen Peptide gezielt über sogenannte **Efflux-Pumpen**, die in der Zytoplasmamembran der Bakterien sitzen, aktiv aus der Zelle hinausbefördert werden (Shafer, W. M. et al. 1998; Bayer, A. S. et al. 2000). Dieser Resistenzmechanismus konnte für das Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* auf das humane Cathelicidin LL-37 und das Protegrin-1 nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um MtrCDE Efflux-Pumpen, die der RND (*resistance nodulation devisin*)-Familie angehören. Für *S. aureus* wurde eine weitere Efflux-Pumpe, welche für die Resistenz gegenüber Thromocidin aus Kaninchen verantwortlich ist, identifiziert. Diese gehört der MFS (*major facilitator superfamily*)-Familie an (Kupferwasser, L. I. et al. 1999).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, dass antimikrobiell wirksame Peptid **Dermcidin (DCD)**, welches in der Abteilung Dermatologische Onkologie am UKT identifizierte wurde (Hipfel, R. et al. 2000; Schitteck, B. et al. 2001) näher zu charakterisieren. Besonderes Interesse galt der Aufklärung des antimikrobiellen Wirkspektrums und des Wirkmechanismus der C-terminal abgeleiteten DCD-Peptide, welche sich vom DCD durch post-sekretorische Prozessierung ableiten und sich sowohl in ihrer Peptidlänge als auch in ihrer Nettoladung unterscheiden. Daher sollte analysiert werden, ob diese verschiedenen Peptideigenschaften einen Einfluß auf die antimikrobielle Wirkung haben.

In einem **ersten** Schritt sollten unterschiedliche mikrobielle Erreger, darunter auch ein multiresistenter Keim, und molekular-definierte Bakterienmutanten auf ihre Sensitivität gegenüber DCD-Peptiden in einem antimikrobiellen Test untersucht werden. In einem **zweiten** Schritt sollte die Wirkung der antimikrobiell aktiven Peptide auf bakterielle Membranen untersucht werden. Hierzu wurden verschiedene Methoden angewandt, mit Hilfe derer die Fähigkeit der DCD-Peptide, äußere und innere Membranen von Bakterien sowie artifizielle Phospholipidschichten zu permeabilisieren, analysiert werden konnten. Dazu mußten die Permeabilisierungstests neu etabliert werden. Um den Einfluß der strukturellen Voraussetzungen für eine antimikrobielle Aktivität der Peptide zu entschlüsseln, sollten mit

Hilfe von Circular-Dichroismus (CD)-Messungen in einem **dritten** Schritt die eingenommene Struktur der antimikrobiell aktiven Peptide bestimmt werden. Weiterhin galt es in einem **vierten** Schritt zu untersuchen, ob das *DCD*-Gene in anderen Spezies vorzufinden ist.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Chemikalien wurden, sofern nichts anderes angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma Aldrich (München) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Enzyme und Feinchemikalien wurden von Amersham-Pharmacia (Freiburg), New England BioLabs (Frankfurt), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Promega (Heidelberg), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen. Alle Lösungen und Medien wurden mit autoklaviertem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Schwalbach) angesetzt.

2.1.1. Phospholipide

Die folgenden Phospholipide besitzen Fettsäuren der Kettenlänge C18 und sind bei Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) bestellt worden. Sie wurden für die Herstellung von artifiziellen Liposomen verwendet (siehe 2.2.4.3.3). Diese Liposomen dienen sowohl zur Membranpermeabilisierungs-Analyse (siehe 2.2.4.3) als auch zur Analyse induzierter Sekundärstrukturen (siehe 2.2.4.1) von Dermcidin abgeleiteten Peptiden.

- Phosphatidylcholin (DOPC), MW: 786,15 g/mol [50mg/ml]
- Phosphatidylglycerol (DOPG), MW: 797,04 g/mol [50mg/ml]

2.1.2. Synthetische Peptide

Alle Peptide, wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Hilfe der Festphasensynthese nach R.B. Merrifield (siehe 2.2.1.1) im Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum (MNF) bei Herrn Dr. H. Kalbacher in Tübingen synthetisiert und über RP-HPLC bis zu einer Reinheit von $\geq 97\%$ (siehe 2.2.1.3) aufgereinigt.

- FITC-markierte Peptide (N-terminal)

Als Stocklösung für die FITC-markierten Peptide (siehe 2.2.1.2) wurde eine Konzentration von 10 μ M in 1xPBS (pH 7,4) eingestellt.

Bezeichnung	Masse [g/mol]	Bezugsquelle
DCD-1L - FITC	5296	(MNF) Kalbacher
LL-37 - FITC	4951,9	(MNF) Kalbacher
SSL-23 - FITC	2685,5	(MNF) Kalbacher

- **Humane Defensine**

Die folgenden Peptide wurden in autoklaviertem Milli-Q Wasser in einer Konzentration von 0,5mg/ml gelöst und bei -20°C weggefroren.

Bezeichnung	Abkürzung	Masse [kDa]	Bezugsquelle
β-Defensin 2	HBD-2	4,328	Sigma Aldrich (München)
α-Defensin 2	HNP-2	3,371	Sigma Aldrich (München)
α-Defensine 1/2	HNP-1/2	3,442/3,371	(MNF) Kalbacher

- **Humanes Cathelicidin LL-37**

Bezeichnung	Aminosäuresequenz	Masse [g/mol]	Bezugsquelle
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	4493.32	(MNF) Kalbacher

- **Eich-Peptid (30AS), diente zur Kalibrierung der FPLC-Säule (siehe 2.2.2.2)**

Bezeichnung	Aminosäuresequenz	Masse [g/mol]	Bezugsquelle
Eich-Peptid	ARGSVSDEEMMELREAFAYGRKRRQRRRG	3627,1	(MNF) Kalbacher

- **Dermcidin abgeleitete Peptide**

Die folgenden Peptide wurden in autoklaviertem Milli-Q Wasser in einer Konzentration von 1mg/ml gelöst und 30µl Aliquots bei -20°C weggefroren.

Tabelle 3: Übersicht über die Aminosäuresequenzen und Nettoladungen der synthetisierten DCD-abgeleiteten Peptide und des Negativ-Kontroll-Peptids DPI

Peptid-Name	Aminosäureposition / Aminosäuresequenz	Theor. Masse [Da]	Nettoladung
DCD-1L	63-110 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVLDSVL	4818.5	-2
DCD-1	63-109 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVLDSV	4705.3	-2
SSL-29	63-91 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDL	2869.3	0
SSL-25	63-87 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDA	2412.8	+2
SSL-23	63-85 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGK	2339	+3
LEK-45	66-110 LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVLDSVL	4531.2	-2
DPI	DPYAEAASGPNPGSKSHESAQAENCGADPE	2971.0	-5

2.1.3. Antikörper

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Bezeichnung	Antikörper-Typ	Spezifität	Bezugsquelle
G-81	Maus monoklonal	DCD (63-110AS)	Kimura A (Japan)
anti-DCD-1L	Kaninchen polyklonal	DCD (63-110AS)	Biochrom (Berlin)
nicht-immun-affinitätsaufge-reinigter DCD-Antikörper	Kaninchen polyklonal	DCD (63-109AS)	(MNF) Kalbacher
anti-HNP-1/2	Kaninchen polyklonal	Humanes α -Defensin 1/2	(MNF) Kalbacher
anti-HBD-2	Ziege polyklonal	Humanes β -Defensin 2	Cell Concepts GmbH (Umkirch)
anti-Lysozym	Maus monoklonal IgG1	Humanes Lysozym	Acris antibodies (Hiddenhausen)
anti-PIP	Maus monoklonal	Humanes PIP	Novocastra (UK)

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Bezeichnung	AntikörperTyp	Spezifität	Bezugsquelle
ZAK	Ziege polyklonal, biotinyliert	Kaninchen	DakoCytomation (Hamburg)
ZAM	Ziege polyklonal, biotinyliert	Maus	DakoCytomation (Hamburg)
KAZ	Kaninchen polyklonal, biotinyliert	Ziege	DakoCytomation (Hamburg)
ZAK-Gold-IgG	Gold gekoppelt, Ziege polyklonal, IgG	Kaninchen	Auromedprobe EM, Amersham, (Freiburg)
EAK-Cy3	Esel α Kaninchen, IgG (H+L) F(ab') ₂ Fragment	Kaninchen	Dianova (Hamburg)

2.1.4. Primer und Plasmid

Primer für DCD-PCR (Invitrogen, NV Leek, Niederlande)

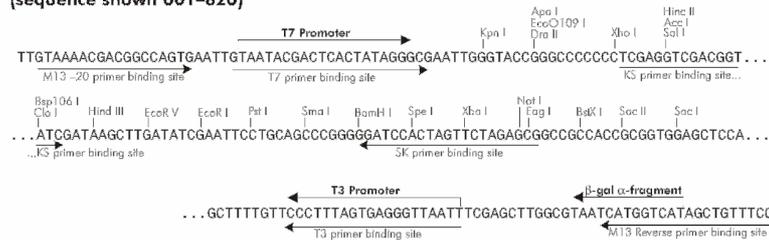
Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemp. T _m
RACE A	AGC ATG AGG TTC ATG ACT CTC	62°C
RACE B	CAC GCT TTC TAG ATC TTC GAC	62°C

Sequenzierungsprimer (Invitrogen, NV Leek, Niederlande)

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Schmelztemp. T _m
SK-Vektorprimer	CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC	60°C
KS-Vektorprimer	TCG AGG TCG ACG GTA TC	54°C
T7 Promotorprimer	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	62°C

Plasmidvektor pBluescript SK II (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Bakterieller Klonierungsvektor mit einer Ampicillinresistenz und dem α -Peptid des lacZ-Gens.

pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 601-826)**2.1.5. Allgemeine Lösungen und Puffer**

- **6xAgarosegel-Ladepuffer**
0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol
30% Glycerin
jeweils 1ml Aliquots, bei -20°C lagern
- **Äquilibrierungspuffer** (SDS-PAGE)
0,75M Tris-HCl
0,1M NaCl
50mM MgCl₂
pH 9,5 einstellen, bei RT lagern
- **DEPC-H₂O** (RNA-Arbeiten)
0,1% Diethylpyrocarbonat
ad 1l H₂O, 2x autoklaviert, bei RT lagern
- **Ethidiumbromid**
500ml 1xTBE
50µl Ethidiumbromid (10mg/ml)
bei RT dunkel lagern
- **HEPES-Puffer** (Außen-Membranpermeabilisierung)
1M (GibcoBRL)
- **2xLaemmli-Puffer** (SDS-PAGE)
10ml 1M Tris-HCl, pH 6,8
4g SDS
10ml Glycerin
10ml β -Mercaptoethanol
0,05g Bromphenolblau
ad 100ml Millipore-H₂O, aliquotiert, bei RT lagern
- **Laufpuffer** (SDS-PAGE)
24,8mM Tris Base
191,8mM Glycin
3,5mM SDS, bei RT lagern
- **Lösung I** (Plasmidisolierung)
50mM Glukose
25mM Tris-HCl, pH 8,0
10mM EDTA, pH 8,0
bei 4°C lagern
- **Lösung II** (Plasmidisolierung)
0,2N NaOH
1% SDS
- **Lösung III** (Plasmidisolierung)
3M Kaliumacetat
1,5% Essigsäure

-
- **Lysepuffer** (Zelllysatherstellung)
1xPBS-DULBECCO(Biochrom, Berlin)
0,5% (v/v) Triton X-100
5mM EDTA
0,1µM PMSF
10µM Pepstatin A
10µM Leupeptin
25µg/ml Aprotinin
frisch ansetzen und auf Eis lagern
 - **Maleinsäurepuffer**
0,1M Maleinsäure
0,15M NaCl
pH 7,5 einstellen, bei RT lagern
 - **100mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7,0)**
(100mM NAPB)
57,7ml 1M Na₂HPO₄
42,3ml 1M NaH₂PO₄
900ml H₂O
 - **10mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7,0)**
(10mM NAPB)
5,77ml 1M Na₂HPO₄
4,23ml 1M NaH₂PO₄
990ml H₂O
 - **30mM NAPB/30mM NaCl (pH 7,0)**
17,31ml 1M Na₂HPO₄
12,69ml 1M NaH₂PO₄
6ml 5M NaCl
964ml H₂O
 - **10mM NAPB/10mM NaCl (pH 7,0)**
5,77ml 1M Na₂HPO₄
4,23ml 1M NaH₂PO₄
2ml 5M NaCl
989ml H₂O
 - **1xPBS**
0,13M NaCl
7mM Na₂HPO₄
3mM NaH₂PO₄
pH 7,4 einstellen, bei RT lagern
 - **P60 Elutionspuffer**
10mM Tris-HCl, pH 8,0
1mM EDTA
50mM NaCl
bei 4°C lagern
 - **RNA-Ladepuffer**
50% Glycerin
1mM EDTA, pH 8,0
0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol
 - **Schweißpuffer**
40mM NaCl
10mM KCl
1mM CaCl₂
1mM MgCl
1mM NaH₂PO₄
Mit 1M HCl auf pH 5,5 bzw. 6,5 einstellen
 - **20xSSC**
3M NaCl
0,3M Tri-Natriumcitrat, pH 7,0
bei RT lagern
 - **TE-Puffer**
10mM Tris-HCl, pH 8,0
1mM EDTA
bei RT lagern
 - **10xTBE**
0,9M Tris Base
0,9M Borsäure
25mM EDTA
bei RT lagern
 - **Transferpuffer (SDS-PAGE)**
38,6mM Glycin
47,9mM Tris Base
1,3mM SDS
 - **Puffer K⁺ (CF-Versuch)**
50mM K₂SO₄
50mM Mes-KOH
20% (v/v) Methanol
Mit konz. KOH auf pH 6,5 einstellen

2.1.6. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kits

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Geräte

Anwendung	Gerät
Aggregations-Analyse	Fluorometer Tecan SPECTRAFluor (Crailsheim, Deutschland)
CD-Spektroskopie	Spektropolarimeter Jasco J-720 (Japan)
CF-Efflux-Experiment	Spektrofluorophotometer RF-5301 PC, Shimadzu (Japan)
Elektronenmikroskopie	Transmissions-EM Zeiss 109 (Oberkochen, Deutschland)
FACS-Analyse	FACSCalibur, BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
FPLC	LKB Bromma 2150 Pump; L-4000 UV-Detector (Merck&Hitachi), RF-535 Detector (Shimadzu)
Massenbestimmung	ESI-MS, TSQ 700 Triple Quadrupol MS MALDI-TOF, Q-ToF, Micromass, REFLEX Spektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Deutschland)
IM-Membranpermeabilität	Photometer SmartSpec™ Plus, BioRad (München, Deutschland)
OM-Membranpermeabilität	Fluorometer Tecan SPECTRAFluor (Crailsheim, Deutschland)
Peptid-Aufreinigung	HPLC-Anlage: L-6200; L4000A UV-Detector (Merck&Hitachi)
Peptid-Synthese	Syro II MultiSynTech (Witten, Deutschland)
PCR	Zyklus Biozym (Oldendorf, Deutschland)
Photometrische Messungen	Photometer SmartSpec™ Plus BioRad (München, Deutschland)
Proteintransfer	Semidry-Blotter: Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad Tank-Blotter: Trans-Blot Cell, BioRad (München, Deutschland)
Proteingelelektrophorese	Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN 3, BioRad (München, Deutschland)
Immunfluoreszenz	Laserskanmikroskop Leica TCS SP (Leica Microsystems Bensheim)
Inkubation	Brutschrank Function line, Heraeus (Hanau, Deutschland) Schüttler HS 260 basic, IKA (Staufen, Deutschland) Schüttelinkubator INFORS AG (Bottmingen, Schweiz) Thermoheizblock Techne (New Jersey, USA)
RNA-Crosslinken	UV Stratalinker, Stratagene (La Jolla, CA, USA)
DNA-Sequenzierung	ABI 373 DNA-Sequencer Perkin Elmer (Foster City, CA, USA)
Speed Vac	Speed Vac® Pus (SC110A), (Savant,)
Zentrifugation	Biofuge pico, Heraeus (Hanau, Deutschland) Megafuge 1.0R, Heraeus (Hanau, Deutschland) Varifuge 3.0R, Heraeus (Hanau, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien und Kits

- Blut-Agarplatten (Heipha Diagnostica, Eppelheim)
- Allgemeine Laborbedarfsartikel (Zentrallager des UKT, Tübingen)
- BCA (*bicinchoninic acid*) Reagenz (Pierce, Rockford, IL)
- BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)
- BioRad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- CDP-Star™ (Roche, Mannheim)
- Centri-Sep-Säulen (Applied Biosystems, NY, USA)
- Coomassie-Färbung Page Blue™ (Fermentas, St. Leon-Rot)
- DIG DNA Labeling Kit (Roche, Mannheim)

- DNA Gel Extraction Kit QIAquick (Qiagen GmbH, Hilden)
- Hybond-N+ Nylonmembran (Roche, Mannheim)
- Immobilon-P PVDF-Membran (0,2µM; 0,45µM) (Millipore GmbH, Eschborn)
- Mikro-Reaktionsgefäße 1,5ml, 2,0ml (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)
- Mikrotiterplatten (Nunc GmbH, Wiesbaden), (Cellstar, Greiner bio-one)
- Parafilm (Dynatech, Denkendorf)
- PCR Purification Kit QIAquick (Qiagen GmbH, Hilden)
- RNA-Clean (AGS, Heidelberg)
- Polypropylenröhrchen 15ml, 50ml (Greiner GmbH, Frickenhausen)
- Röntgenfilm Kodak X-OMAT (Eastman Kodak Company, Rochester, New York)
- Sterilfilter 0,22µm, 0,45µm (Millipore GmbH, Eschborn)
- Streptavidin-Alkalische Phosphatase (TROPIX, Bedford, USA)
- T/A-Cloning Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande)
- Whatman-3MM-Papier, (Whatman Roth, Karlsruhe)
- Zellkulturgefäße (Greiner GmbH, Frickenhausen)

2.1.7. Kultivierung und Stamm-Haltung von pro- und eukaryontischen Zellen

2.1.7.1. Stamm-Haltung und Kultivierung von Mikroorganismen

Die Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*), methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) (klinisches Isolat), methicillin-sensitiver *Staphylococcus aureus* (MSSA) und *Staphylococcus epidermidis* (*S. epi*) erfolgte bei 37°C auf Blutagarplatten, *Escherichia coli* ML-35p wurde auf LB-Amp-Platten (siehe 2.1.7.2) und die Mutante *Staphylococcus epidermidis ica⁻* und der dazugehörige Wildtyp *Staphylococcus epidermidis* 1457 wurden auf LB-Tet-Platten (siehe 2.1.7.2) kultiviert. Die Membran-Mutanten *Staphylococcus aureus mprF*, *Staphylococcus aureus dltA* und der dazugehörige Wildtyp *Staphylococcus aureus* 113 wurden auch auf Blutagarplatten kultiviert. Der Ausstrich auf die Platten sollte als Einzelkoloniaustrich erfolgen, um so eventuell vorhandene Kontaminationen anhand des unterschiedlichen Koloniewachstums leichter erkennen zu können. Nach 12-24 Stunden Inkubation bei 37°C können die Kulturen bei 4°C ca. 2-12 Wochen gelagert werden. Zur Herstellung einer Dauerkultur, wurden 1ml LB-Medium mit dem gewünschten Keim angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Für die Stämme *Escherichia coli* ML-35p wurde LB-Amp.-Medium und für *Staphylococcus epidermidis* 1457 und *Staphylococcus epidermidis ica⁻* LB-Tet.-Medium verwendet. Am nächsten Tag wurden zu 0,75ml der Übernachtskultur 0,5ml 50% Glycerol pipettiert, die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

Tabelle 7: Überblick über die Bakterienstämme

Die Bakterien wurden für den antimikrobiellen Test (siehe 2.2.3) auf eine Zellzahl (CFU) von 1×10^6 eingestellt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden Verdünnungsreihen (1×10^4 - 1×10^6) in LB-Medium mit der jeweiligen Bakteriensuspension, welche eine OD_{600} von 1 besaß, erstellt und anschließend auf Agarplatten ausplattiert. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden gezählt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die erhaltene CFU wurde mit dem ausplattierten Volumen der Bakteriensuspension verrechnet und auf ein Volumen von 1ml umgerechnet. Somit wurde die Zellzahl ermittelt, die in einem Volumen von 1ml bei einer OD_{600} von 1 vorhanden ist ([CFU/ml] bei $OD_{600}=1$).

Bakterienstamm	[CFU/ml] bei $OD_{600}=1$	Besonderes	Bezugsquelle
MSSA (ATCC 25923)	$1,97 \times 10^8$	methicillinsensitiv	Hygiene Institut Tübingen
MRSA (klinisches Isolat)	$1,97 \times 10^8$	methicillinresistent	Hygiene Institut Tübingen
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	$2,03 \times 10^8$	-	Hygiene Institut Tübingen
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	$8,56 \times 10^8$	-	Hygiene Institut Tübingen
<i>Escherichia coli</i> ML-35p	$8,56 \times 10^8$	Plasmid trägt Gen für Amp.-Resistenz + β -Galaktosidase	Prof. R. Lehrer (Los Angeles)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	$4,6 \times 10^8$	nicht-mukoid	Hygiene Institut Tübingen
<i>Staphylococcus aureus</i> 113	$1,97 \times 10^8$	Wildtyp der <i>mprF</i> + <i>dltA</i> -Mutanten	Prof. A. Peschel (Tübingen)
<i>Staphylococcus aureus mprF</i> ⁻	$1,97 \times 10^8$	Phospholipid- Mutante	Prof. A. Peschel (Tübingen)
<i>Staphylococcus aureus dltA</i> ⁻	$1,97 \times 10^8$	Teichonsäure- Mutante	Prof. A. Peschel (Tübingen)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457	$2,03 \times 10^8$	Wildtyp der <i>ica</i> - Mutante, Tet.- Resistenz	Prof. F. Götz (Tübingen)
<i>Staphylococcus epidermidis ica</i> ⁻	$2,03 \times 10^8$	Tet.-Resistenz; Mutante	Prof. F. Götz (Tübingen)

2.1.7.2. Medien und Platten für Mikroorganismen

- **LB-Medium**
10g NaCl
10g Trypton
5g Hefeextrakt
in 1l H₂O lösen, autoklaviert
- **TSB-Medium**
17g Pepton aus Casein
3g Peptone aus Sojamehl
2,5g D(+)-Glucose
5g NaCl
2,5g K₂HPO₄
in 1l H₂O lösen, autoklaviert

- **Ampicillinhaltiges Medium**
Ampicillin (50µg/ml) wurde erst aus einer 50mg/ml Stl. zugegeben, nachdem das Medium auf ca. 50°C abgekühlt war.
- **Tetracyklinhaltiges Medium**
Tetracyclin (30µg/ml) wurde erst aus einer 30mg/ml Stl. zugegeben, nachdem das Medium auf ca. 50°C abgekühlt war.
- **LB-Agarplatten**
1,5% Agar-Agar
1l LB-Medium
autoklaviert
- **Columbia-Blutagarplatten**
(Heipha Diagnostica)
23g Spezialpepton
1g Stärke
5g NaCl
14g Agar
50ml Hammelblut
in 1l H₂O lösen, pH 7,3 ± 0,2
einstellen, autoklaviert

2.1.7.3. Kultivierung der humanen Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3

Die Schweißdrüsen-Zelllinie NCL-SG3 diente zur DCD-Expressionsanalyse und stand uns sowohl mit einer Passagenzahl von P81 als auch mit P224 zur Verfügung. Diese Zelllinie wurde, wie unter Lee et. al. (Lee, C. M. und Dessi, J. 1989) beschrieben, aus Haut eines 72-jährigen verstorbenen (post-mortem) Mannes isoliert, in William's E Medium mit 5% FKS kultiviert und über Simian Virus 40 immortalisiert (Lee, C. M. und Dessi, J. 1989). Diese Zelllinie besitzt charakteristische Intermediärfilamente bzw. Morphologie epithelialer Zellen und ist zum epithelialen Ionentransport fähig. Die Zelllinie wurde in unbeschichteten T75 Kulturflaschen in 15ml Nährmedium (siehe unten) im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 35% kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte ab einer Konfluenz von ca. 90%. Um die Zellen zu trypsinisieren wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit HBSS (Gibco, Karlsruhe) gewaschen, um das FKS zu entfernen und so eine Blockierung der Trypsinreaktion zu verhindern. Das HBSS wurde abgesaugt und 4ml Trypsin in PBS (Biochrom, Berlin) zu den Zellen gegeben. Die Kulturflaschen wurden für 3-5min im Brutschrank bei 37°C inkubiert und das Ablösen der Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Sobald sich ca. 90% der Zellen vom Boden abgelöst haben, wurde mit 8ml der Stopp-Lösung (siehe unten) die Trypsinreaktion beendet. Die Lösung wurde in ein 15ml Reaktionsgefäß (BD Bioscience, Heidelberg) überführt und 5min bei 1200Upm zentrifugiert (Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert und auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese im unten aufgeführten Einfriemedium resuspendiert und bei -80°C eingelagert.

- **Nährmedium der NCL-SG3-Zelllinie**
 - 500ml William's E Medium (Invitrogen)
 - L-Glutamin (1mM)
 - Penicillin (100U/ml)
 - Streptomycin (100µg/ml)
 - Insulin (10µg/ml)
 - Transferrin (10µg/ml)
 - Hydrocortisone (10µg/ml)
 - EGF (10ng/ml)
- **Stopplösung**
 - Nährmedium + 5% FKS
- **Einfriermedium**
 - 7ml Nährmedium + 5% FKS
 - 2ml FKS
 - 1ml DMSO

2.1.8. Datenbankprogramme

Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Programms (Altschul, S. F. et al. 1997) auf Homologien mit bekannten Genen in der GenBank, EMBL (*european molecular biology laboratory*) und SWISS Datenbank untersucht. Folgende Internetseiten führen zu den benutzten Datenbankprogrammen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> <http://www.expasy.org> <http://www.hprd.org>. Die Aminosäuresequenz-Darstellung eines „Helixrades“ wurde mit Hilfe des Visualisierungsprogrammes ANTHEPROT 2000 release5 erstellt (<http://anthept-pbil.ibcp.fr>). Die Tertiär-Struktur-Vorhersage wurde mit Hilfe von HMMSTR (*hidden markov model for local sequence-structure correlations in proteins*) erstellt und mit dem Visualisierungsprogramm MolMol (www.mol.biol.ethz.ch/wuthrich/software/molmol) bearbeitet.

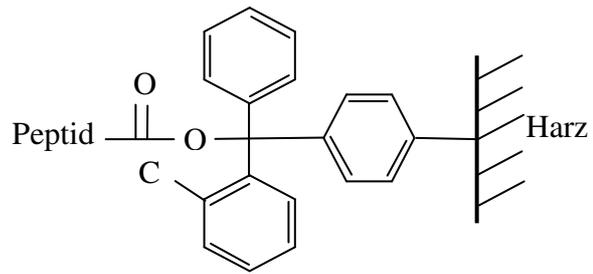
2.2. Methoden

2.2.1. Proteinchemische Methoden

2.2.1.1. Peptidsynthese

Peptide wurden nach der von Merrifield entwickelten Festphasenpeptidsynthese bei Dr. Hubert Kalbacher im Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum (MNZ) in Tübingen hergestellt (Merrifield, R. B. 1969). Die Peptide wurden beginnend vom C-Terminus über einen Linker (Esterbindung) an ein Trägerharz gebunden (**Abb. 6**) und schrittweise um jeweils eine Aminosäure verlängert. Um Nebenreaktionen zu vermeiden war der selektive und reversible Schutz sowohl der Amino- als auch der Carboxy-Gruppen der Aminosäuren durch eine Fmoc-Schutzgruppe notwendig.

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Festphasensynthese Der C-Terminus des zu synthetisierenden Peptids wurde über einen Linker (Esterbindung) mit dem Harz verknüpft.



Die in dieser Arbeit charakterisierten Peptide wurden nach einem von Atherton & Sheppard (1989) beschriebenen Protokoll für Fmoc-Synthesen mit Hilfe des Synthesizers Syro II MultiSynTech synthetisiert. Jede Addition einer Aminosäure enthielt folgende drei Folgereaktionen: Entschützung, Aktivierung, Kopplung. Um schrittweise Aminosäuren anzuhängen, mußte zuvor die Fmoc-Schutzgruppe vom N-Terminus des Peptids mit einem sekundären Amin, dem Piperidin, abgespalten werden. Die Ausbildung der Peptidbindungen wurde durch verschiedene Kopplungsreagenzien, wie N-Methylmorpholin und O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU), beschleunigt. Wenn die Synthese abgeschlossen war, wurden sowohl die Schutzgruppen von den Seitenketten als auch das fertige Peptid vom Harzlinker mit 92% TFA, 5% Thioanisol, 3% Triisopropylsilan und Phenol abgespalten. Die fertigen Peptide wurden über die präparative RP-HPLC (siehe 2.2.1.3) bis zu einer Reinheit von $\geq 97\%$ aufgereinigt und gefriergetrocknet. Anschließend wurde die Reinheit und die Masse über ESI bestimmt.

2.2.1.2. Fluoreszenzmarkierung eines Peptids

Um die Aggregationsanalyse der zu untersuchenden Peptide über Fluoreszenzlöschung (siehe 2.2.4.2) durchführen zu können, wurden nach Synthese und Aufreinigung der Peptide über RP-HPLC (siehe 2.2.1.3) diese an Fluoreszeinisothiocyanat (FITC, MG: 389,4) gekoppelt. Eine direkte Kopplung von FITC an den N-Terminus des Peptids war nicht möglich, da sonst eine Reaktion analog zum Edman-Abbau unter Hydantoinbildung auftreten würde. Daher wurde zunächst der Linker β -Alanin an das Peptid gekoppelt und anschließend der Fluoreszenzfarbstoff FITC. Für die Kopplung von β -Alanin wurden 50mg Harz, an dem C-terminal ca. 0,0125mmol Peptid gekoppelt waren, mit dem 8-fachen Überschuß (31,1mg) Fmoc- β -Ala-OH, 32,1mg TBTU, 0,2ml NMM (1M) und einer Spatelspitze HOBt versetzt und in 0,8ml DMF gelöst. Nach Waschen mit DMF wurde die Schutzgruppe Fmoc mit 40%-igen Piperidin abgetrennt und wieder mit DMF gewaschen. Anschließend wurde die Kopplung des Fluorophors FITC durchgeführt, indem es im 4-fachen Überschuß (19,45mg) und außerdem mit 0,1ml NMM (1M) und 0,9ml DMF zugegeben wurde. Nach Waschen mit DMF und

Isopropanol wurde mit Ether getrocknet. Die Abspaltung des fertigen FITC-markierten Peptides erfolgte analog zur Peptidsynthese unter 2.2.1.1.

2.2.1.3. Sammeln von humanem ekkrinem Schweiß

Für DCD-Untersuchungen wurde der ekkrine Schweiß aus dem Gesicht und Rücken bei körperlicher Ertüchtigung auf einem Fahrrad (*Home-Trainer*) mit einem 50ml Falconröhrchen abgenommen und direkt auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation des Schweißes mit 13000Upm (Biofuge, Heraeus, Hanau) bei 4°C, um Hautzellen wie Keratinozyten zu entfernen. Wenn dieser Schweiß direkt, ohne diesen bei -20°C einzufrieren, für Untersuchungen verwendet wurde, wurde dieser als „frischer Schweiß“ bezeichnet. Der Überstand wurde für Western Blot Analysen (siehe 2.2.1.5) und für die Isolierung von DCD-Peptiden über RP-HPLC (siehe 2.2.2.1) verwendet.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.2.1.4.1 Bradford-Test

Mit dem Bio-Rad Protein-Test, welcher auf der Bradford-Methode basiert, wurde die Proteinkonzentration von Zelllysaten und Schweißfraktionen aus HPLC-Reinigung (siehe 2.2.1.3) ermittelt. Bei der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 (BioRad, München) an Proteine im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe (465nm ohne Protein, 595nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Durch die Bestimmung der Konzentration konnte bei der Western Blot Analyse eine definierte und gleiche Proteinmenge eingesetzt werden. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit Hilfe von BSA wurde eine Eichgerade erstellt. Anhand der Eichgerade war es möglich, über die gemessene optische Dichte (OD_{595}) die Proteinkonzentration der jeweiligen Zelllysate zu berechnen.

2.2.1.4.2 BCA-Test

Die Bestimmung von geringen Proteinkonzentrationen erfolgte nach Smith *et al.* (1985) mit dem BCA (*bicinchoninic acid*) Reagenz von Pierce (Rockford, IL). Das Reaktionsschema kombiniert die Biuret-Reaktion (Protein und Cu^{2+} in alkalischer Lösung führt zur Bildung von Cu^{1+}) mit dem wasserlöslichen Natriumsalz der Bicinchoninsäure, einem sehr spezifischen Nachweisreagenz für Cu^{1+} . Durch die Interaktion von zwei BCA-Molekülen mit einem Cu^{1+} -Ion entsteht ein wasserlösliches, violettees Reaktionsprodukt mit einem Absorptionsmaximum bei 562nm. Dies erlaubt die photometrische Quantifizierung von Proteinen in wässriger

Lösung. Der BCA-Test diente zur Peptid- und Antikörper- Konzentrationsbestimmung. Zu 1ml BCA-Arbeitsreagenz wurden 50 μ l Probelösung gegeben. Die Proben wurden ca. 30min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5min auf Eis gekühlt und anschließend ihre Absorption bei 562nm gegen einen Referenzwert gemessen. Als Referenzwert wurden je nach Lösungsmittel 50 μ l 1xPBS, dH₂O oder 10mM NAPB (pH 7,0) zu 1ml BCA-Arbeitsreagenz gegeben. Zur Erstellung der Eichgerade für die Peptidkonzentrationsbestimmung wurden aus einer 10mg/ml BSA-Stocklösung und für die Antikörperkonzentrationsbestimmung aus einer 10mg/ml BGG-Stocklösung Konzentrationen von 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml und 12,5 μ g/ml hergestellt.

2.2.1.5 Western Blot Analyse

2.2.1.5.1 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli mit 18% und 15%-igen Polyacrylamidgelen. Die Proben wurden vor Auftrag auf ein Polyacrylamidgel mit 2xLaemmli-Puffer versetzt, für 5min bei 96°C im PCR-Zykler (Biozym, Oldendorf) denaturiert und anschließend kurz abgekühlt. Der Rainbow-Marker RPN755 (Amersham, Freiburg) wurde nach Herstellerangaben zusätzlich zur Größenabschätzung auf jedes Gel aufgetragen. Die Probenauftrennung erfolgte zunächst im Sammelgel für 15min bei 60V, 150mA und anschließend im Trenngel für 60-90 Minuten bei einer Spannung von 100V.

2.2.1.5.2 Proteintransfer

Nach der Proteinauftrennung im Polyacrylamidgel wurden die Gele für mindestens 20min in Transferpuffer (siehe 2.1.5) inkubiert und anschließend die Proteine in einem Semi-Dry-Verfahren (Towbin, H. et al. 1979) bei 0,8 mA/cm² für 1h oder über einen Tank-Blotter (3h bei 100V und 400mA) auf eine PVDF-Membran (Roche, Mannheim) bzw. für die Detektion von Defensinen (<5kDa) auf die PVDF Immobilon-P^{SQ} (Millipore GmbH, Eschborn) transferiert. Die PVDF-Membran wurde zuvor in Methanol aktiviert und kurz in Millipore-H₂O gewaschen.

2.2.1.5.3 Immundetektion

Durch die Immundetektion war es möglich, das Vorhandensein eines bestimmten Proteins qualitativ und quantitativ zu erfassen. Dazu dienen Antikörper, die spezifisch an die Epitope des gewünschten Proteins binden. Alle durchgeführten Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einem Schüttler (HS 260 basic, IKA). Die Membranen, auf die zuvor die Proteine transferiert wurden, wurden kurz in 1xPBS (siehe 2.1.5) gewaschen und im Anschluss durch Zugabe von 1xPBS/10% Milchpulver (Töpfer, Dietmannsried) für ca. 1h bei RT gegen unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte indirekt über einen Biotin-konjugierten sekundären Antikörper und Streptavidin-AP (Alkalische Phosphatase) (TROPIX, Bedford, USA). Als Substrat für die Alkalische Phosphatase wurde CDP-Star (Roche, Mannheim) verwendet.

Die Inkubation des Primärantikörpers (siehe 2.1.3) erfolgte bei 4°C ü. N. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x10min in 1xPBS gewaschen und für 1h bei RT mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (siehe 2.1.3) behandelt. Die entsprechenden Sekundärantikörper (ZAM oder ZAK, **Tab. 5**) wurden in einer Verdünnung von jeweils 1:1500 in 10ml 1xPBS/10% Milchpulver eingesetzt. Die Membranen wurden 3x10min in 1xPBS gewaschen und anschließend mit 1:1000 verdünntem Streptavidin-AP (Roche, Mannheim) in 10ml 1xPBS/10% Milchpulver für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut für 3x10min in 1xPBS gewaschen und kurz in Äquilibrationpuffer (siehe 2.1.5) geschwenkt. CDP-Star wurde 1:100 in 7ml Äquilibrationpuffer verdünnt und die Membranen darin für 10min stark geschüttelt. CDP-Star wird durch die alkalische Phosphatase, welche im Streptavidin-AP enthalten ist, phosphoryliert. Dadurch bildet sich ein metastabiles Dioxetan-Phenolat-Anion, welches in gepufferter Lösung zerfällt und Licht der Wellenlänge 466nm emittiert. Diese Lichtemission wurde durch Autoradiografie (Kodak X-OMAT chemiluminescent) nachgewiesen.

2.2.1.6 Anfärbung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel

2.2.1.6.1 Coomassie-Färbung

Durchgeführt wurde die Coomassie-Färbung mit der Fertiglösung Page BlueTM (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Durch die kolloidalen Eigenschaften bindet der Farbstoff mit hoher Spezifität an Proteine und minimal an die Gelmatrix. Die Coomassie-Färbung diente für den Nachweis von hohen Proteinmengen (> 200ng/Bande) in Polyacrylamidgelen. Sie beruht auf der Methode von Neuhoff (Neuhoff, V. et al. 1988). Das fertige SDS-Gel wurde 3 mal 5min

in dH₂O gewaschen und nach der Anleitung des Herstellers mit der Fertigfärbelösung für 3 bis 12h unter leichtem Schütteln überschichtet. Die Entfärbung erfolgte in einer frischen Plastikschaale unter leichtem Schütteln mit dH₂O, das mehrmals ausgetauscht wurde. War die Entfärbung der Gelmatrix ausreichend, wurde das Gel für die Vakuum-Trocknung auf Whatman Filterpapier gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und mit einem Vakuumtrockner für 1h bei 80°C getrocknet.

2.2.1.6.2 Silber-Färbung

Die Silberfärbung wurde für den sensitiven Nachweis geringer Proteinkonzentrationen (<200ng/Bande) in Polyacrylamidgelen eingesetzt. Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel in eine saubere Plastikschaale überführt. Das Gel wurde für 1-3h (bis über Nacht) in 20ml Fixierlösung (50% Ethanol, 12% CH₃COOH, 38% dH₂O) geschüttelt. Die Fixierlösung wurde abgossen und das Gel 1x 20min in 30% Ethanol geschwenkt und für genau 1min in 20ml Thiosulfatlösung (0,2g/l) geschüttelt. Die Lösung wurde abgossen, 3x kurz (20 Sek.) mit dH₂O gewaschen und anschließend 20min in 10ml Silbernitratlösung (10ml dH₂O, 19µl Formaldehyd, 0,2ml 10% Silbernitrat) geschwenkt. Das Gel wurde 3x kurz (20 Sek.) mit dH₂O gewaschen und 20ml Entwicklerlösung (60g/l NaCO₃, 40mg/l Natriumthiosulfat, 500µl/l Formaldehyd) zugeben. Die Entwicklung dauerte solange an, bis die jeweiligen Banden deutlich erschienen sind (1-10min) und wurde mit Hilfe der Stopplösung (25% Ethanol, 12% CH₃COOH, 63% dH₂O) abgestoppt. Anschließend wurde das Gel für die Vakuum-Trocknung auf Whatman Filterpapier aufgezogen. Dann wurde auf das Gel Frischhaltefolie gelegt und mit einem Vakuumtrockner für 1h bei 80°C getrocknet.

2.2.1.7 Proteinsequenzierung

Die Überprüfung der Identität von Proteinen in einem mit Coomassie angefärbten Polyacrylamidgel wurden nach tryptischen Verdau an einem Bruker Reflex III und an einem Q-Tof, Micromass, durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteinbanden ausgeschnitten und zur Sequenzanalyse gegeben, welche freundlicherweise von Herrn Joern Dengjel (Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Universität Tübingen) durchgeführt wurde.

2.2.1.8 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation wurden Antikörper gegen Dermcidin (siehe 2.1.3) an Protein-A-Agarose (Bindungskapazität >18mg IgG/ml) gebunden und mit menschlichem Schweiß oder synthetischem Peptid versetzt. Zunächst wurden die Proben, die aus 1ml sterilfiltriertem (0,2µm) ekkrinen Schweiß bestanden, mit 50µl Protein A-Agarose über Nacht bei 4°C in-

kubiert. Durch die Vorinkubation wurden Proteine, welche unspezifisch an den spezifischen Antikörper binden könnten, entfernt. Die Protein-A-Agarose Präzipitate wurden dann bei 10000xg sedimentiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Überstände mit 2µg des entsprechenden Antikörpers (anti-DCD, anti-PIP) bzw. des Antikörpers der Isotyp-Kontrolle (IgG) bei 4°C für 3h unter Rotation inkubiert. Die gebildeten Immunkomplexe wurden durch Zugabe von 50µl Protein-A-Agarose 1h bei 4°C präzipitiert. Bei der Verwendung des monoklonalen G-81 Antikörpers (IgM) wurde vor Zugabe von immobilisiertem Protein A noch 1h mit anti-Maus IgG inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (10000xg, 1min, 4°C) wurde der Überstand verworfen. Die Immunpräzipitate wurden zweimal mit 500µl 1xPBS gewaschen und mit 30µl 2xLaemmli-Puffer versetzt und wie unter 2.2.1.5.1 beschrieben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und über Immundetektion (siehe 2.2.1.5.3) analysiert.

2.2.2. Analytische und chromatographische Methoden

2.2.2.1. Analytische und präparative Umkehrphasen-Chromatographie

Zur Aufreinigung der synthetisierten Peptide und zur Isolierung der im Schweiß enthaltenen Peptide wurde die Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC) verwendet, welche die Probe nach ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität auftrennt. Dabei wurde sowohl eine Nucleosil 100 C18-Säule (150x10mm) (Pharmacia, Freiburg) für die präparative als auch eine C18-Säule (Pharmacia, Freiburg) für die analytische Aufreinigung verwendet. Die Auftrennung erfolgte über einen Gradienten aus Puffer A (0,055% TFA-H₂O) und Puffer B (0,045%TFA, 80% ACN, 20% H₂O). Die Detektion der Peptide erfolgte bei 214nm. Um das Acetonitril und TFA in den gesammelten Fraktionen zu entfernen, wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert. Anschließend wurden die Fraktionen gewogen und die Reinheit mittels ESI überprüft.

Für präparative und analytische Aufreinigung:

- Säule: Nucleosil 100 C18 (150x10mm) (präparativ)
Nucleosil 100 C18 (10x10mm) (analytisch)
- Pufferbedingungen: Puffer A: 0,055% TFA-H₂O
Puffer B: 0,045%TFA, 80% ACN, 20% H₂O
- Flussrate: 2,5ml/min (präparativ)
1ml/min (analytisch)

▪ Gradient:	Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
	0	95	5
	45	20	80

2.2.2.2. Größenausschlußchromatographie

Zur Charakterisierung des Molekulargewichtes der aggregierten DCD-Peptide wurden diese durch Größenausschluß-Chromatographie unter Verwendung einer Superdex-75 (HR10/30)-Säule (Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) aufgetrennt. Die Säule wurde zunächst durch die Verwendung folgender Eichsubstanzen (Sigma Aldrich, Konzentration jeweils 500µg/ml, Gesamtauftragsvolumen 25µl) mit bekannten Molekulargewichten (**Tab. 8**) in einem Bereich von ca. 1-30 kDa mit einer Flussrate von 0,8ml/min kalibriert, wobei 100mM NAPB (pH 7,0) als Laufpuffer diente.

Tabelle 8: Eichsubstanzen für Größenausschlußchromatographie (FPLC)

Substanz	Myoglobin	Aprotonin	Eich-Peptid	Vitamin B12
Molekulargewicht [kDa]	17	6,5	3,6	1,35

Die Detektion der Proteine erfolgte bei einer Wellenlänge von 214nm. Die Peptide wurden unter identischen Bedingungen chromatographiert. Nach Bestimmung der Retentionszeit der Eich-Substanzen wurde zur Bestimmung der Regressionsgerade in einem Diagramm der Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichtes gegen die Retentionszeit [min] aufgetragen. Weiterhin diente die FPLC zur methodischen Überprüfung des enzymatischen Proteinase K Verdaus der aggregierten Peptide aus den Aggregationsuntersuchungen (siehe 2.2.4.2). Die Auftrennung über die Superdex 75 (HR10/30) Säule erfolgte auch in 100mM NAPB (pH.7,4) mit einer Flussrate von 0,8ml/min. Die Detektion der Peptide wurde bei einer Wellenlänge von 214nm und die des Fluorophors (FITC) bei 540nm (Anregung: 490nm) durchgeführt.

2.2.2.3. Massenspektrometrie

Die Elektrospray-massenspektrometrischen MS (ESI-MS)-Analysen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Martin Deeg (ZMF, Tübingen) am TSQ 700 Triple Quadrupol MS durchgeführt. Sie dienen der Identifizierung von Peptiden aus nativem Schweiß und zur Qualitätskontrolle der über RP-HPLC aufgereinigten synthetischen Peptide. Dazu wurden 20µl Probenvolumen direkt in die Elektrospray-Quelle mit einer Flußrate von 4µl/min injiziert. Als Lösungsmittel diente ein Acetonitril-Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1 (v/v).

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem REFLEX Spektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) aufgenommen. Die Massenspektrometrische Analyse wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Stefan Stefanovic (Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Tübingen) durchgeführt.

2.2.3. Antimikrobieller Test

Um die antimikrobielle Aktivität der Peptide zu bestimmen, wurde ein antimikrobieller Flüssigkultur-Test, modifiziert nach Ganz *et al.* (1985), verwendet. 100µl einer Bakterien-Übernacht-Kultur wurden in 10ml LB-Medium (siehe 2.1.7.2) überimpft und für ca. 2h bei 37°C unter Schütteln (220Upm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,8 inkubiert. Die Bakterien wurden dann 5min bei 1000×g abzentrifugiert, mit 10mM NAPB/10mM NaCl (pH 7,0) (siehe 2.1.5) zweimal gewaschen und durch Bestimmung der OD₆₀₀ in dem gleichen Puffer photometrisch (SmartSpec™ Plus, BioRad) quantifiziert. Es wurde eine Bakteriensuspension von 1×10⁶ CFU/ml mit den in **Tab. 7** aufgeführten Faktoren [CFU/ml] in dem dreifach-konzentrierten NAPB (30mM NaP/30mM NaCl, pH 7,0) (siehe 2.1.5) eingestellt.

In einer 96-Loch-Platte wurden 20µl der zu testenden Peptide in sechs verschiedenen Konzentrationen (200/100/50/10/1/0,1µg/ml) in Milli-Q-Wasser vorgelegt. Durch die Zugabe von 10µl (1×10⁴ CFU) eingestellter Bakteriensuspension wurde in einem Endvolumen von 30µl eine Pufferkonzentration von 10mM NAPB/10mM NaCl (pH 7,0) eingestellt. Diese Ansätze wurden in der 96-Loch-Platte (Cellstar, Greiner bio-one) für 2,5-3h bei 37°C und 220Upm in einer Box, welche gegen den Flüssigkeitsverlust ein wassergetränktes Papiertuch beinhaltete, inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 5µl der Ansätze 1:100 in 10mM NAPB/10mM NaCl (pH 7,0) verdünnt und dreifach je 100µl auf Blut-Agarplatten ausplattiert. Nach 24-36h Inkubation bei 37°C wurden die Kolonien ausgezählt. Als Wachstumskontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Peptid sowohl direkt vor der Inkubation als auch nach 3h ausplattiert. Weiterhin wurde ein Negativ-Kontroll-Peptid DPI mitgeführt (siehe 2.1.2), welches keine antimikrobielle Aktivität aufweist. Die CFU der mit Peptid behandelten Mikroorganismen wurde in Bezug zu derjenigen CFU ohne Peptid gesetzt und im Diagramm der prozentuale Zelltod gegen die Zeit [min] mit Standardabweichung aufgetragen.

$$\text{Zelltod [\%]} = 100 - \left(\frac{\text{CFU (Puffer-Kontrolle)}}{\text{CFU (Peptid)}} \times 100 \right)$$

Weiterhin wurde die inhibitorische Konzentration (IC₉₀) bestimmt. Diese stellt ein Maß für die antimikrobielle Aktivität einer Substanz dar und wird definiert als die Konzentration

($\mu\text{g/ml}$ bzw. μM) eines Hemmstoffs, die benötigt wird, um 90% der Mikroorganismen abzutöten.

2.2.4. Spektroskopische Methoden

2.2.4.1. Feinstrukturanalyse durch (CD)-Spektroskopie

Bei der CD-Spektroskopie handelt es sich um eine Absorptions-Spektroskopie im UV/VIS-Bereich, welche im Falle von Peptiden zur Konfigurations- und Konformationsanalyse sowie zu intermolekularen Wechselwirkungen herangezogen wird. Die optisch aktiven Substanzen gehen dabei unterschiedliche Wechselwirkungen mit links und rechts zirkular polarisiertem Licht ein. Diesen Effekt wird Circular dichroismus genant. CD-Effekte lassen sich in Abhängigkeit von der Wellenlänge messen und spektroskopisch auswerten.

Die Spektren wurden mit einem Intervall und einer spektralen Bandweite von 1nm, einer *Response* von 1 Sek., einer Geschwindigkeit von 50nm/min mit einer Sensitivität von 50mdeg und mit drei bis vier Wiederholungen gemessen. Es wurde für alle Ansätze eine Peptidkonzentration von 50 μM eingesetzt. Die Spektren der synthetischen Peptide wurden in H_2O , in 20-60% (v/v) wässriger TFE-Lösung (2,2,2-Trifluoroethanol) und in 10mM NAPB (pH 7,0) mit steigenden NaCl Konzentrationen (10, 100, 150mM) aufgezeichnet. Weiterhin wurden Strukturveränderungen der Peptide durch intermolekulare Wechselwirkungen mit Lipidmembranen untersucht. Dazu wurden artifizielle unilamellare Liposomen (DOPC, DOPG) (siehe 2.1.1) mit unterschiedlicher Nettoladung in 10mM NAPB (pH 7,0) dosisabhängig eingesetzt und die CD-Messungen über einen Zeitraum von bis zu 2h verfolgt. Die aufgenommenen CD-Spektren wurden schließlich um die Basislinie (*Baseline*) korrigiert und anschließend geglättet. Für die Auswertung der CD-Spektren wurden Vergleichsspektren von Proteinen mit aufgeklärter Struktur verwendet. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Jasco-Sekundäre-Struktur-Software (Jasco J-720, Japan).

2.2.4.2. Aggregationsanalyse über Fluoreszenzlöschung (*Quenching*)

Die Aggregationsanalyse, wie von Ziv Oren (1999) beschrieben, diente zum Nachweis einer konzentrations- und zeitabhängigen Aggregation der synthetischen Peptide DCD-1L (anionisch), SSL-23 (kationisch) und LL-37 (Cathelicidin) in Lösung. Dazu wurden die Peptide am N-Terminus an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt (siehe 2.2.1.2), um über die extrinsische Fluoreszenzlöschung (*Quenching*) den Nachweis für eine Peptidaggregation zu erbringen. Als extrinsische Fluoreszenz bezeichnet man den Fall, wenn zusätzliche Fluorophore an ein Peptid gekoppelt werden müssen, um die Fluoreszenz-

untersuchungen durchführen zu können. Das Prinzip der Aggregationsanalyse wird in **Abb. 7** dargestellt. Es wurde bei dieser Untersuchung angenommen, dass die FITC-markierten Peptide abhängig von Zeit, Temperatur und Konzentration zu Multimeren aggregieren. Diese Aggregation führt zu einer Fluoreszenzlöschung, die darauf beruht, dass Energie von einem angeregtem Molekül auf ein zweites Molekül übertragen wird, so dass die Wahrscheinlichkeit der Emission sinkt und der angeregte Zustand strahlungslos desaktiviert wird. Je mehr fluoreszente Gruppen dicht nebeneinander liegen desto mehr verringern sie gegenseitig ihre Fluoreszenz und damit die zu messende Emission.

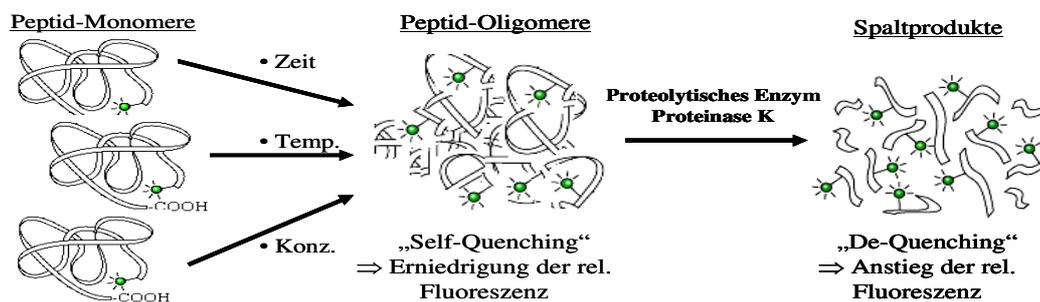


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Messprinzips der Aggregationsanalyse von FITC markierten Peptiden

Durch Zugabe von Proteinase K (Promega Cooperation, USA), welche die Peptidaggregate proteolytisch verdaut, wurden die Fluoreszenzfarbstoffe freigesetzt und damit die Fluoreszenz erhöht (*De-Quenching*). Der gemessene End-Wert des „*De-Quenching*“ Vorgangs repräsentiert den Zustand der 100%ig freiliegenden FITC-Moleküle. Je größer die Erhöhung der Fluoreszenzintensität war, desto größer das Ausmaß der vorherigen Aggregation. Die Messungen wurden in einer 96-Loch-Platte (Microwell Platte, weiß, Nunc, Wiesbaden) in einem Fluorometer (Tecan SPECTRAFluor, Crailsheim) mit einer Anregung von 485nm und einer Emission von 535nm in dreifacher Ausführung durchgeführt.

Die FITC-markierten Peptide wurden zunächst aus aliquotierten Stocklösungen (10µM) (siehe 2.1.2) aufgetaut und in 1xPBS (pH 7,4) eine Konzentrationsreihe (0,5/0,375/ 0,25/ 0,125/0,625µM) in einem Endvolumen von je 100µl erstellt. Die Messungen wurden direkt nach Auftrag der Lösungen in die 96-Loch-Platte bei Raumtemperatur gemessen. Anschließend wurde die Platte bis zu 3h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und alle 60min gemessen. In dieser Zeit sollte die Aggregation der Peptide stattfinden. Nach Zugabe von Proteinase K in einer Endkonzentration von 50µg/ml wurde über einen Zeitraum von drei Stunden die Änderung der Fluoreszenz im Zeitintervall von 5min verfolgt. Um das Ausmaß

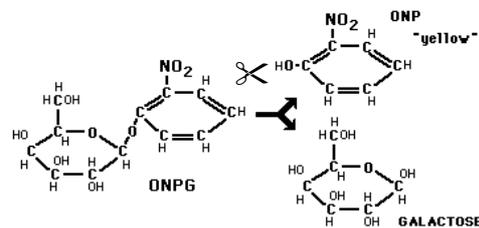
der Aggregation zu bestimmen, wurde jeweils der Fluoreszenz-Endwert der freiliegenden FITC-Moleküle nach Proteinase K Verdau zu den Anfangswerten prozentual in Beziehung gesetzt. Der Endwert nach Proteinase K Verdau wurde dazu auf hundert Prozent gesetzt.

2.2.4.3. Membran-Permeabilisierungs-Untersuchungen

2.2.4.3.1. Permeabilisierung der inneren Membran von *E. coli*

Zur Untersuchung der Permeabilisierung der inneren Membran von *E. coli* ML-35p wurde, wie von Lehrer (Lehrer, R. I. et al. 1988) beschrieben, das Substrat σ -nitrophenyl-3-D-galaktosid (ONPG, Sigma-Aldrich, Deutschland) verwendet. Ausschließlich der Bakterienstamm *E. coli* ML-35p (Gram-negativ) wurde für diesen Test verwendet, da dieser β -Galaktosidase im Zytoplasma exprimiert. Zerstört ein antimikrobielles Peptid die äußere und auch innere Membran (IM) des Bakteriums, wird das künstlich zugegebene Substrat ONPG von der zytoplasmatischen β -Galaktosidase enzymatisch zu einem gelben Farbstoff ONP umgesetzt, welcher im Photometer bei einer Wellenlänge von 420nm gemessen werden kann (Abb. 8).

Abbildung 8: Enzymatische Spaltung \times des ONPG-Substrates durch die β -Galaktosidase in Galaktose und ONP, welches photometrisch bei 420nm gemessen wurde



Für die Untersuchungen wurde *E. coli* ML-35p in der stationären Wachstumsphase verwendet. Dazu wurden die Bakterien für 18h bei 37°C und 220Upm inkubiert, anschließend dreimal mit 10mM NAPB (pH 7,0) gewaschen (5min bei 1000xg) und auf 1×10^8 CFU/ml photometrisch eingestellt. Dabei entsprach eine Absorption von 0,35 bei einer Wellenlänge von 620nm einer Keimzahl von 1×10^8 CFU. Pro Ansatz wurden 100 μ l der eingestellten Bakteriensuspension (1×10^8 CFU/ml), 70 μ l NAPB pH 7,0 (20mM), 30 μ l des Substrates ONPG (30mM) in NAPB pH 7,0 (20mM) und 100 μ l des zu testenden Peptids in Milli-Q-Wasser gegeben. Daraus ergibt sich ein Gesamtvolumen von 300 μ l mit einer Puffer-Endkonzentration von 10mM NaP (pH 7,0) und einer ONPG-Enkonzentration von 3mM. Die enzymatische Umsetzung von ONPG zu σ -nitrophenol (ONP) wurde über die Zeit photometrisch bei der Wellenlänge 420nm verfolgt. Als Puffer-Kontrolle wurde der beschriebene Ansatz ohne Peptid verwendet.

2.2.4.3.2. Permeabilisierung der äußeren Membran von *E. coli*

Zur Untersuchung der Permeabilisierung der äußeren Membran wurde, wie von Helander und Mattila-Sandholm (Helander, I. M. und Mattila-Sandholm, T. 2000) beschrieben, das künstliche Reagenz 1-N-phenyl-naphtylamine (NPN, Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet. Dieses hydrophobe Fluorophor fluoresziert stärker in der Umgebung von Glycerophospholipiden als in wässriger Umgebung. Zerstört ein Peptid die äußere Membran des Gram-negativen *E. coli* ML-35p-Stammes, so kann sich das hydrophobe Molekül NPN in die intrazellulär gerichtete Phospholipidschicht einlagern. Normalerweise werden diese hydrophoben Substanzen von intakten Membranen ausgeschlossen. Somit korreliert eine starke Zunahme der Fluoreszenz mit der Fähigkeit des eingesetzten Peptids, die äußere Membran (OM) zu permeabilisieren. Als Kontrollen wurden Gentamycin (20µg/ml) und der Chelatbildner EDTA (1mM) verwendet. NPN wurde als 0,5mM Stocklösung in Aceton gelöst und für die Messungen in 5mM HEPES (*N*-2-Hydroxyethyl)-piperazin-*N'*-2-ethansulfonsäure) Puffer (pH 7,2) auf eine Endkonzentration von 10µM verdünnt.

E. coli ML-35p Zellen wurden bis zur logarithmischen Phase in LB-Medium bei 37°C und 220Upm inkubiert und zweimal in 5mM HEPES-Puffer (pH 7,2) gewaschen (5min bei 1000xg). Die Bakterien wurden in demselben Puffer aufgenommen und bei 600nm auf eine Absorption von 0,5 eingestellt. 50µl der eingestellten Bakteriensuspension wurden mitsamt 23µl 5mM HEPES-Puffer, 2µl NPN (0,5mM) und 25µl des zu testenden Agens in Milli-Q H₂O in eine 96-Loch-Platte (Cellstar, Greiner bio-one) gegeben und in einem Fluorometer (Tecan SPECTRAFluor, Crailsheim) bei einer Anregung von 350nm und einer Emission von 460nm über einen Zeitraum von 2h gemessen. Die Messung wurde mit der Zugabe der Bakteriensuspension gestartet.

2.2.4.3.3. Carboxyfluorescein-Efflux-Experiment mit Liposomen

Um die Fähigkeit von AMPs zu untersuchen, Phospholipidmembranen zu permeabilisieren, wurden Carboxyfluorescein (CF)-Efflux-Experimente durchgeführt, wie von Sahl (Sahl, H. G. et al. 1987) beschrieben.

Dazu wurden artifizielle Liposomen in Gegenwart von dem Fluorophor Carboxyfluorescein (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit Hilfe der Extrusion-Technik (Hope, M. J. et al. 1989) hergestellt (**Abb. 9**). Bei diesem Vorgang wird das Carboxyfluorescein (CF) in den Liposomen, die aus einer Phospholipiddoppelschicht bestehen, eingeschlossen. Die innerhalb der Liposomen eingeschlossenen CF-Moleküle senden keine Fluoreszenzstrahlung aus, da durch die enge räumliche Nähe der Moleküle zueinander der Effekt der Fluoreszenzlöschung

(*Quenching*) eintritt. Das Austreten der CF-Moleküle aus den Liposomen durch membranschädigende Peptide kann durch den Anstieg der Fluoreszenzintensität verfolgt werden. Die Fluoreszenzstrahlung des Carboxyfluoresceins wird bei einer Wellenlänge von 515nm (Anregung: 492nm) gemessen.

Für die Herstellung der Liposomen wurden die Lipide 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) und 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DOPG) (siehe 2.1.1) verwendet, welche jeweils eine Kettenlänge von C18 haben. Die Lipide wurden in Chloroform bzw. Methanol gelöst [50mg/ml] und sollten zum Schutz vor Oxidation der Doppelbindungen unter N₂ bei -20°C gelagert werden.

Für die Untersuchungen wurden folgende Liposomen-Zusammensetzungen gewählt, die unterschiedliche Ladungen besitzen: DOPC (neutrale Nettoladung) und DOPC:DOPG (1:1 molares Verhältnis) (50% negativ geladene Phospholipide). Das entsprechende Volumen der Lipide (2µmol/Ansatz) wurde in ca. 100µl Chloroform in ein phosphatfreies Glasröhrchen pipettiert und das Lösungsmittel durch Vakuum verdampft. Auf den trockenen Lipid-Film wurden 300µl CF-Lösung pipettiert (50 mM CF in Puffer K⁺). Die Suspension wurde unter leichtem Schwenken im Wasserbad auf maximal 30°C erwärmt und dann in flüssigem Stickstoff gefroren und wieder aufgetaut. Dieser Zyklus wurde 8-10 mal wiederholt. Durch diese „freeze-thaw-Methode“ entstanden multilamellare Vesikel, die 8-10 mal durch zwei Polycarbonatfilter (Millipore, 400nm Porengröße) gepresst wurden, so dass unilamellare Vesikel entstanden. Die CF-haltigen Vesikel wurden durch Gelfiltration von der umgebenden CF-Lösung abgetrennt. Dazu wurde mit dem Gelfiltrationsmaterial (Sephadex G-50) in Puffer K⁺ eine Säule in einer 2ml Plastikspritze gegossen und kurz zentrifugiert. Die Vesikelsuspension wurde auf die Säule pipettiert und wieder zentrifugiert (500xg, 3min), wobei die austretenden Vesikel aufgefangen wurden (ca. 250µl). Die Lipid-Konzentration wurde anschließend über den Phosphatgehalt bestimmt.

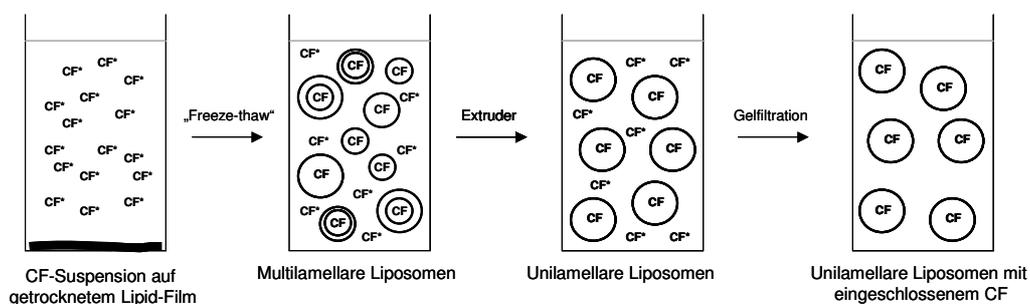


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Herstellung von unilamellaren Liposomen mit eingeschlossenem Carboxyfluorescein (CF)

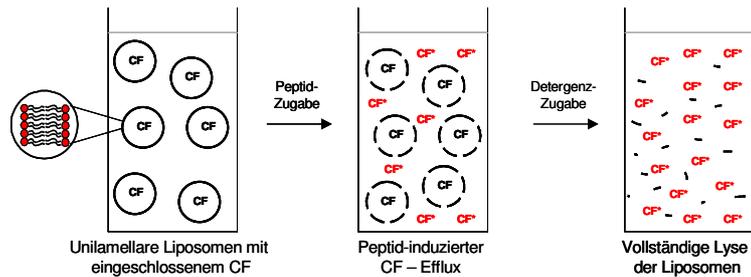
Biochemische Bestimmung der Lipidkonzentration über den Phosphatgehalt:

Die Lipidkonzentrationen der CF-beladenen Liposomen wurden nach Hydrolyse der Phospholipide über den Phosphatgehalt bestimmt. Das Testprinzip sieht folgendermaßen aus: Das Phosphat-Ion (PO_4^{3-}) bildet unter sauren Bedingungen mit Molybdat (MoO_4^{2-}) gelb-orange gefärbte Phosphormolybdänsäure ($\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_4)$). Mit Hilfe eines schwachen Reduktionsmittels wird diese Verbindung zu Phosphomolybdänblau reduziert, während freies Molybdän nicht reduziert wird. Der Phosphor-Molybdän-Farbkomplex zeigt im Wellenbereich von 700 bis 900nm starke Absorption. Es gilt das Lambert-Beersche Gesetz, d.h. die Lichtabsorption ist proportional zur Phosphatkonzentration der Lösung. Das hier verwendete Verfahren entspricht der von Rouser (Rouser, G. et al. 1970) beschriebenen Methode.

Für den Test wurden phosphatfreie Glasröhrchen verwendet, welche zuvor mit Chloroform gewaschen und getrocknet worden sind. Die Kalibrierung wurde durch eine Standardreihe von 0-60nmol P_i doppelt angesetzt (Stammlösung: 1mM KH_2PO_4 Lösung [3,4mg/25ml = 1nmol $\text{P}_i/\mu\text{l}$]). Die Standardreihe und die Proben (10 μl der Liposomensuspensionen) wurden in Glasröhrchen pipettiert und auf ein Endvolumen von 100 μl mit MilliQ- H_2O gebracht. Die Lösungen werden im Ofen bei 140°C für ca. 20min getrocknet. 0,3ml der 70%igen Perchlorsäure wurden in jedes Röhrchen gegeben und diese mit Glas-Murmeln verschlossen. Die Hydrolyse der Lipide erfolgt für 90min in einem Heizblock bei 180°C. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und 1ml MilliQ-Wasser, 0,4ml 1,25% Ammoniummolybdat und 0,4ml 5% Ascorbinsäure zugegeben. Die Proben wurden gevortext und 5min im Wasserbad gekocht. Nach Abkühlung der Proben wurden diese bei 797nm im Photometer gegen den Leerwert gemessen.

Für die CF-Efflux-Experimente (**Abb. 10**) wurden die großen unilamellaren Liposomen in eine Küvette mit 1,25 ml Puffer K^+ in einer Endkonzentration von 25 μM Phospholipid (25nmol P_i/ml) pipettiert. Das jeweils benötigte Volumen der Liposomen-Suspension wurde anhand der Ergebnisse des Phosphat-Tests berechnet. Unter Rühren wurden die verschiedenen Peptide in Konzentrationen von 1-10 μM zugegeben und der induzierte Efflux des Markers über 5min aufgezeichnet. Der Anstieg der Fluoreszenz Intensität wurde bei einer Wellenlänge von 515nm (Anregungswellenlänge: 492nm) mit einem Spektrofluorophotometer RF-5301 PC (Shimadzu, Japan) bei RT gemessen. Der Peptid induzierte CF-Efflux wurde relativ zu dem absoluten CF-Efflux nach Lyse der Vesikel durch Zugabe von 20 μl Detergenzlösung (20% Triton X-100) angegeben.

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Carboxyfluorescein – Efflux - Experimente mit unilamellaren Liposomen



2.2.4.3.4. Permeabilisierung der Zellmembran von Erythrozyten

Der hämolytische Test diente zur Analyse der permeabilisierenden Wirkung von Peptiden auf Erythrozyten. Für die Durchführung wurden frische Erythrozyten über einen Ficoll-Gradienten (siehe 2.2.6.5) isoliert. Die Erythrozyten wurden 4x mit 6ml 1xPBS (pH 7,4) bei 900xg gewaschen und mit Hilfe der Neubauerzählkammer auf 1×10^9 Zellen/ml in 1xPBS eingestellt. Die zu testenden Peptide wurden in verschiedenen Konzentrationen [0,1/1/10/10/200µg/ml] in 1,5ml Eppendorf-Tubes vorgelegt. Das Gesamtvolumen betrug 200µl, wobei 100µl 2xPBS und die restlichen 100µl die vorgelegten Peptide in Milli Q-Wasser waren. Von den eingestellten Erythrozyten wurden 50µl zu den Peptiden hinzugegeben und 1h unter leichtem Schwenken (100Upm) bei 37°C inkubiert. Die Erythrozyten wurden auf Eis gestellt und bei 4°C mit 900xg 6min zentrifugiert. Der Überstand (200µl) wurde mit 1xPBS 1:2 verdünnt und im Photometer in einer Plastikkuvette bei 541nm gemessen. Als Negativ-Kontrolle wurde 1xPBS Puffer ohne Peptid und als Positiv-Kontrolle Wasser verwendet. Der Wert der totalen Hämolyse mit Wasser wurde als 100 Prozent-Wert gesetzt und gegen die Werte der Peptide verrechnet.

$$\text{Hämolyse [\%]} = \left[\frac{\text{Extinktionswert (Peptid)} - \text{Extinktionswert (Negativ-Kontrolle)}}{\text{Extinktionswert (dH}_2\text{O)} - \text{Extinktionswert (Negativ-Kontrolle)}} \right] \times 100$$

2.2.5. Mikroskopische Methoden

2.2.5.1. Transmissionselektronen- und Immun-Elektronen-Mikroskopie

S. aureus-Zellen (ATCC 25923) wurden in der logarithmischen Wachstumsphase zweimal in 10mM NAPB (pH 7,4) gewaschen und 1×10^8 Zellen (siehe 2.2.3) mit 100µg/ml DCD-1L oder SSL-23 über 4h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Immun-elektronenmikroskopie (IEM) für 4h in PLP fixiert und das Pellet nach 5min Zentrifugation bei 1000xg in 3,5%iger Sepharose eingebettet und auf Eis gekühlt. Der Sepharoseblock wurde in Lowicryl (Polysciences, Eppelheim, Deutschland) eingebettet und anschließend in

ultradünne (50nm) Schnitte, welche über Formvar-gekoppelte Nickel-Gitter hergestellt wurden, geschnitten. Diese wurden mit dem polyklonalen DCD-Antikörper (siehe 2.1.3) gefolgt von 10nm großen Gold gekoppelten IgG-Antikörper (Auroprobe EM, Amersham, Freiburg, Deutschland) inkubiert. Als Kontrolle wurde der primäre Antikörper (anti-DCD-1L) weggelassen. Die Proben wurden mit Hilfe eines Zeiss 109 Transelektronen-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden die Bakterien-Pellets in Karnovskys-Lösung für 24h fixiert, in 1% Osmiumtetroxide nachfixiert und in Epon eingebettet.

2.2.5.2. Konfokale Lasermikroskopie

E. coli Zellen wurden in der mittleren log-Phase in 10mM NAPB (pH 7,0) gewaschen und auf eine Zellzahl von 5×10^7 /ml in NAPB photometrisch eingestellt. Das FITC-markierte DCD-1L und das SSL-23 (siehe 2.1.2) wurden in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ bzw. $2 \mu\text{M}$ für 2h bei 37°C mit den *E. coli* Zellen inkubiert und anschließend die Zellen auf Objektträger fixiert. Dazu wurde der Objektträger mit einem speziellen Filter (Schleicher und Schuell, Dassel), welcher zwei runde Aussparungen enthielt, in einen Trichtereinsatz eingespannt. In den Trichter wurde ein 1,5ml Reaktionsgefäß gestellt, in das die Zellen pipettiert wurden und an dessen Ende sich ein Loch befand. Anschließend wurde die komplette Apparatur in die Varifuge 1.0R (Heraeus, Hanau) eingesetzt und für 5min bei 1200Upm zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe des konfokalen Laserskanmikroskops (Leica TCS SP, Leica Microsystems, Bensheim) mit einem 40er Objektiv analysiert und digitalisiert.

2.2.6. Zellbiologische Methoden

2.2.6.1. Herstellung von Zellpellets

Nach dem Trypsinieren und Zentrifugieren der Schweißdrüsen-Zellen NCL-SG3 (siehe 2.1.7.3) wurde das Zellpellet mit 5ml PBS-DULBECCO (Biochrom, Berlin) gewaschen und die Zellen nochmals für 5min bei 1200Upm (Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1ml PBS-DULBECCO aufgenommen, in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und für 4min bei 4000Upm (Biofuge 13, Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert

2.2.6.2. Herstellung von Zelllysaten

Aus Zellpellets (siehe 2.2.6.1) wurde eine Proteinextraktionslösung hergestellt. Die Zellpellets wurden in insgesamt $60 \mu\text{l}$ Lysepuffer (siehe 2.1.5) resuspendiert, 30min bei 4°C auf

einen „Roller“ (RM5, Assistent) gelegt und anschließend für 20min bei 12000U_{pm} und 4°C (Biofuge 13, Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellysate wurden bei -20°C gelagert oder direkt für die Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt (siehe 2.2.1.4).

2.2.6.3. Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die FACS-Analyse (*fluorescence activated cell scanner*) ist eine Methode, um Zellpopulationen zu identifizieren und zu charakterisieren. Ermöglicht wird die Messung durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper, die spezifisch an die zu untersuchenden Antigene binden. Aus der Intensität der Fluoreszenz können Rückschlüsse auf die Menge des gebundenen Antikörpers und somit auf die Expression des spezifischen Antigens gezogen werden. Die Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit (FACS-Flow, BD Bioscience, Heidelberg) einzeln an einem im rechten Winkel angeordneten Laserstrahl „vorbeigeleitet“. Die Vorwärtslichtstreuung (*forward scatter*, FSC) korreliert mit der Größe der Zellen, während die Seitwärtslichtstreuung (*side scatter*, SSC) ein relatives Maß für die Granularität der Zellen darstellt. Die Messung wird in Zytogrammen, z.B. als Dot Blot mit den Parametern der Zellgröße und Granularität der Zellen oder als Histogramm mit der Zellzahl über der Fluoreszenzintensität angegeben. Bei dem DCD-Nachweis der Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3 (siehe 2.1.7.3) wurde eine intrazelluläre Färbung durchgeführt.

Pro Färbung wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt. Diese wurden in ein FACS-Röhrchen (BD Biosciences (Heidelberg) überführt und 3min bei 1000U_{pm} (Varifuge 3.OR, Heraeus, Hanau) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1ml 1xPBS/1% BSA gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5min bei 1000U_{pm} wurden die Zellen für 30min in 1ml 3% Formalin/PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut in 1ml 1xPBS/1% BSA gewaschen und wieder für 5min bei 1000U_{pm} zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen zweimal wie oben beschrieben in 1xPBS/1% BSA gewaschen. Der jeweilige Primärantikörper (nicht-immunaffinitätsaufgereinigter DCD Antikörper oder anti-DCD-1L, siehe 2.1.3) wurde 30min mit einer 1:500 Verdünnung in 1xPBS/1% BSA auf Eis inkubiert. Nach zwei weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritten wurde der Überstand entfernt und der Sekundärantikörper (EAK-Cy3, siehe 2.1.3) in 50µl 1xPBS/1% BSA hinzugegeben und für 15min unter Lichtausschluss inkubiert. Nach der Färbung wurden die Zellen nochmals mit 1xPBS/1% BSA gewaschen, zentrifugiert und die Zellen in 0,5ml 1xPBS aufgenommen. Im Anschluss erfolgte direkt die Analyse der Zellen mit Hilfe der CellQuest Pro 4.0 Software im FACSCalibur Gerät (BD Biosciences, Heidelberg).

2.2.6.4. Immunfluoreszenz an der Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3

Für die immunhistologische Färbung wurden 1×10^6 NCL-SG3 Zellen pro Ansatz eingesetzt. Der Objektträger wurde mit einem speziellen Filter (Schleicher und Schuell, Dassel), welcher zwei runde Aussparungen enthielt, in einen Trichtereinsatz eingespannt. In den Trichter wurde ein 1,5ml Reaktionsgefäß gestellt, in das die Zellen pipettiert wurden und an dessen Ende sich ein Loch befand. Anschließend wurde die komplette Apparatur in die Varifuge 1.0R (Heraeus, Hanau) eingesetzt und für 5min bei 1200Upm zentrifugiert. Die Zellen wurden mit einem Fettstift umrahmt, für ca. 5min an der Luft getrocknet und für 20min in 4% Formalin/PBS fixiert. Die Zellen wurden dann 2x mit 1xPBS für 5min gewaschen und mit 1:20 in PBS verdünntem Eselserum (Sigma, München) versetzt. Der nicht-immunaffinitätsaufgereinigte DCD-Antikörper und der immunaffinitätsaufgereinigte DCD-Antikörper (anti-DCD-1L, siehe 2.1.3) wurden jeweils in einer 1:50-Verdünnung eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem 1:500-verdünnten Esel Anti-Kaninchen Cy3-markierten Antikörper (EAK-Cy3, siehe 2.1.3). Abschließend wurden die Zellkerne für 10min mit dem Kernfarbstoff YOPRO (1mM Lösung in DMSO, Molecular Probes Leiden, Niederlande) in einer 1:10000-Verdünnung angefärbt. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe des konfokalen Laserskanmikroskops (Leica TCS SP, Leica Microsystems, Bensheim) analysiert und digitalisiert.

2.2.6.5. *In situ*-Immunlokalisation

Für die Expressionsanalyse von DCD wurden Paraffinschnitte von gesunder menschlicher Haut und von Mäusefüßen angefertigt. Zur Entparaffinierung bzw. Rehydrierung wurden die Paraffinschnitte für mind. 20min mit Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe inkubiert. Danach wurden die Schnitte in 1xPBS gewaschen und mit normalen Pferde-Serum für 45min bei RT blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem immunaffinitätsaufgereinigten polyklonalen Primärantikörper gegen DCD (anti-DCD-1L) in einer 1:5000 Verdünnung in 1xPBS für 1h. Zum Entfernen der nicht gebundenen Primärantikörper wurden die Schnitte dreimal 10min in 1xPBS gewaschen. Zur indirekten Detektion der Bindungsstellen des primären Antikörpers wurde ein sekundärer biotinylierter Antikörper (KAZ; **Tab. 5**) verwendet. Dieser wurde über Streptavidin, welches an die Alkalische Phosphatase (AP) gebunden war, erkannt. Die Visualisierung erfolgte schließlich über das farblose Substrat Neu-Fuchsin, welches von der Alkalischen Phosphatase zu einem roten Farbstoff enzymatisch umgesetzt wurde.

Danach wurden die Zellkerne für 4min mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gegengefärbt. Nach einem letzten Waschschrift für 10min in Wasser wurden die Schnitte zur Konservierung in

Mowiol (Calbiochem) eingedeckt. Als Negativ-Kontrolle für die Detektion wurde nur der Sekundärantikörper verwendet. Die immunhistochemische Auswertung wurde durch den Vergleich unspezifischer Färbeintensitäten durch den Sekundärantikörper mit den Färbeintensitäten der zu untersuchenden Proben durchgeführt.

2.2.6.6. Isolierung von Erythrocyten

Zur Überprüfung der Zerstörung der Zellmembran von Erythrozyten (Hämolyse, siehe 2.2.4.3.4) durch antimikrobielle Peptide wurde frisches mit EDTA behandeltes Blut über einen Ficoll-Gradienten aufgetrennt und die Erythrocyten isoliert. Dazu wurden 2,5ml Blut mit 1xPBS 1:2 verdünnt und auf 8ml Ficoll (Sigma, Steinheim) in einem 15ml Reaktionsgefäß versetzt. Der Ansatz wurde 15min mit 1400Upm bei 20°C ohne Zentrifugenbremse zentrifugiert. Die untere Schicht wurde mit einer Pipette abgesogen und für den Test auf Hämolyse verwendet.

2.2.7. Molekularbiologische Methoden

2.2.7.1. Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.7.1.1. Isolierung von RNA

Beim Umgang mit RNA wurde zur Vermeidung von Kontaminationen durch ubiquitär vorkommende RNasen Handschuhe getragen und sterile gestopfte Pipettenspitzen sowie RNasefreie Lösungen benutzt. Alle verwendeten Lösungen wurden mit 0,1% (v/v) DEPC behandeltem H₂O (siehe 2.1.5) angesetzt und anschließend autoklaviert. Materialien, die nicht autoklaviert werden können, wurden vor Gebrauch mit 0,1% (v/v) SDS in DEPC-H₂O behandelt.

Bei der Isolierung von RNA aus humanem Gewebe oder aus Mäusen wurden Organstücke zunächst in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zerkleinert und nach Zugabe von 800µl RNA-Clean (AGS, Heidelberg) durch Vortexen vollständig homogenisiert. Für die Isolierung der RNA aus Zellpellets der Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3 wurden direkt 800µl RNA-Clean (AGS, Heidelberg) auf Eis zugegeben und durch Vortexen vollständig homogenisiert. RNA-Clean enthält Guanidinium-Thiocyanat, welches die Zellwände lysiert und freiwerdende RNAsen hemmt. Weitere 1ml RNA-Clean und 180µl Chloroform wurden hinzugefügt und gevortext. Nach einer Inkubation von 5min auf Eis wurde das Gemisch für 15min bei 13000Upm und 4°C (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1

Vol. Chloroform gevortext, um Phenolreste zu lösen. Anschließend wurde für 5min bei 13000Upm und 4°C zentrifugiert und die obere Phase erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Präzipitation der RNA wurde 1 Vol. Isopropanol zugegeben, gevortext und das Gemisch für mindestens 15min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 15min bei 13000Upm und 4°C wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen und für 5min bei 13000Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang wiederholt. Das Pellet, welches die extrahierte RNA enthält, wurde für wenige Minuten im Heizblock (Techne, New Jersey, USA) bei 37°C getrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde die RNA in 20-50µl TE-Puffer (siehe 2.1.5) gelöst und bei -80°C aufbewahrt. Alternativ wurde die in TE-Puffer aufgenommene RNA für 30min auf Eis gestellt, um direkt im Anschluss die photometrische Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.7.1.4) durchzuführen.

2.2.7.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmidisolierung für präparative Zwecke

Um eine große Menge an Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde eine präparative Plasmidisolierung durchgeführt. Eine 200ml Übernachtskultur in LB-Medium wurde am nächsten Tag für 5min bei 6000Upm und 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4,5ml Lösung I (siehe 2.1.5) resuspendiert. Anschließend wurden 10ml Lösung II (siehe 2.1.5) zugesetzt und die Suspension für 5min auf Eis inkubiert, um die Bakterien zu lysieren. Um die Proteine zu neutralisieren, wurden 7,5ml Lösung III (siehe 2.1.5) zugegeben und das Gemisch für 15min auf Eis gestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5min bei 6000Upm und 4°C wurde der Überstand durch ein GazeNetz (Hartmann, Heidenheim) gefiltert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol und 5minütiger Inkubation bei RT gefällt. Das Gemisch wurde für weitere 5min bei 6000Upm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für 10min bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 2ml TE-Puffer (siehe 2.1.5) und 2ml 4M LiCl gelöst und für 5min auf Eis gestellt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5min bei 6000Upm und 4°C. Durch die Zugabe von 10ml 100%igem Ethanol zum Überstand wurde die DNA für 15min bei -20°C gefällt. Das Pellet wurde nach einer erneuten Zentrifugation für 5min bei 6000Upm und 4°C mit 5ml 70%igem Ethanol gewaschen, um noch vorhandene Salze zu entfernen. Anschließend wurde die DNA an der Luft getrocknet, in 0,5ml TE-Puffer gelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. 5µl RNase A (10mg/ml, Merck, Darmstadt) wurden hinzugegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde eine Phenol-

Chloroform-Extraktion und eine DNA-Präzipitation durchgeführt. Abschließend wurde das Pellet in 100µl TE-Puffer aufgenommen und ü. N. bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte die OD-Messung zur Konzentrationsbestimmung am Photometer (siehe 2.2.7.1.4).

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Spezifische DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert. Bei diesem Verfahren wurde die gewünschten DNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten, bei 55°C verflüssigt und die DNA in stark salzigem Milieu an eine Silizium-Gel-Membran der Extraktionssäule gebunden. Die Membran wurde mit unterschiedlichen Puffern gewaschen und die DNA in 20-30µl H₂O, TE-Puffer oder EB-Puffer (Qiagen, Hilden) eluiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Quantifizierung der Eluate wurden diese über ein Agarosegel überprüft. Die Gelelektrophorese erfolgte für ca. 1,5h bei 100V und 400mA. Zur Größenabschätzung wurde 1µl 1kb-DNA-Leiter (MBI Fermentas, St-Leon-Rot) aufgetragen. Anschließend wurden die Banden mit Ethidiumbromid für ca. 15min angefärbt. Durch UV-Belichtung wurde das Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert, zum Fluoreszieren gebracht und photographisch dokumentiert.

2.2.7.1.3. Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA wurde entweder aus frischem Gewebe oder aus zuvor bei -80°C weggefrorenem Gewebe isoliert. Dazu wurde das zerkleinerte Gewebe in einem 2ml Eppendorfgefäß mit 700µl 50mM Tris-HCl (pH 8,0), 100mM EDTA, 100mM NaCl und 1% SDS kleingemörsert. Zu der Suspension wurden 35µl einer 10mg/ml Proteinase K Stocklösung gegeben und unter mehrmaligen mixen auf dem Vortexer für 8-12h bei 55°C inkubiert. Um die verdauten Proteinreste zu entfernen wurde eine Phenol/Chloroform (1:1 v/v) Extraktion mit dem gleichen Volumen (700µl) durchgeführt. Die Probe wurde gevortext und 5min bei 13000Upm (Biofuge, Heraeus) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit der Interphase in ein neues 2ml Eppendorfgefäß mit der Pipette überführt und mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform (1:1 v/v) beschickt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, wobei in der letzten Überführung der wässrigen Phase in ein neues Tube nicht die Interphase überführt wurde. Der wässrige Überstand wurde durch Zugabe von 500µl Isopropanol bei RT präzipitiert und anschließend 1min bei 13000Upm (Biofuge, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 1ml 70%igen Ethanol bei 13000Upm 2min gewaschen und anschließend bei 37°C getrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde die

genomische DNA in 250-500µl TE-Puffer gelöst und dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 260/280nm quantifiziert. Die Reinheit wurde durch Auftragen von 1µg DNA in einem Agarosegel überprüft.

2.2.7.1.4. Photometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

RNA und DNA besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260nm, wobei die OD_{260} von 1, einer RNA-Konzentration von 40µg/ml bzw. einer DNA-Konzentration (dsDNA) von 50µg/ml entspricht. Die Konzentrationen können mit folgenden Formeln berechnet werden:

$$\begin{array}{ll} \text{RNA} & c[\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40[\mu\text{g/ml}] \\ \text{dsDNA} & c[\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50[\mu\text{g/ml}] \end{array}$$

Mit Hilfe des Photometers (BioRad, München) wurde die OD_{260} der jeweiligen Nukleinsäuren in einer Quarzküvette gegen das Lösungsmittel gemessen. Die Reinheit einer Nukleinsäurepräparation wurde anhand des Quotienten aus den gemessenen optischen Dichten bei 260nm und 280nm überprüft. Reine RNA zeichnet sich durch einen Quotient zwischen 1,8 und 2,0 aus. Eine starke Verunreinigung mit Proteinen liegt bei einem Quotienten kleiner als 1,4 vor.

2.2.7.2. Klonierung von DCD in pBluescript II SK-Vektor

Um für die Southern Blot und Northern Blot Analyse eine Hybridisierungs-*DCD*-Sonde (siehe 2.2.7.4.1) herzustellen, mußte zunächst die cDNA (*complementary DNA*)-Sequenz von dem *DCD*-Gen in einen Vektor kloniert werden. Dazu wurde als erstes aus benignen melanozytären Nävi Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.2.7.1.1) und mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (SUPERSCRIPT™ Rnase H) in die komplementäre DNA übersetzt. Dazu wurden kurze Hexamer-Primer (*random hexamers*) verwendet, die zufällig an die mRNA hybridisieren. Die cDNA-Synthese wurde folgendermaßen angesetzt: Zu 3µg RNA wurden 5x Erst-Strang-Puffer, 2,5mM DTT, 2mM dNTP, 0,2µg Hexamer-Primer und 39,5µl DEPC-Wasser gegeben. Es folgten 10min Denaturierung der RNA bei 70°C und nach Zugabe von 0,5µl Reverse Transkriptase für 1h bei 42°C die Erststrangsynthese. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 70°C für 15min. Die cDNA wurde zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte als nächstes die gezielte Amplifizierung der cDNA-Sequenz von DCD mit spezifischen DCD-Primern RACE A und RACE B (siehe 2.1.4). Dazu wurde folgender Ansatz gewählt: 5µl 10xPCR-Puffer (BD Bioscience, Heidelberg), 1µl dNTP (20mM, Amersham, Freiburg), jeweils 50pM PCR-Primer (RACE A,

RACE B) und 0,5µl Taq-Polymerase (5U/µl, Amersham, Freiburg). Mit HPLC-H₂O (LiChrosolv[®], Merck, Darmstadt) wurde der Ansatz auf 48µl aufgefüllt, 2µl (200ng) cDNA (DCD cDNA) zugegeben und die PCR mit Hotstart bei 85°C begonnen. Das PCR-Programm umfasste 39 Zyklen, wobei sich ein Zyklus aus folgenden Einzelschritten zusammensetzte:

Schritt	Zeit	Temp.
Denaturierung:	60 Sek	94°C
Annealing:	65 Sek	54°C
Elongation:	90 Sek	72°C

Um die in der PCR amplifizierte cDNA in den pBluescript II SK-Vektor klonieren zu können, wurden die Amplifikate wie unter 2.2.7.1 beschrieben aus dem Agarosegel isoliert und über eine T/A-Ligation in den Vektor kloniert. Dieser T/A- pBluescript II SK-Vektor wurde nach dem Protokoll von Hadjeb und Berkowitc (Hadjeb, N. und Berkowitz, G. A. 1996) mit Hilfe von dem TA-Cloning Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande) nach Herstellerangaben hergestellt. Die Linearisierung des pBluescript II SK-Vektors erfolgte über die Enzyme *Hind*III und *Eco*RI in 2x Tango-Y-Puffer (MBI, Fermentas, St.Leon-Rot). Nach der Fertigstellung des pBluescript II SK-DCD-Vektors, wurde dieser mit Hilfe der DNA-Sequenzierung (siehe 2.2.7.3) überprüft.

2.2.7.3. Sequenzierung von DNA

Alle amplifizierten, über einen analytischen Restriktionsverdau bestätigten DCD-Fragmente, wurden mit Hilfe des BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) sequenziert (Sanger, F. und Coulson, A. R. 1975). Für die Sequenzreaktion wurde ein 20µl Ansatz gewählt, der sich wie folgt zusammensetzte: Es wurden ca. 1µg Plasmid-DNA (siehe 2.2.7.1.2), 3,2pM Sequenzierungsprimer (siehe 2.1.4), 3-4µl Sequenzreaktionsmix (ABI PRISM[™] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix) und autoklaviertes H₂O verwendet. Der ABI Sequencing Mix enthielt das Enzym AmpliTaq[®] und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide. Das 25 Zyklen umfassende Sequenzierungsprogramm wurde im PCR-Zykler (Biozym, Oldendorf) durchgeführt und setzte sich wie folgt zusammen: 30sek bei 96°C, 15sek bei 50°C und 4min bei 60°C, wobei die Aufheiz- und Abkühlphasen auf 0,9°C pro Sek. eingestellt waren. Anschließend wurden die Sequenzproben über Centri-Sep-Säulen (Applied Biosystems, NY, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt, um die Proteine schnell und effektiv von Nukleotiden, Puffer und Salzen zu reinigen. Die Probe wurde entweder direkt zur Sequenzierung gegeben oder bei -20°C gelagert. Die Sequenzierung erfolgte in einem ABI 373 DNA-Sequencer Perkin Elmer (Foster City, CA,

USA) und wurde freundlicherweise vom Institut für Medizinische Virologie/Experimentelle Virologie bzw. Tropenmedizin/Humanparasitologie (Universitätsklinikum Tübingen) durchgeführt.

2.2.7.4. Northern Blot Analyse

Diese Methode diente dem Nachweis der Expression des DCD-Gens auf Transkriptionsebene unter Verwendung von Gesamt-RNA in menschlicher Haut, Mäusefüßen und in der Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3. Die isolierte RNA wurde auf ein 1,0%iges Agarosegel, das Formaldehyd enthielt, aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. RNA eukaryontischer Zellen besteht zu 95% aus rRNA, die sich aus 28S-, 18S- und 5S-RNA zusammensetzt ist. Unter UV-Licht sollte sich als Maß guter RNA-Qualität die 28S- und 18S-Bande detektieren lassen, während die 5S-RNA zu klein ist und somit aus dem Gel heraus läuft.

2.2.7.4.1. Herstellung einer Digoxigenin (DIG) markierten DCD-Sonde

Ausgangsmaterial für die Digoxigenin markierten DCD-Sonde war die klonierte DCD-cDNA Sequenz im pBluescript II SK-Vektor. Die DCD-cDNA-Sequenz wurde zunächst über einen Restriktionsverdau herausgeschnitten. Dazu wurden je 10µg der Plasmid-DNA (DCD in pBluescript II SK-Vektor) mit jeweils 10U *Hind*III und 10U *Eco*RI in 2x Tango-Y-Puffer bei 37°C für 3h verdaut. Nach dem Verdau wurden die Proben auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und das DCD-cDNA-Fragment (480bp) aus dem Gel eluiert (siehe 2.2.7.1.2) und zur Mengenabschätzung wieder auf ein 2%iges Gel aufgetragen. Für die DIG-Markierung wurden 500ng der ausgeschnittenen DCD-cDNA eingesetzt. Die DNA wurde für 10min bei 95°C denaturiert und anschließend für 3min auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 2µl 10xHexanukleotid-Mix, 2µl dNTP Labeling-Mix (je 1mM dATP, dCTP und dGTP, 0,63mM dTTP, 0,35mM Dig-II-dUTP) und 1µl Klenow-Enzym. Nach gutem Mischen erfolgte die Inkubation bei 37°C ü. N. Nach ca. 18h wurde die Reaktion mit 2µl 0,2M EDTA pH 8,0 gestoppt und die Sonde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.7.4.2. Aufreinigung und Testung der DIG-markierten DCD-Sonde

Die cDNA-Sonde wurde über eine mit P60-Elutionspuffer equilibrierte Sephadex G50-Säule aufgereinigt. Für die Anfertigung dieser Säule wurde ein 1ml Safeseal Tip (Biozym, Oldendorf) verwendet, dessen Spitze abgeschnitten und mit einem kleinen Stück Gazenetz verschlossen wurde. In die Säule wurde Sephadex G50 (Amersham, Freiburg) gegeben und drei Mal mit jeweils 1ml P60 Elutionspuffer (siehe 2.1.5) equilibriert. Die DIG-markierte

Sonde wurde 1:2 mit P60 Elutionspuffer verdünnt und auf die Säule gegeben. Für die fraktionierte Elution wurden 10 mal jeweils 133µl P60 Elutionspuffer auf die Säule pipettiert und den jeweiligen Durchfluß in 1,5ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Anschließend wurden 3µl der einzelnen Fraktionen auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) aufgetragen und durch Zugabe von 13U Anti-Digoxigenin-AP und CDP-Star in einer 1:100-Verdünnung detektiert. Es wurden diejenigen Fraktionen, die das stärkste Signal hervorgerufen haben, gepoolt und bis zur späteren Verwendung auf Eis gehalten oder bei -20°C gelagert.

2.2.7.4.3. RNA-Gel

Für das RNA-Gel wurde 1g Agarose in 73,8ml DEPC-H₂O (siehe 2.1.5) erhitzt, auf ca. 60°C abgekühlt und 10ml 1xMOPS-Puffer sowie 16,2ml 37%iges Formaldehyd zugegeben. Vor dem Gießen wurden die Kammer und der Kamm mit 10% SDS und DEPC-H₂O gespült. Jede aufgetragene RNA-Probe (siehe 2.2.7.1.1) enthielt 10µg RNA, 2µl 10xMOPS-Puffer, 3,5µl 37% Formaldehyd und 10µl Formamid. Die Proben wurden für 15min bei 65°C erhitzt, auf Eis gestellt, mit jeweils 2µl RNA-Ladepuffer (siehe 2.1.5) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1xMOPS-Puffer verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte für ca. 10min bei 100V und 400mA und anschließend bei 25V und 16mA ü. N. Nach ca. 16h wurde das Gel mit frischem Ethidiumbromid in autoklaviertem 1xTBE für 20min angefärbt, um die Auftrennung zu überprüfen und photographisch zu dokumentieren. Um das Formaldehyd zu entfernen, wurde das Gel für 30min mit 20xSSC (siehe 2.1.5) gewaschen. Danach erfolgte der Transfer der aufgetrennetn RNA-Fragmente ü. N. mit 20xSSC als Transferpuffer auf eine Nylonmembran.

2.2.7.4.4. Hybridisierung

Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut und die Nukleinsäuren durch *Crosslinken* mit UV-Strahlen (120mJ, UV Stratalinker, Stratagene, La Jolla, CA, USA) auf der Nylonmembran fixiert. Um zu überprüfen, ob der Transfer vollständig stattgefunden hat, wurde das Gel noch einmal in Ethidiumbromid angefärbt und photographisch dokumentiert. Die Membran wurde mit 10xSSC befeuchtet, in einen Plastikbeutel eingeschweißt, 25-30ml DIG Easy Hyb-Puffer (Roche, Mannheim) zur Vorhybridisierung zugefügt und für mindestens 2,5h bei 50°C inkubiert. Die aufgereinigte DIG-markierte Sonde (siehe 2.2.7.4.2) wurde mit 0,5ml DIG Easy Hyb-Puffer vermischt und 10min bei 100°C erhitzt. Nach der ersten Verwendung der Sonde wurde diese nur noch auf 70°C erhitzt. Anschließend wurde die Sonde für 3min auf Eis

inkubiert, mit 9,5ml vorgewärmtem DIG Easy Hyb-Puffer versetzt und nach Verwerfen des Prähybridisierungspuffers zu der Membran pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 50°C ü. N. Am nächsten Tag wurde die DIG-markierte Sonde in einem 15ml Reaktionsgefäß aufgefangen und bis zur nächsten Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.7.4.5. Detektion

Die Membran wurde 2x 5min in 1xSSC/0,1% SDS bei RT, 2x 15min in 0,5xSSC/0,1% SDS bei 50°C (stringente Bedingungen), 1min in 1x Maleinsäurepuffer und 2x 15min in 2x Blockierungspuffer in 1x Maleinsäurepuffer (Blocking reagent, Roche, Mannheim) bei RT gewaschen. Handelte es sich um eine bereits mehrmals verwendete Sonde wurde der erste Waschvorgang 2x5min mit 2xSSC/0,1% SDS durchgeführt. Im Anschluss wurden 100ml 2x Blockierungspuffer mit 10µl Anti-Digoxigenin-AP (1:10000) versetzt und die Membran damit für 45min bei RT behandelt. Anschließend wurde die Membran 2x15min in 1x Maleinsäurepuffer und 1min in Äquilibrierungspuffer (siehe 2.1.5) gewaschen. 70µl CDP-Star (Roche, Mannheim) wurden zu 7ml Äquilibrierungspuffer pipettiert und für 10min mit der Membran inkubiert. Die Lichtemission des CDP-Star wurde in der Dunkelkammer durch Autoradiografie detektiert.

2.2.7.5. Genomische Southern Blot Analyse

Um Homologien des *DCD*-Gens im Menschen und auch in anderen Spezies zu entdecken wurde eine Southern Blot Analyse (Southern, E. M. 1975) mit genomischer DNA durchgeführt. Dazu wurde die genomische DNA von Maus, Schwein, Kaninchen und Mensch mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* oder *HindIII* behandelt und anschließend durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Das im Agarosegel entstandene Trennmuster wurde auf eine Nylonmembran (Roche, Mannheim) kapillarisch übertragen und dort dauerhaft fixiert. Anschließend wurde die Membran mit einer einzelsträngigen DIG-markierten *DCD*-Sonde behandelt.

Für den Verdau wurden jeweils 10µg der genomischen DNA mit 5U *EcoRI*-Enzym in *EcoRI*-Puffer oder mit 5U *HindIII*-Enzym in Red-Puffer für 16h bei 37°C inkubiert. Der Verdau und zusätzlich die nicht-geschnittene genomische DNA wurden vollständig auf ein 0,9%iges Agarosegel aufgetragen und bei 90V für 3h aufgetrennt. Um den Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran durchzuführen wurde das Gel zuvor für 15min mit 0,25N HCL behandelt und nach waschen in Wasser für 30min in Denaturierungspuffer (0,5M NaOH; 1,5M NaCl) inkubiert. Danach folgte für 30min die Neutralisierung im Neutralisierungspuffer (0,5M Tris (pH 7,4); 1,5M NaCl). Das Gel wurde in 10xSSC über

Nacht auf eine Nylonmembran transferriert und mit UV-Licht kovalent gebunden (257mJ, UV Stratalinker, Stratagene) Die Membran wurde 60min bei 65°C prähybridisiert (6xSSC, 5x Denhardts, 0,5% SDS und 100µg/ml Salmonspermien DNA, Roche, Mannheim) und nach Denaturierung der DIG-*DCD*-Sonde (siehe 2.2.7.4.1) für 10min bei 100°C über Nacht im Prähybridisierungspuffer bei 60°C hybridisiert. Die Membran wurde 1min unter nicht-stringenten Bedingungen in 1xMaleinsäurepuffer (siehe 2.1.5) gewaschen und 2x15min in 2xBlockierungspuffer in 1x Maleinsäurepuffer (Blocking reagent, Roche, Mannheim) inkubiert. Im Anschluss wurden 100ml 2x Blockierungspuffer mit 10µl Anti-Digoxigenin-AP (13U; 1:10000) versetzt und die Membran damit für 45min bei RT behandelt. Anschließend wurde die Membran 2x15min in 1x Maleinsäurepuffer und 1min in Äquilibrierungspuffer (siehe 2.1.5) gewaschen. 70µl CDP-Star (Roche, Mannheim) wurden zu 7ml Äquilibrierungspuffer pipettiert und für 10min mit der Membran inkubiert. Die Lichtemission des CDP-Star wurde in der Dunkelkammer durch Autoradiografie detektiert.

3. Ergebnisse

Grundlage dieser Arbeit war die Identifizierung von mehreren prozessierten C-terminal abgeleiteten DCD-Peptiden, welche sich voneinander sowohl in ihrer Peptidlänge als auch in ihrer Nettoladung unterscheiden (Flad, T. et al. 2002; Rieg, S. et al. 2004). Für die anionischen C-terminal abgeleiteten DCD-Peptide DCD-1 und DCD-1L konnte eine antimikrobielle Wirkung auf verschiedene Keime nachgewiesen werden (Schittek, B. et al. 2001). Der zugrunde liegende antimikrobielle Wirkmechanismus dieser Peptide war zu diesem Zeitpunkt unerforscht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den antimikrobiellen Wirkmechanismus vom DCD-abgeleiteten Peptiden aufzuklären. Dazu wurde zunächst untersucht, ob diese Peptide ein unterschiedliches Wirkspektrum gegen Mikroorganismen aufweisen. Um weiterhin zu klären, ob die antibakterielle Funktion der Peptide auf der Ausbildung von Membranporen, der Penetration des Peptids durch die Bakterienmembran oder auf der Bindung an intrazelluläre Rezeptoren beruht, wurden verschiedene funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Die wesentlichen Struktureigenschaften, welche für den Wirkmechanismus von DCD-abgeleiteten Peptiden erforderlich sind, wurden unter Verwendung von Circular dichroismus (CD)-Messungen untersucht. Weiterhin wurde untersucht, ob homologe *DCD*-Gene beim Menschen und bei anderen Säugern (Maus, Kaninchen, Schwein) vorhanden sind.

3.1. Übersicht über DCD-abgeleitete Peptide im menschlichem Schweiß

DCD-abgeleitete Peptide wurden im ekkrinen Schweiß mit Hilfe der *Surface-enhanced Laser Desorption/Ionisation* (SELDI)-Technologie identifiziert (Flad, T. et al. 2002). Es wurden insgesamt 13 verschiedene DCD-Peptide, die vom C-terminalen Ende abstammen, und ein N-terminal abgeleitetes Peptid, YDP-42 sowie dessen Dimer, nachgewiesen (**Tab. 9**). Im Vergleich zum Peptid DCD-1L (AS-Positionen: 63-110) fehlen DCD-1 (AS-Positionen: 63-109) und SSL-46 (AS-Positionen: 63-108) jeweils das letzte C-terminale Leucin (L^{110}) oder Leucin (L^{110}) und Valin (V^{109}), und SSL-45 zusätzlich das Serin (S^{108}). Die Peptide SSL-29 und SSL-25 sind kürzere Peptide und besitzen denselben N-Terminus wie DCD-1L, beginnend mit den Aminosäuren „SSL“. Den anderen Peptiden fehlen die ersten drei N-terminalen Aminosäuren „SSL“, so dass diese mit den Aminosäuren „LEK“ beginnen. Sie sind entweder 41 oder 45 Aminosäuren (LEK-41 und LEK-45) oder nur 24 oder 26 Aminosäuren lang (LEK-24 und LEK-26). Diese C-terminal abgeleiteten DCD-

Peptide unterscheiden sich voneinander nicht nur in ihrer Peptidlänge, sondern auch zusätzlich durch ihre unterschiedliche Nettoladung. Neun der dreizehn Peptide besitzen eine anionische, zwei eine neutrale und zwei kürzere Peptide, SSL-25 und LEK-24, eine kationische Nettoladung. Zwar ist das proteolytische Muster dieser DCD-abgeleiteten Peptide im Schweiß individuell verschieden, es wurden jedoch einige Peptide mit einer hohen Häufigkeit im Schweiß nachgewiesen (**Tab. 9**).

Tabelle 9: Übersicht über die im menschlichen Schweiß vorkommenden DCD-abgeleiteten Peptide (Rieg, S. et al. 2006)

Peptid-Name	Aminosäure-Position / Aminosäure-Sequenz	Theor. Masse [Da]	Netto-Ladung	Häufigkeit
DCD-1L	63-110 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVLDSVL	4818.5	-2	83%
DCD-1	63-109 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVLDSV	4705.3	-2	78%
SSL-46	63-108 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVLDS	4606.2	-2	78%
SSL-45	63-107 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVLDS	4519.1	-2	33%
SSL-29	63-91 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDL	2869.3	0	89%
SSL-25	63-87 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDA	2412.8	+2	61%
LEK-45	66-110 LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVLDSVL	4531.2	-2	100%
LEK-44	66-109 LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVLDSV	4418.0	-2	67%
LEK-43	66-108 LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVLDS	4318.9	-2	78%
LEK-42	66-107 LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVLDS	4231.8	-2	6%
LEK-41	66-106 LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGA VHDVKDVL	4116.3	-1	6%
LEK-26	66-91 LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDL	2582	0	38%
LEK-24	66-89 LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVE	2353.7	+1	22%

Für die anstehenden Untersuchungen in dieser Arbeit wurden DCD-Peptide ausgewählt (**Tab. 10**), die zum einen zahlreich im Schweiß vorzufinden sind und zum anderen sich voneinander in ihrer Nettoladung und Peptidlänge unterscheiden. Dazu gehören die Peptide DCD-1L, SSL-29, SSL-25 und LEK-45, sowie noch ein weiteres C-terminal verkürztes Peptid SSL-23 (siehe 2.1.2). Als Kontroll-Peptide wurden das DPI (30AS mit negativer Nettoladung) und das Cathelicidin LL-37 (37AS mit positiver Nettoladung) mitgeführt. Für die nachfolgenden Analysen wurden alle Peptide synthetisch hergestellt (siehe 2.2.1.1).

Tabelle 10: Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DCD-abgeleiteten Peptide und Kontroll-Peptide

Peptide	Aminosäure-Position / Aminosäure-Sequenz	pI*	Netto-Ladung
DCD-1L	63-110 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVKGKAVHDVKDVLDSVL	5,07	-2
LEK-45	66-110 LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVKGKAVHDVKDVLDSVL	5,08	-2
SSL-29	63-91 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDL	5,97	0
SSL-25	63-87 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDA	9,4	+2
SSL-23	63-85 SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGK	9,82	+3
DPI	DPYAEAASGPNPGSKSHESAQAENCGADPE	4,08	-5
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	10,6	+6

*pI: Isoelektrischer Punkt

3.2. Nachweis der antimikrobiellen Aktivität von DCD-abgeleiteten Peptiden

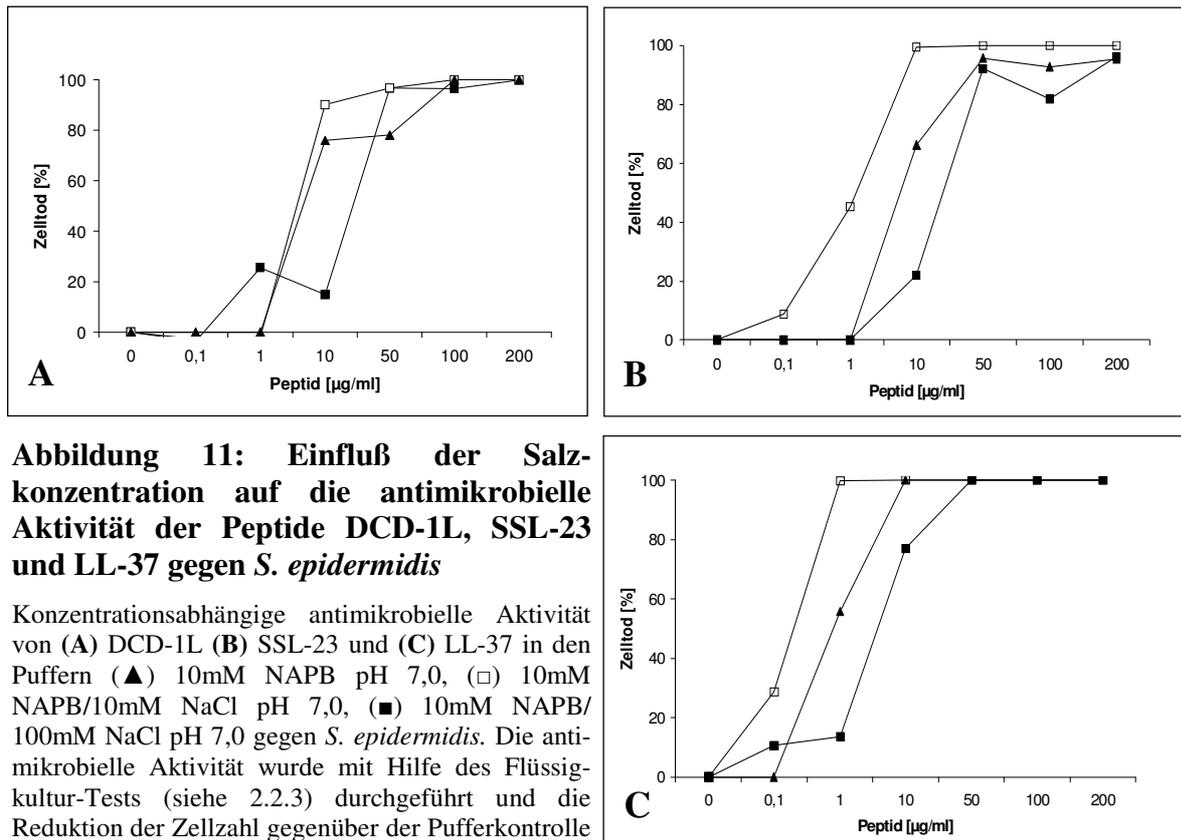
Um die antimikrobielle Wirksamkeit der ausgewählten DCD-abgeleiteten Peptide (**Tab. 10**) zu analysieren, wurden die Peptide in einem antimikrobiellen Flüssigkulturtest, modifiziert nach Ganz *et al.* (1985) (siehe 2.2.3), auf verschiedene Bakterien hin untersucht. Es wurden sowohl Gram-negative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Escherichia coli* ML-35p als auch Gram-positive Bakterien wie methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-sensitiver *Staphylococcus aureus* (MSSA) und *Staphylococcus epidermidis* verwendet.

3.2.1. Einfluß der Salzkonzentration auf die antimikrobielle Aktivität

Antimikrobielle Peptide, wie z.B. die humanen β -Defensine HBD-1, HBD-2 und HBD-4, zeigen häufig mit zunehmender Salzkonzentration bzw. Ionenstärke eine verminderte antimikrobielle Aktivität gegenüber Mikroorganismen (Goldman, M. J. et al. 1997; Bals, R. et al. 1998b; Valore, E. V. et al. 1998; Garcia, J. R. et al. 2001b). So bleibt oft unter Verwendung physiologischer Salzkonzentrationen in Medien oder Puffern eine antimikrobielle Aktivität aus.

Um zunächst den Einfluß unterschiedlicher Salzkonzentrationen (NaCl) auf die antimikrobielle Aktivität der DCD-abgeleiteten Peptide zu untersuchen, wurde die antimikrobielle Aktivität der Peptide in Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) (NAPB) mit verschiedenen Natriumchlorid-Konzentrationen gegenüber dem Bakterienstamm *S. epidermidis*

getestet. Dazu wurden die DCD-Peptide DCD-1L (anionisch), SSL-23 (kationisch) und das Cathelicidin LL-37 (kationisch) in den Konzentrationen von 0,1 bis 200 µg/ml in 10mM NAPB, sowie in 10mM NAPB, welcher 10mM oder 100mM NaCl enthielt, mit *S. epidermidis* für 2,5h inkubiert (**Abb. 11**). Für die Auswertung der antimikrobiellen Tests wurde die prozentuale Anzahl der getöteten Mikroorganismen gegenüber der Pufferkontrolle bestimmt. Der Test wurde wie in 2.2.3 beschrieben durchgeführt.



Die in **Abb. 11** aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass die Peptide DCD-1L, SSL-23 und LL-37 unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen, sowohl in niedrigen als auch in hohen Salzkonzentrationen, eine antimikrobielle Aktivität gegen *S. epidermidis* besitzen. Die Pufferbedingungen 10mM NAPB/10mM NaCl (pH 7,0) führten im Vergleich zu 10mM NAPB ohne NaCl oder mit 100mM NaCl zu einer gesteigerten antimikrobiellen Wirkung bei Peptidkonzentrationen zwischen 0,1 und 50 µg/ml. Für die weiteren antimikrobiellen Tests wurden daher die Pufferbedingungen 10mM NAPB/10mM NaCl (pH 7,0) gewählt, unter denen die höchste antimikrobielle Aktivität gegenüber *S. epidermidis* zu verzeichnen war.

3.2.2. Zeitkinetik der antimikrobiellen Aktivität

Die bisherigen Untersuchungen (Schittek, B. et al. 2001) wiesen eine antimikrobielle Aktivität von DCD-1 und DCD-1L nach 3h bis 21h Inkubation mit verschiedenen Mikroorganismen nach. Dabei wurde nicht geklärt, ob die Mikroorganismen schon in kürzerer Zeit (<3h) durch DCD-1L getötet wurden. Um zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt DCD-Peptide die antimikrobielle Aktivität entfalten, wurde eine Zeitkinetik (0-3h) erstellt. Dazu wurden die Stämme *E. coli* oder methicillin-sensitiver *S. aureus* (MSSA) für verschiedene Zeiträume mit den Peptiden DCD-1L, SSL-23 und LL-37 in 10mM NAPB/10mM NaCl (pH 7,0) inkubiert und anschließend die antimikrobielle Aktivität als prozentualer Zelltod bestimmt (**Abb. 12A/B**). DCD-1L wurde in einer Konzentrationen von 200 μ g/ml und LL-37 in einer niedrigeren Konzentration von 10 μ g/ml mit den beiden Stämmen inkubiert (**Abb. 12A**). Für das SSL-23 wurde die Zeitkinetik mit verschiedenen Konzentrationen (1-100 μ g/ml) gegen *S. aureus* (MSSA) durchgeführt (**Abb. 12B**).

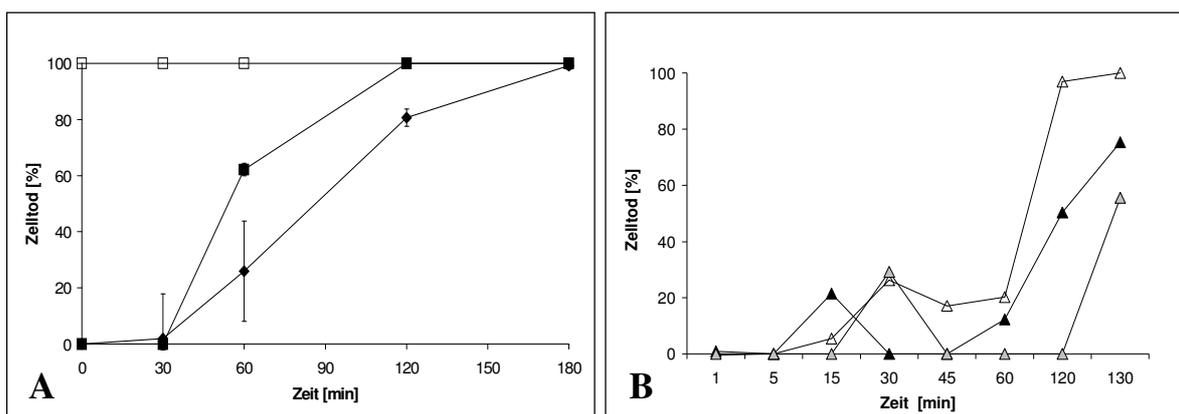


Abbildung 12: Zeitkinetik der antimikrobiellen Aktivität von DCD-1L, SSL-23 und LL-37 gegen *S. aureus* und *E. coli*

Nach verschiedenen Zeitpunkten (0-180min) wurde die antimikrobielle Aktivität von DCD-1L (A) in einer Konzentration von 200 μ g/ml gegen *S. aureus* (MSSA) (■) und *E. coli* (◆) sowie von LL-37 (10 μ g/ml) gegen methicillin-sensitiver *S. aureus* (MSSA) (□) durch Ausplattieren der Zellen bestimmt. Der Test wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. In (B) wird die antimikrobielle Aktivität von SSL-23 für verschiedene Konzentrationen (▲)1 μ g/ml, (▲)10 μ g/ml und (Δ)100 μ g/ml gegen *S. aureus* (MSSA) über einen Zeitraum von 130min gezeigt.

Die Daten zeigen, dass DCD-1L zeitabhängig sowohl auf den Gram-positiven Stamm methicillin-sensitiver *S. aureus* als auch auf den Gram-negativen Stamm *E. coli* wirkt. Diesbezüglich wird deutlich, dass eine antimikrobielle Aktivität von DCD-1L gegenüber beiden Stämmen erst ab einer Inkubationszeit von mindestens 2h eintritt. Innerhalb der ersten 30 Minuten ist keine antimikrobielle Wirkung gegenüber beiden Keimen nachweisbar. Jedoch weisen die Aktivitätsprofile von DCD-1L auf beide Keime auch Unterschiede auf (**Abb. 12A**). So wirkt das DCD-1L auf den Gram-positiven Stamm

MSSA schon nach 60 Minuten mit ca. 60% Wachstumsinhibition wohingegen auf den Gram-negativen Stamm *E. coli* eine knapp 25%ige Inhibition zu verzeichnen ist. Anscheinend reagiert der Gram-positive Stamm sensitiver auf DCD-1L als der Gram-negative Stamm. Weiterhin wurde eine Zeitkinetik für das kationische und verkürzte DCD-Peptid SSL-23 durchgeführt (**Abb. 12B**). Im Vergleich zum anionischen DCD-1L zeigt SSL-23 ebenfalls erst nach 2h gegen den Gram-positiven MSSA-Stamm eine deutliche antimikrobielle Wirkung. Hingegen wirkt das Cathelicidin LL-37 (**Abb. 12A**) schon in einer geringeren Konzentration von 10µg/ml unmittelbar nach Zugabe antimikrobiell gegen den Gram-positiven MSSA-Stamm.

3.2.3. Analyse des Wirkspektrums

Um das Wirkspektrum der DCD-abgeleiteten Peptide zu analysieren, wurden die Peptide DCD-1L, LEK-45, SSL-29, SSL-25 und SSL-23 (**Tab.10**) in verschiedenen Konzentrationen (0-200µg/ml) mit Gram-positiven (methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-sensitiver *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Staphylococcus epidermidis*) und Gram-negativen (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *E. coli* ML-35p) Bakterien inkubiert und die antimikrobielle Aktivität der Peptide als prozentualer Zelltod gegenüber der Pufferkontrolle ohne Peptid bestimmt (**Abb.13**). Als quantitatives Maß für die antimikrobielle Aktivität der Peptide wurde in **Tab. 9** die jeweilige inhibitorische Konzentration (IC₉₀) angegeben. Die IC₉₀ gibt an, bei welcher Peptid-Konzentration (µg/ml oder µM) 90% der Mikroorganismen verglichen mit der Pufferkontrolle (10mM NAPB/10mM NaCl, pH 7,0) abgetötet werden. Unter Beachtung der Versuchsbedingungen können die IC₉₀-Werte zu einem direkten Vergleich der antimikrobiellen Aktivität verschiedener Peptide herangezogen werden.

Die in **Abb. 13** dargestellten Aktivitätsprofile zeigen, dass die DCD-abgeleiteten Peptide ein unterschiedliches Wirkspektrum auf die Mikroorganismen aufweisen. Generell zeigen das anionische Peptid DCD-1L und die abgeleiteten kationischen Peptide SSL-25 und SSL-23 eine hohe antimikrobielle Aktivität (IC₉₀<50µg/ml) gegen die meisten getesteten Keime (*E. coli*, *S. epidermidis*, MSSA und MRSA), aber nur in geringem Maße gegen *P. aeruginosa*. Dagegen zeigen die DCD-abgeleiteten Peptide LEK-45 und SSL-29 nur eine minimale antimikrobielle Aktivität gegen die getesteten Mikroorganismen (IC₉₀>180µg/ml). Die kationischen Peptide SSL-23 und SSL-25 zeigen im Vergleich zu DCD-1L eine ähnliche oder teilweise höhere antimikrobielle Aktivität gegen die meisten getesteten Mikroorganismen. Gegenüber *E. coli* besitzen die beiden kationischen Peptide eine IC₉₀

von 10 μ g/ml (4,1 und 4,5 μ M), wohingegen DCD-1L nur eine IC₉₀ von 45 μ g/ml (9,3 μ M) aufweist. Eine begrenzte Aktivität zeigt SSL-25 gegenüber *S. epidermidis* (IC₉₀>200) und SSL-23 gegenüber MRSA (IC₉₀>200).

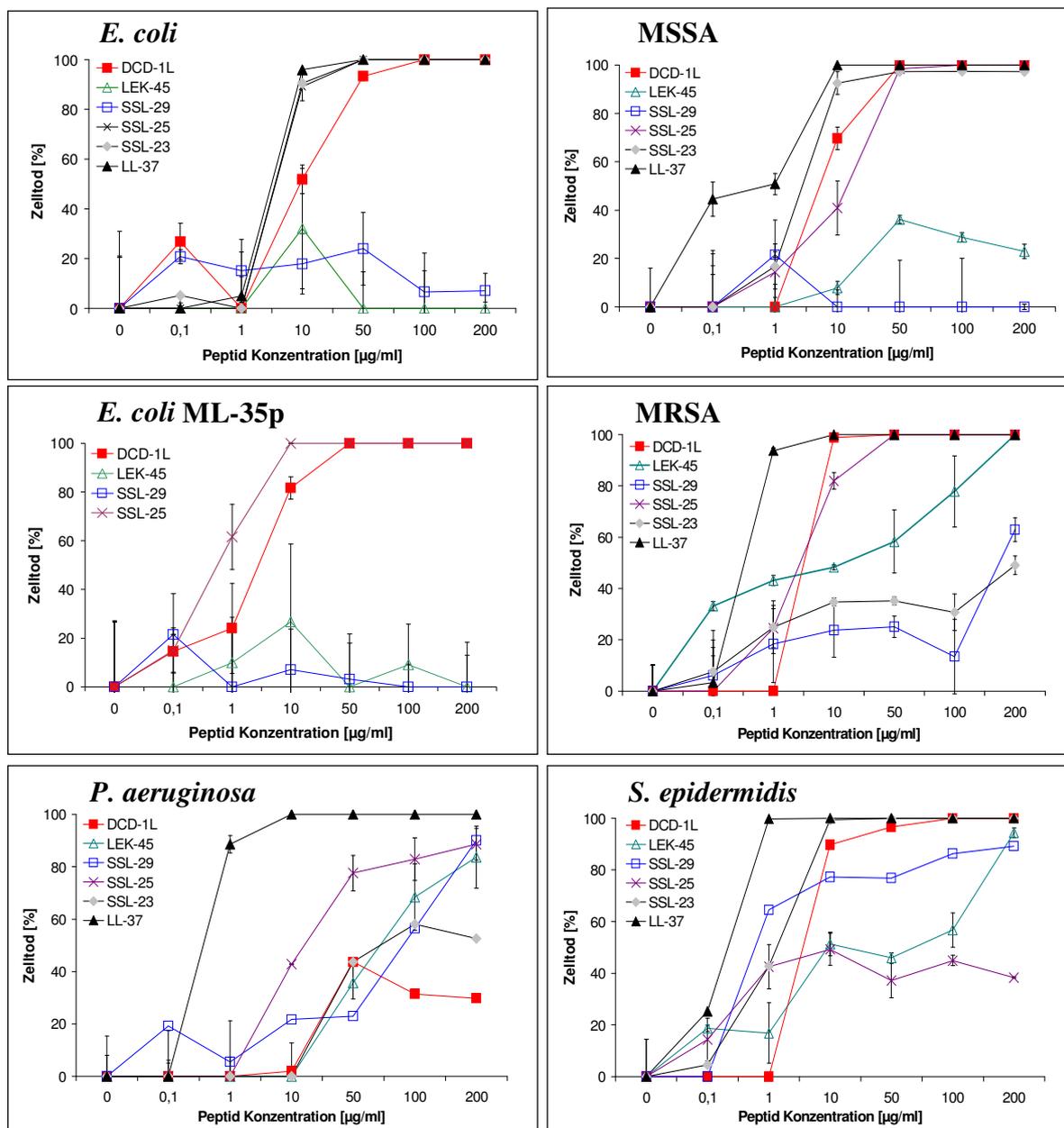


Abbildung 13: Ergebnisse der antimikrobiellen Tests mit DCD-abgeleiteten Peptiden gegen verschiedene Mikroorganismen

Die synthetischen Peptide **DCD-1L** (■), **LEK-45** (△), **SSL-29** (◇), **SSL-25** (×), **SSL-23** (◆) und das **LL-37** (▲) wurden in verschiedenen Konzentrationen von 0,1-200 μ g/ml für 2,5h bei 37 $^{\circ}$ C mit den Bakterienstämmen *E. coli*, *E. coli* ML-35p, methicillin-sensitiver *S. aureus* (MSSA), methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis* und *Pseudomonas aeruginosa* inkubiert und anschließend die Zellzahl durch ausplattieren bestimmt. Die Reduktion der Zellzahl gegenüber der Pufferkontrolle (10mM NAPB/10mM NaCl pH 7,0) wurde prozentual ausgewertet und als prozentualer Zelltod gegen die jeweiligen Peptidkonzentrationen aufgetragen. Als Negativ-Kontrolle für die antimikrobielle Aktivität wurde das Peptid DPI unter den gleichen Bedingungen verwendet.

Tabelle 11: Quantifizierung der antimikrobiellen Aktivität (IC₉₀) von DCD-abgeleiteten Peptiden gegen verschiedene Mikroorganismen

Die inhibitorische Konzentration (IC₉₀) gibt an, bei welcher Konzentration (µg/ml bzw. µM) 90% der Mikroorganismen verglichen mit der Pufferkontrolle (10mM NAPB/10mM NaCl, pH 7,0) sterben.

Bakterienstämme	IC ₉₀ (µg/ml oder (µM))					
	DCD-1L	LEK-45	SSL-29	SSL-25	SSL-23	LL-37
Gram-positive						
MSSA	45 (9,3)	>200 (>44,1)	>200 (>69,7)	48 (19,9)	10 (4,5)	9 (2,0)
MRSA	8 (1,7)	180 (39,7)	>200 (>69,7)	35 (14,5)	>200 (>89,8)	0,9 (0,2)
<i>S. epidermidis</i>	10 (2,1)	200 (44,1)	200 (69,7)	>200 (>82,9)	8 (3,6)	0,9 (0,2)
Gram-negative						
<i>Escherichia coli</i>	45 (9,3)	>200 (>44,1)	>200 (>69,7)	10 (4,1)	10 (4,5)	9 (2,0)
<i>E. coli</i> ML-35p	30 (6,2)	>200 (>44,1)	>200 (>69,7)	9 (3,7)	n.b.*	n.b.*
<i>P. aeruginosa</i>	>200 (>41,5)	>200 (>44,1)	>200 (>69,7)	200 (82,9)	>200 (>89,8)	1 (0,22)

* n.b.: nicht bestimmt

Aus den Ergebnissen lässt sich folgendes zusammenfassen: Die DCD-Peptide besitzen unter *in vitro* Testbedingungen eine antimikrobielle Aktivität unabhängig von ihrer Nettoladung. Weiterhin scheinen die drei N-terminalen Aminosäuren „SSL“ von DCD-1L einen entscheidenden Einfluß auf die antimikrobielle Aktivität zu nehmen, da das LEK-45 generell eine signifikant geringere Aktivität als DCD-1L aufweist. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Peptide SSL-23 und SSL-25 eine vergleichbare und zum Teil höhere Aktivität als DCD-1L zeigen. Hingegen besitzt das etwas längere Peptid SSL-29, welches eine neutrale Nettoladung hat, eine deutlich geringere antimikrobielle Aktivität. Weiterhin lässt sich herleiten, dass das kationische Peptid SSL-23, welches als kürzestes DCD-Peptid eine hohe antimikrobielle Aktivität aufweist, eine minimale Peptidstruktur für die antimikrobielle Aktivität darstellt.

3.3. Untersuchungen zum Wirkmechanismus von DCD-abgeleiteten Peptiden

3.3.1. Einfluß von bakteriellen Resistenzmechanismen auf die antimikrobielle Aktivität DCD-abgeleiteter Peptide

Um in einem weiteren Schritt den Angriffsort von DCD-Peptiden bzw. den bakteriellen Resistenzmechanismus gegen DCD-Peptide zu analysieren, wurden verschiedene molekular-definierte *Staphylococcus*-Mutanten (*dltA*-, *mprF*- und *ica*-Mutante) auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den DCD-Peptiden DCD-1L, LEK-45, SSL-29, SSL-25 und SSL-23 in einem antimikrobiellen Test untersucht.

Die oben genannten Bakterienmutanten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Peschel und Prof. Dr. F. Götz) zeichnen sich entweder durch das Fehlen von Modifizierungen in der Bakterienmembran oder in Teichonsäuren aus oder sind in der Biofilmbildung gestört. Durch gezielte genetische Mutationen sind die *Staphylococcus* nicht mehr in der Lage, Teichonsäuren mit D-Alanin (*dltA*-Mutante) oder die Phospholipide mit L-Lysin (*mprF*-Mutante) zu modifizieren, so dass keine zusätzliche positive Ladung in die negativ geladenen Phospholipide oder Teichonsäuren eingebaut wird. Dies bewirkt, dass die Bakterienoberfläche eine höhere negative Ladung aufweist, so dass kationische antimikrobielle Peptide (CAMPs) über elektrostatische Interaktion erhöht an die negativ-geladene Bakterienmembran binden können. Dies hat zur Folge, dass diese Bakterienmutanten sensitiver auf die CAMPs reagieren. Eine weitere Mutante (*ica*-Mutante) fehlt die Fähigkeit, ein Schleim-Polymer namens PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) zu bilden, welches für die Adhäsion der Zelle und der Biofilmbildung notwendig ist. Auch diese Bakterienmutante zeigt in den meisten Fällen eine erhöhte Sensitivität gegenüber CAMPs.

Die Ergebnisse der antimikrobiellen Tests mit DCD-Peptiden gegen die Bakterienmutanten und die jeweiligen Wildtyp-Stämme wurden in **Abb. 14** als prozentualer Zelltod gegen die Peptidkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] aufgetragen bzw. in **Tab. 12** die IC_{90} dargestellt.

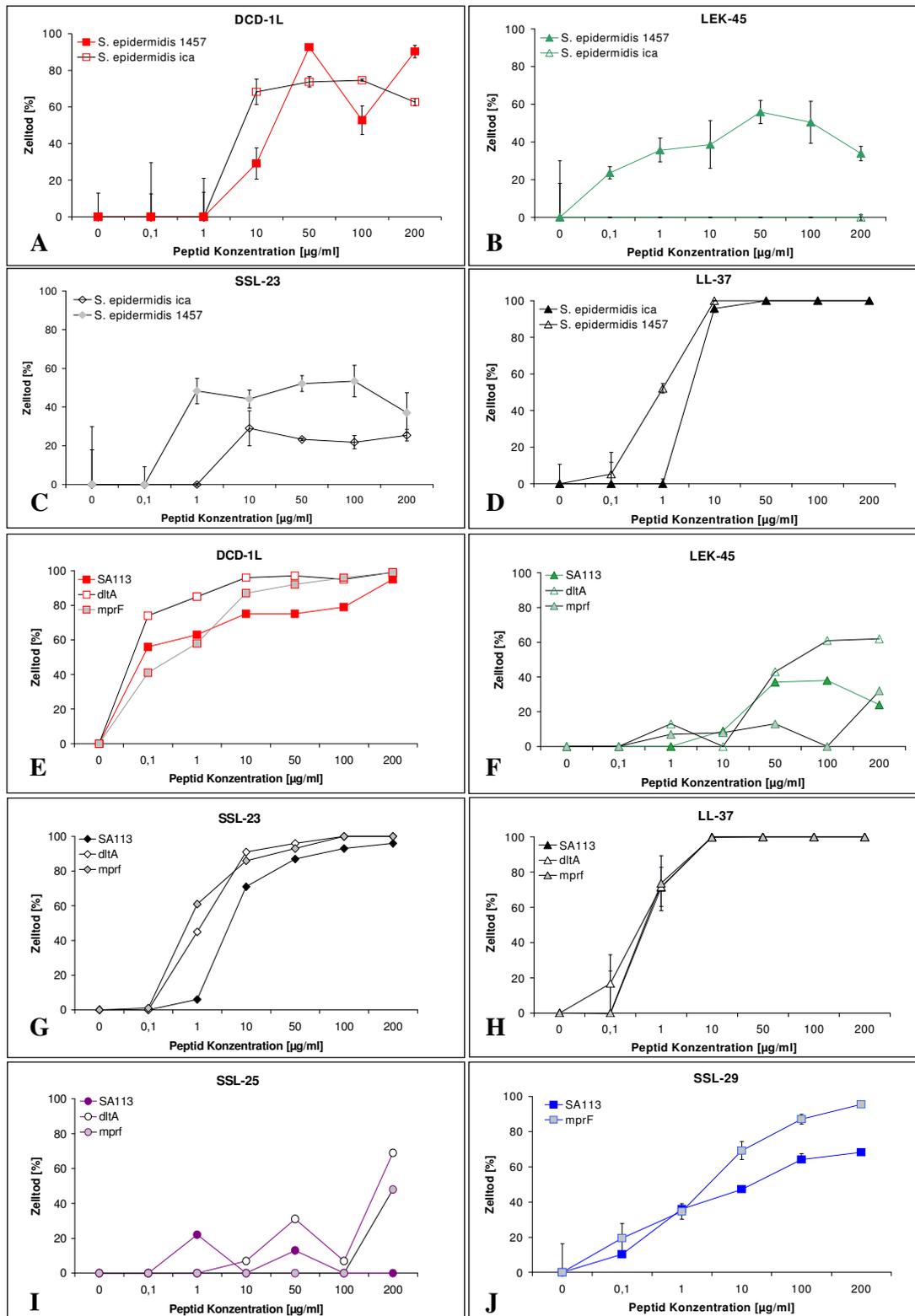


Abbildung 14: Antimikrobielle Aktivität DCD-abgeleiteter Peptide gegen verschiedene Bakterien-Mutanten und deren jeweiligen Wildtyp-Stämme

Die synthetischen Peptide **DCD-1L**, **LEK-45**, **SSL-29**, **SSL-25**, **SSL-23** und **LL-37** wurden in Konzentrationen von 0,1-200 $\mu\text{g/ml}$ für 2,5h bei 37°C mit den Bakterien-Mutanten *S. aureus mprF*, *dltA* und deren Wt-Stamm *S. aureus* 113 (**E-J**) sowie mit der Mutante *S. epidermidis ica* und dessen Wildtyp-Stamm *S. epidermidis* 1457 (**A-D**) inkubiert und anschließend die Zellzahl durch ausplattieren bestimmt. Die Reduktion der Zellzahl gegenüber der Pufferkontrolle (10mM NABP/ 10mM NaCl, pH 7,0) wurde prozentual ausgewertet und als prozentualer Zelltod gegen die jeweiligen Peptidkonzentrationen aufgetragen. Als Negativ-Kontrolle für die antimikrobielle Aktivität wurde das Peptid DPI verwendet. Die Symbole überdecken sich zum Teil.

Tabelle 12: Quantifizierung der antimikrobiellen Aktivität von DCD-abgeleiteten Peptiden gegen verschiedene Bakterienmutanten

Die inhibitorische Konzentration (IC₉₀) gibt an, bei welcher Konzentration (µg/ml bzw. µM) 90% der Mikroorganismen verglichen mit der Pufferkontrolle (10mM NAPB/10mM NaCl, pH 7,0) sterben.

Bakterienstämme	IC ₉₀ (µg/ml oder (µM))					
	DCD-1L	LEK-45	SSL-29	SSL-25	SSL-23	LL-37
<i>S. aureus</i> 113 (wt)	180 (35,4)	>200 (>44,1)	>200 (>69,7)	>200 (>82,9)	>75 (>33,7)	6 (1,34)
<i>S. aureus mprF</i>	50 (10,4)	>200 (>44,1)	180 (>62,7)	>200 (>82,9)	50 (22,5)	6 (1,34)
<i>S. aureus dltA</i>	6 (1,2)	>200 (>44,1)	n.b.	>200 (>82,9)	10 (4,5)	6 (1,34)
<i>S. epi.</i> 1457 (wt)	50 (10,4)	>200 (>44,1)	>200 (>69,7)	6 (2,5)	>200 (>89,8)	9 (2,0)
<i>S. epi. ica</i>	>200 (>41,5)	>200 (>44,1)	n.b.*	n.b.*	>200 (>89,8)	9 (2,0)

* n.b.: nicht bestimmt

Aus der **Tab. 12** und **Abb. 14** wird ersichtlich, dass die *S. aureus* Mutanten *mprF* und *dltA* sensitiver auf die DCD-abgeleiteten Peptide reagieren. Besonders sensitiv scheint die *dltA* Mutante auf DCD-1L und SSL-23 zu sein (**Abb. 14E/G**). Die Mutante besitzt keine Modifizierung der Teichonsäuren durch D-Alanin. Hingegen zeigen die Peptide LEK-45, SSL-29 und SSL-25 allgemein eine geringe antimikrobielle Aktivität gegen die *mprF*- und *dltA*-Mutanten sowie gegen den Wildtyp *S. aureus* 113. Beim kationischen LL-37 zeigt sich lediglich in niedrigen Konzentrationen von 0,1µg/ml (**Abb.14H**) eine erhöhte antimikrobielle Aktivität gegenüber der Bakterienmutante *dltA*. Der Vergleich zwischen dem Wildtyp *S. epidermidis* 1457 und der Bakterienmutante *ica* zeigt keine Steigerung der Sensitivität gegenüber den DCD-Peptiden sowie LL-37. Vielmehr reagiert der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 auf DCD-1L sensitiver als die *ica*-Mutante.

Diese Daten zeigen, dass möglicherweise die Modifizierung der Bakterien-Zellhülle im Bereich der Phospholipide und der Teichonsäuren sowie das Adhäsionsmolekül PIA einen Einfluß auf die Wirksamkeit von DCD-Peptiden nehmen.

3.3.2. Membranpermeabilisierungs-Untersuchungen

Nachdem die antimikrobielle Aktivität der DCD-abgeleiteten Peptide auf verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterien nachgewiesen werden konnte, wurde in einem weiteren Schritt untersucht, inwieweit diese DCD-Peptide die Bakterienmembran permeabilisieren können. Dazu wurden verschiedene biochemische Testsysteme verwendet, anhand derer die Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von *E. coli*

(Gram-negativ) als auch die Permeabilisierung von artifiziellen Phospholipiddoppelmembranen (siehe 3.3.2.2) untersucht werden konnte. Um die Morphologie der mit Peptid behandelten Bakterien und die Lokalisierung der Peptide an der Bakterienmembran analysieren zu können, wurden weiterhin mikroskopische Untersuchungen wie Elektronenmikroskopie und konfokale Lasermikroskopie durchgeführt (siehe 3.3.2.3). Außerdem wurde die Fähigkeit der Peptide zur Permeabilisierung der eukaryontischen Zellmembran von Erythrozyten überprüft (siehe 3.3.2.4).

3.3.2.1. Permeabilisierung der äußeren und inneren Bakterienmembran

Für die Permeabilitäts-Untersuchungen der äußeren und inneren Membran wurde der Bakterienstamm *E. coli* ML-35p (Lehrer *et al.*, 1988; Lehrer *et al.*, 1989) nach Inkubation mit DCD-abgeleiteten Peptiden analysiert. Dazu wurden Peptidkonzentrationen von 100µg/ml bzw. 200µg/ml gewählt, die eine deutliche antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* ML-35p aufwiesen (**Abb. 13 und Tab. 11**). So lag die IC₉₀ für das anionische DCD-1L bei 30µg/ml (~6µM) und für das kationische SSL-25 bei 9µg/ml (~4µM) gegenüber *E. coli* ML-35p.

Die Permeabilität der **äußeren Membran** wurde über die Messung der Aufnahme von N-Phenyl-N-Naphtylamin (NPN) in die hydrophobe Phospholipidschicht, wie von Helander und Mattila-Sandholm (2000) beschrieben, bestimmt (siehe 2.2.4.3.2). Dazu wurden *E. coli* ML-35p-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase in einem Puffer, der 10µM NPN enthielt, inkubiert und mit DCD-abgeleiteten Peptiden in einer Konzentration von 200µg/ml versehen. Eine Peptid-vermittelte NPN-Aufnahme in die intrazellulär gerichtete Phospholipidschicht der Außenmembran, die zu einem Anstieg des Fluoreszenz-Signals führt, wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 420nm (Anregung: 350nm) in einem Spektrofluorometer gemessen.

Die Außenmembran-Untersuchungen belegen (**Abb.15A**), dass in einer Konzentration von 200µg/ml kein DCD-Peptid (DCD-1L, LEK-45, SSL-29, SSL-25, SSL-23) eine deutliche Steigerung der NPN-Aufnahme gegenüber der Pufferkontrolle bewirkte. Dagegen zeigen die Daten von LL-37, dass schon nach einigen Minuten eine deutliche Aufnahme von NPN in die Außenmembran vermittelt wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass LL-37 die äußere Membran von *E. coli* ML-35p permeabilisiert.

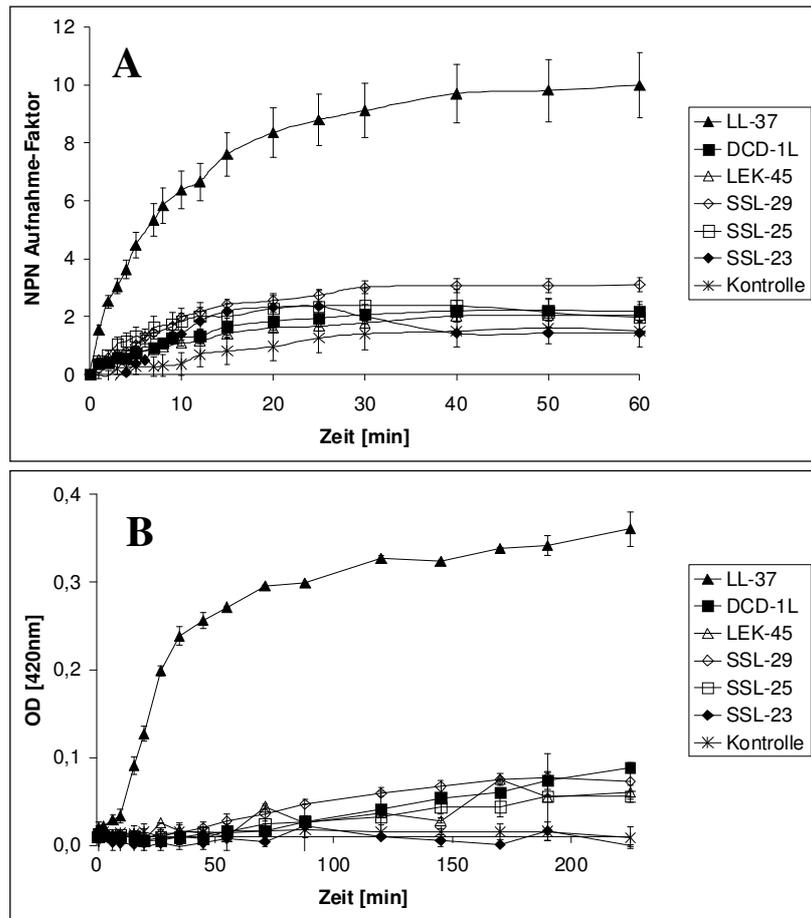


Abbildung 15: Untersuchungen zur Membranpermeabilisierung von *E. coli* ML-35p durch DCD-abgeleitete Peptide und LL-37

(A) Die Membranpermeabilisierung der äußeren Membran von *E. coli* ML-35p wurde anhand der NPN Aufnahme untersucht. Die *E. coli* Zellen wurden mit 10 μ M NPN in Anwesenheit verschiedener DCD-Peptide (200 μ g/ml) in 5mM Na-HEPES-Puffer (pH 7,4) inkubiert. Die erhöhte Aufnahme an NPN in die intrazellulär gerichtete hydrophobe Innenseite der Außenmembran bewirkt einen Anstieg der Fluoreszenz-Intensität (Anregung: 350nm, Emission: 460nm), welche ein Nachweis für die Permeabilisierung der äußeren Membran ist. Die gemessene Emission wurde als NPN-Aufnahme-Faktor in rel. Einheiten dargestellt und gegen die Zeit aufgetragen. Als Negativ-Kontrolle wurde Puffer mit NPN verwendet. (B) Die Membranpermeabilisierung der inneren Membran wurde durch die enzymatische Umsetzung des Substrates ONPG im Zytoplasma von *E. coli* ML-35p nach Zugabe der DCD-Peptide (100 μ g/ml) analysiert. Die Freisetzung des enzymatisch umgesetzten Substrates durch die zytoplasmatische β -Galaktosidase in ONP wurde photometrisch bei 420nm über einen Zeitraum von 3h bestimmt. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen mit ONPG ohne Peptid inkubiert.

Die Permeabilität der **inneren Membran** wurde über die enzymatische Umsetzung des Substrates σ -Nitrophenyl-3D-Galaktosid (ONPG) im Zytoplasma von *E. coli* ML-35p, wie unter Lehrer (Lehrer, R. I. et al. 1988) beschrieben, bestimmt (siehe 2.2.4.3.1). Dazu wurden *E. coli* Zellen in der stationären Wachstumsphase in Phosphatpuffer mit ONPG, das als Substrat für das zytoplasmatische Enzym β -Galaktosidase fungierte, verdünnt und mit DCD-abgeleiteten Peptide in einer Konzentration von 100 μ g/ml versehen. Zu bestimmten Zeitpunkten (0-220min) wurde die Aufnahme von ONPG in die Zellen über die

Messung des enzymatischen Spaltproduktes ONP bei einer optischen Dichte von 420nm bestimmt. Die Versuchsergebnisse sind in **Abb. 15B** dargestellt.

Die Daten zur Untersuchung der Permeabilisierung der inneren Membran verdeutlichen, dass die DCD-Peptide (DCD-1L, LEK-45, SSL-29, SSL-25, SSL-23) in einer antimikrobiellen Konzentration von 100µg/ml keine deutliche Zunahme des enzymatischen Spaltproduktes ONP gegenüber der Pufferkontrolle bewirkten. Im Gegensatz dazu zeigte das LL-37 schon in einer geringeren Konzentration von 10µg/ml (~2µM) einen deutlichen Anstieg des umgesetzten zytoplasmatischen Substrates. Somit scheinen die DCD-Peptide keine erkennbare Fähigkeit zur Permeabilisierung der inneren Bakterienmembran zu besitzen.

Diese Permeabilisierungs-Daten zeigen, dass im Gegensatz zu LL-37 sowohl anionische als auch kationische DCD-Peptide keine offensichtliche Permeabilisierung der inneren und äußeren Membran von *E. coli* ML-35p induzieren.

3.3.2.2. Carboxyfluorescein-Efflux aus artifiziellen Liposomen

In einem weiteren Testsystem wurde die DCD-Aktivität auf artifizielle Liposomen ermittelt, die in ihrem strukturellen Aufbau der zytoplasmatischen Bakterienmembran ähnlich sind. Liposomen bilden eine bimolekulare Phospholipiddoppelschicht aus, in der die Kohlenwasserstoffschwänze innen und die Phosphorsäureköpfe außen liegen. Als Maß für die Fähigkeit von DCD, Löcher bzw. Poren in die Liposomenmembran zu induzieren oder diese zu destabilisieren, wurden Messungen des Carboxyfluorescein (CF)-Efflux aus großen unilamellaren Liposomen durchgeführt. Die Liposomen wurden, wie unter 2.2.4.3.3 beschrieben, mit CF beladen und aufgereinigt. Es wurden Liposomen mit unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen verwendet, um ladungsspezifische Interaktionen mit der Membran untersuchen zu können. Dazu wurden die Liposomen DOPC und DOPC:DOPG (1:1 molares Verhältnis) verwendet (siehe 2.1.1), die entweder zu einer neutralen Nettoladung (DOPC) oder zu einer negativen Ladung (DOPC:DOPG) der Liposomen-Oberfläche führen. Die Liposomen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (1-10µM) von DCD-abgeleiteten Peptiden inkubiert und der Anstieg der Fluoreszenz als Maß für die Fähigkeit der Peptide die Liposomenmembran zu destabilisieren in einem Fluoreszenz-Spektrophotometer bei 515nm (Anregung: 492nm) gemessen. Dabei wurde der DCD-induzierte CF-Austritt aus den Liposomen zu der Menge, die nach Zerstörung der Liposomen mit 20% Triton X-100 auftritt, in Bezug gesetzt.

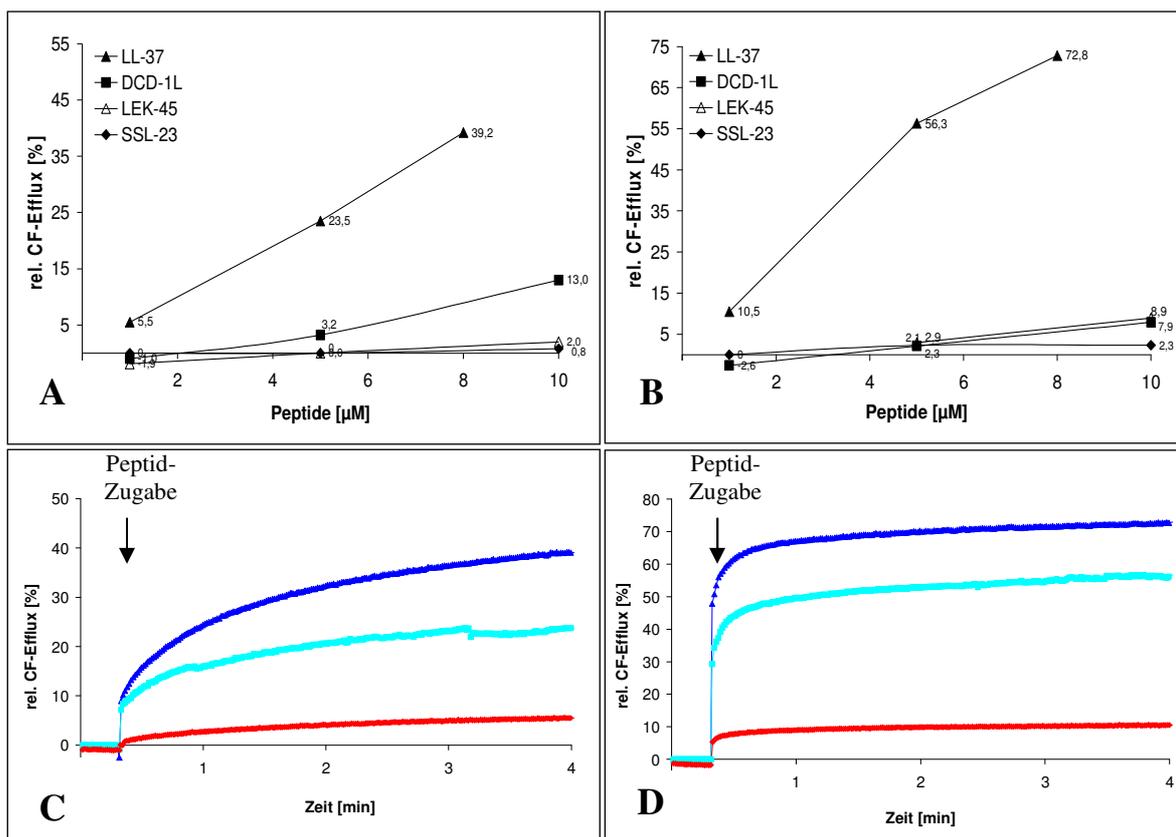


Abbildung 16: Effekte DCD-abgeleiteter Peptide und LL-37 auf die Permeabilisierung von artifiziellen Liposomen

Die CF-beladenen Liposomen (25µM) mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung aus DOPC (A, C) oder DOPC/DOPG (1:1 molares Verhältnis) (B, D) wurden mit verschiedenen Peptidkonzentrationen (1-10µM) versetzt und der induzierte Ausfluss des CF über 4min aufgezeichnet. Der Anstieg der Fluoreszenz-Intensität wurde bei einer Wellenlänge von 515nm (Anregung: 492nm) bei 20°C gemessen. Der Peptid induzierte CF-Ausfluss wurde relativ zu dem absoluten CF- Ausfluss nach Lyse der Vesikel durch Zugabe von Triton X-100 angegeben. In (A) und (B) wird der rel. CF- Ausfluss der Peptide DCD-1L, LEK-45, SSL-23 und LL-37 für verschiedene Konzentrationen nach 4min gezeigt. In (C) und (D) wird der zeitliche konzentrationsabhängige Verlauf (♦) 1µM, (■) 5µM, (▲) 8µM von LL-37 über einen Zeitraum von 4min dargestellt. Die Peptidzugabe erfolgte nach ca. 20 Sekunden.

Aus den Abbildungen 16A/B wird ersichtlich, dass unabhängig von der Liposomenzusammensetzungen (DOPC, neutrale Nettoladung; DOPC:DOPG, molares 1:1 Verhältnis, 50% negativ geladene Phospholipide) die DCD-abgeleiteten Peptide nur einen geringen Austritt des fluoreszenten Farbstoffes innerhalb der ersten 4min verursachten (<13%). Messungen des CF-Signals über einen längeren Zeitraum von 10min zeigten keine signifikanten Steigerung (Daten nicht gezeigt). Das Kontroll-Peptid DPI bewirkte bei beiden Liposomen-Zusammensetzungen einen CF-Efflux von höchstens 2%. Dagegen interagierte LL-37 innerhalb der ersten Minute (Abb. 16C/D) konzentrationsabhängig (1-8µM) mit den Liposomen, so dass ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz mit zunehmender Konzentration zu messen war. Auffällig ist, dass für LL-37 ein deutlich größerer Anstieg

des CF-Signals (73%) bei der Verwendung von DOPC:DOPG (50% negativ geladene Phospholipide) als bei neutral geladenen DOPC-Liposomen (39%) zu verzeichnen ist.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die DCD-abgeleiteten Peptide offensichtlich nicht in der Lage sind, die verschiedenen Phospholipiddoppelschichten aus DOPC und DOPG zu permeabilisieren. Dagegen permeabilisiert das kationische Peptid LL-37 in Abhängigkeit von der Ladung der Liposomen die Phospholipiddoppelschicht.

3.3.2.3. Elektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von DCD-Peptid-behandelten Bakterien

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass DCD-abgeleitete Peptide im Vergleich zu LL-37 keine Fähigkeit zur Permeabilisierung der Bakterienmembranen besitzen. Daher sollte weiterhin untersucht werden, in welcher Weise sich die Morphologie des Bakteriums nach Behandlung mit DCD-Peptiden verändert, und ob DCD-Peptide an der Bakterienmembran oder im Zytoplasma lokalisiert sind. Dazu wurde zunächst die Änderung der Morphologie von Peptid-behandelten Bakterien im Elektronenmikroskop untersucht. Als Kontroll-Peptide wurden α -Defensine (HNP-1/2) verwendet, von denen bekannt ist, dass diese Poren in der Bakterienmembran induzieren können (Lehrer, R. I. et al. 1989; Selsted, M. E. und Ouellette, A. J. 2005). Für die Untersuchung wurde *S. aureus* (MSSA) für 4h mit 100 μ g/ml DCD-1 Peptid und SSL-23 inkubiert und nach Fixierung und Einbettung die Zellen über Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht (siehe 2.2.5). In **Abb. 17** wird gezeigt, dass sowohl das kationische (SSL-23) als auch das anionische DCD-Peptid (DCD-1) keinen erkennbaren Schaden an der Bakterienmembran von *S. aureus* verursachen, vielmehr scheint sich die Zelle von Innen her aufzulösen. Die α -Defensine (HNP-1/2) bewirkten an der Bakterienzelle dagegen Membranausstülpungen, aus denen eine Membranaktivität der Peptide gefolgert werden kann. Die Puffer-Kontrolle zeigte unter den gewählten Bedingungen keine morphologischen Veränderungen.

Weiterhin wurde mit Hilfe der Immun-EM überprüft, ob das DCD-1 Peptid an die Außenmembran von *S. aureus* bindet oder im Bakterieninneren zu finden ist. Die Detektion von DCD-1 erfolgte über den polyklonalen anti-DCD-Antikörper (siehe 2.1.3), welcher durch einen Gold-gekoppelten Sekundär-Antikörper (ZAK-Gold-IgG) im Elektronenmikroskop (Zeiss 109) sichtbar gemacht wurde. Die Immun-EM in **Abb.17** zeigt, daß DCD-1 in Clustern an die Bakterienmembran bindet, aber nicht im Zytoplasma nachzuweisen ist.

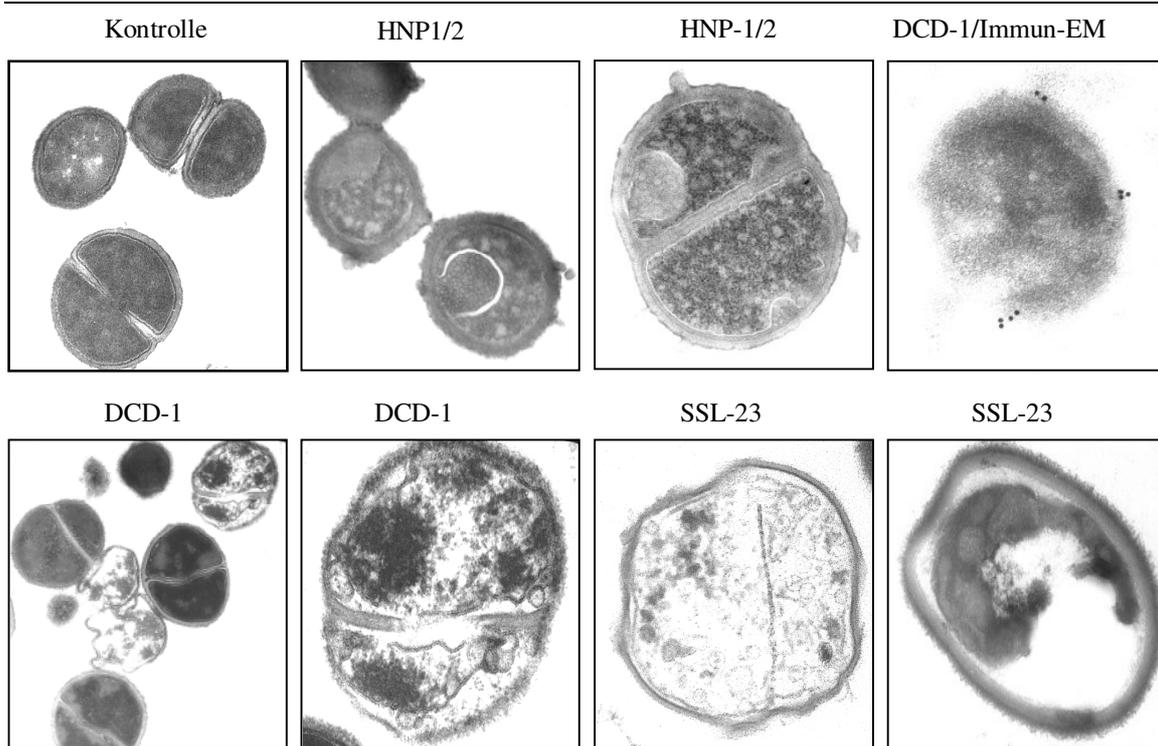


Abbildung 17.: Elektronenmikroskopischer Querschnitt von methicillin-sensitiven *S. aureus* nach Behandlung mit verschiedenen AMPs

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Immun-EM (IEM) von *S. aureus*-Zellen (MSSA), welche entweder mit DCD-1, SSL-23 oder mit α -Defensinen HNP-1/2 - als Positiv-Kontrolle für Membranaktivität - behandelt wurden. Dazu wurden die Bakterien jeweils mit einer Konzentration von $100\mu\text{g/ml}$ Peptid für 4h in 10mM NAPB bei 37°C inkubiert und anschließend fixiert. Für die IEM wurde der polyklonalen DCD-Antikörper (anti-DCD-1L) verwendet, welcher wiederum durch einen Gold-gekoppelten Antikörper (ZAK-Gold-IgG) am Elektronenmikroskop (Zeiss 109) sichtbar gemacht wurde.

Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse sollten mit einem einfacheren und schnelleren Nachweisverfahren bestätigt werden. Dazu wurden die Peptide DCD-1L und SSL-23 an dem N-terminalen Ende mit einem Fluorophor (FITC) markiert (siehe 2.2.1.2) und in einer Konzentration von $2\mu\text{M}$ mit *E. coli*-Zellen für 2h im Dunkeln in 10mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) bei 37°C inkubiert. Die inkubierten Zellen wurden auf Objektträger fixiert (siehe 2.2.5.2) und die Fluoreszenz der Peptide an einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Die Aufnahmen in **Abb. 18** zeigen, dass die DCD-Peptide an der gesamten Bakterienmembran binden. Allerdings ergab die Kontrolle, die aus der Inkubation der Bakterien mit FITC-Molekülen ($2\mu\text{M}$) ohne Peptid bestand, das gleiche Erscheinungsbild. Somit konnte keine Aussage über das Bindungsverhalten des kationischen SSL-23 oder des anionischen DCD-1L für diesen Versuch gemacht werden.

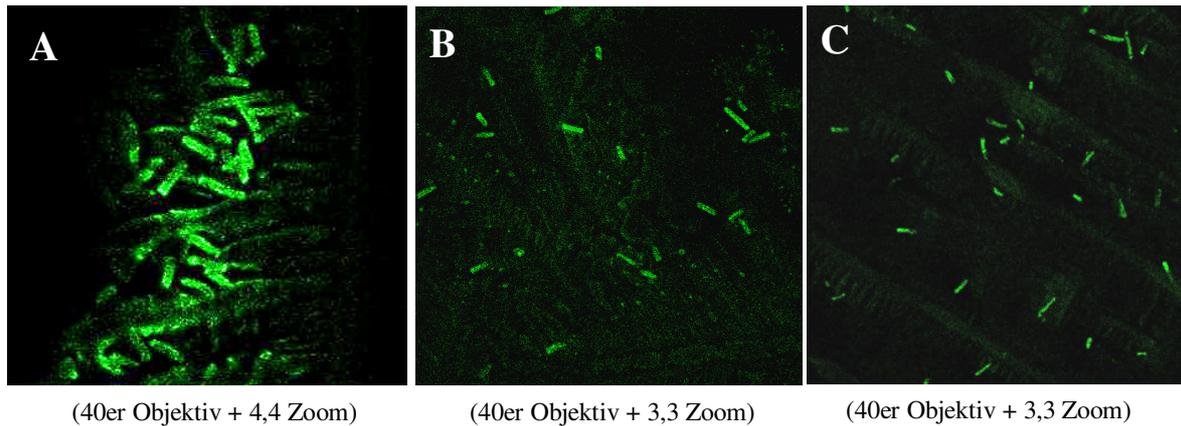


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *E. coli* Zellen nach Behandlung mit den Peptiden DCD-1L und SSL-23

E. coli Zellen wurden mit FITC-markiertem DCD-1L (A) und SSL-23 (B) in einer Konzentration von $2\mu\text{M}$ für 2h bei 37°C in 10mM NAPB (pH 7,0) inkubiert und anschließend auf Objektträger fixiert. Als Kontrolle (C) wurden die Bakterien mit chemisch inaktiven FITC-Molekülen ($2\mu\text{M}$) inkubiert. Die Aufnahmen wurden an einem konfokalen Lasermikroskop mit einem 40er Objektiv durchgeführt.

3.3.2.4. Permeabilisierung der Zellmembran von Erythrozyten

Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von DCD-Peptiden auf eukaryontische Zellen wurde der Hämolysetest nach Helmerhorst (Helmerhorst, E. J. et al. 1999) durchgeführt. Bei diesem Test wird die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten als Maß für die membranlysierenden Wirkung der Testsubstanzen herangezogen. Für die Untersuchung der hämolytischen Aktivität bzw. der membranlysierenden Wirkung wurden die DCD-abgeleiteten Peptide in einer Konzentration von $100\mu\text{g/ml}$, bei der eine antimikrobielle Aktivität bestätigt worden war, mit frisch isolierten humanen Erythrozyten für 1h bei 37°C inkubiert (Tab. 13). Das freigesetzte Hämoglobin wurde photometrisch bei 541nm gemessen. Für die Auswertung des Hämolysetests wurde der Hämolyse-Wert des jeweiligen Peptids prozentual mit dem Wert der totalen Hämolyse (100%) durch Wasser in Bezug gesetzt.

Die Ergebnisse des Hämolysetests zeigen, dass in den Konzentrationen von $0,1-100\mu\text{g/ml}$ die DCD-Peptide DCD-1L, DCD-1, LEK-45, SSL-29, SSL-25 und SSL-23 keine Hämolyse der Erythrozyten hervorrufen (Tab. 13). Auch konnte für DCD-1L in einer höheren Konzentration von $200\mu\text{g/ml}$ keine Hämolyse nachgewiesen werden. Das LL-37 bewirkte in der Konzentration von $100\mu\text{g/ml}$ eine geringfügige Lyse der Erythrozyten von 2,5%. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die DCD-abgeleiteten Peptide keine Hämolyse bzw. Permeabilisierung von Erythrozyten bis zu einer Konzentration von $200\mu\text{g/ml}$ bewirkten.

Tabelle 13: Ergebnisse der hämolytischen Aktivitäts-Untersuchungen von DCD-abgeleiteten Peptiden und LL-37

Frisch isolierte Erythrozyten (5×10^8) wurden in 1xPBS (pH 7,4) mit verschiedenen Peptidkonzentrationen (0,1-200 $\mu\text{g/ml}$) 1h bei 37°C inkubiert und das freigesetzte Hämoglobin als Maß für die membranlysierende Wirkung der Peptide bei 541nm gemessen. Der Wert der totalen Hämolyse mit Wasser wurde als 100%-Wert gesetzt und gegen die Werte der Peptide verrechnet. Alle Messungen erfolgten in dreifacher Ausführung.

Peptide	Hämolyse [%]					
	[$\mu\text{g/ml}$]	0,1	1	10	100	200
DCD-1L		0 \pm 0,01	0 \pm 0,0	0 \pm 0,0	0 \pm 0,02	0 \pm 0,0
DCD-1		0 \pm 0,0	0 \pm 0,33	0 \pm 0,12	0 \pm 0,02	n.b.*
LEK-45		0,4 \pm 1,2	0,7 \pm 0,9	0 \pm 0,24	0 \pm 0,12	n.b.*
SSL-29		0 \pm 0,0	0 \pm 0,3	0 \pm 0,0	0,17 \pm 1,4	n.b.*
SSL-25		0 \pm 0,0	0 \pm 0,5	0 \pm 0,06	0 \pm 0,6	n.b.*
SSL-23		0 \pm 0,01	0 \pm 0,01	0 \pm 0,0	0 \pm 0,01	n.b.*
LL-37		0,2 \pm 0,0	0 \pm 0,01	0,7 \pm 0,02	2,5 \pm 0,08	n.b.*

* n.b.: nicht bestimmt

3.4. Untersuchungen zur Strukturaufklärung

Es ist bislang noch unklar, welche Struktur die DCD-Peptide für die antimikrobielle Aktivität einnehmen müssen. Mit Hilfe des Programmes HMMSTR (*hidden markov model for local sequence-structure correlations in proteins*) wurde eine mögliche Tertiärstruktur für DCD-1L erstellt, um vorhandene Sekundärstrukturelemente den Aminosäuresequenzabschnitten zuordnen zu können. Des Weiteren wurde anhand von computerunterstützten Programmen untersucht, ob die C-terminal abgeleiteten Peptide einen amphipathischen Charakter besitzen und in welchen Aminosäuresequenzabschnitten sich die hydrophilen sowie hydrophoben Bereiche befinden. Weiterhin wurden die DCD-Peptide mit Hilfe des Circular dichroismus (CD) auf das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen untersucht. Dabei wurde analysiert, welchen Einfluss verschiedene Parameter wie Salzkonzentration, Natriumphosphatpuffer, Lösungsmittel TFE und verschiedene Liposomen auf die Struktur von DCD-Peptiden haben.

3.4.1. Struktur-Vorhersage von DCD-1L

Um Hinweise auf die Struktur von DCD-1L zu erhalten, wurde zunächst eine Tertiärstruktur-Vorhersage mit Hilfe von HMMSTR, einem computerunterstützten Internetprogramm, durchgeführt (**Abb. 19**). Dieses Programm berechnet die dreidimensionale Molekülstruktur mit Hilfe von standardisierten Bindungslängen und Bindungswinkeln, die

im sog. Energieminimum eingenommen werden. Abweichungen von diesen Standardwerten durch sterische Molekül-Wechselwirkungen sowie Wechselwirkungen mit dem umgebenden Lösungsmittel werden von diesem Programm nicht berücksichtigt.

Die Vorhersage der Tertiärstruktur von DCD-1L veranschaulicht (**Abb. 19A**), dass insgesamt 4 helikale Anteile (Helix¹: 2-5, Helix²: 8-14, Helix³: 18-27, Helix⁴: 34-48) vorhanden sind, die durch Turns unterbrochen werden. Ein ausgeprägtes Helix-Turn-Helix (HTH)-Motiv liegt im Bereich von 18-48 AS (Helix³: 18-27, Turn: 28-33, Helix⁴: 34-48). Das HTH-Motiv ist dafür bekannt, dass es als DNA-Bindungsmotiv in vielen Regulatorproteinen vorkommt (Harrison, S. C. und Aggarwal, A. K. 1990). Außerdem weist die räumliche Struktur von DCD-1L (**Abb. 19B**) ein ausgeprägtes Dipolmoment auf. Dieses elektrische Dipolmoment ist in der Physik ein Maß für die räumliche Ladungstrennung. Hat in einem Protein ein Molekül an unterschiedlichen Orten eine elektrische Ladung unterschiedlichen Vorzeichens, besitzt dieses Protein ein elektrisches Dipolmoment.

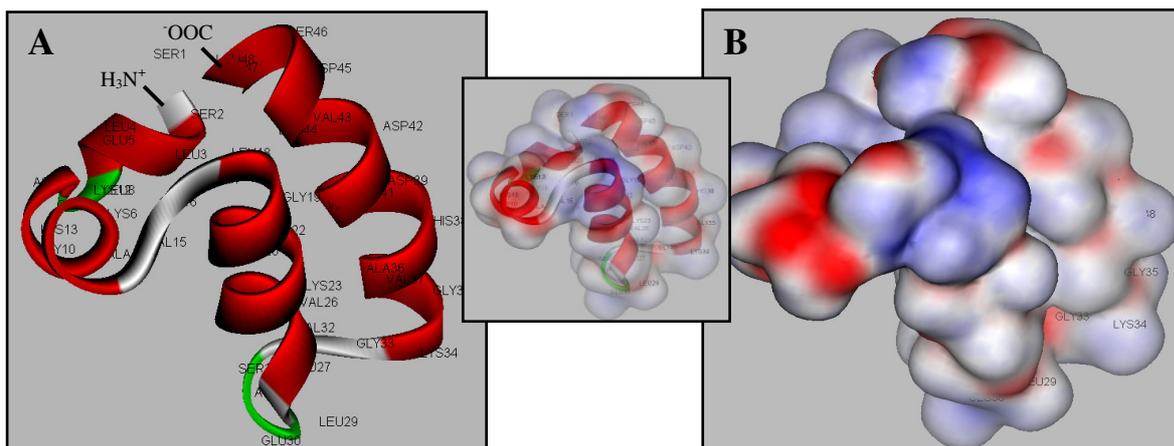


Abbildung 19: Vorhersage der Tertiärstruktur und der elektrischen Ladungsverteilung von DCD-1L

Die 3D-Struktur wurde mit Hilfe von HMMSTR (*hidden markov model for local sequence-structure correlations in proteins*) erstellt und mit dem Visualisierungsprogramm MolMol (www.mol.biol.ethz.ch/wuthrich/software/molmol) bearbeitet. (A) Die „Band-Darstellung“ zeigt den Verlauf der Polypeptidkette, welche vier α -Helices (rot; Helix¹: 2-5, Helix²: 8-14, Helix³: 18-27, Helix⁴: 34-48) ausbildet. Im Bereich von 18-48 AS befindet sich ein Helix-Turn-Helix-Motiv (Helix³: 18-27, Turn: 28-33, Helix⁴: 34-48). (B) Oberflächenstruktur mit räumlicher Ladungsverteilung entgegengesetzten Vorzeichens (negativ; positiv).

Um zu untersuchen, ob DCD-1L amphipatische Struktureigenschaften besitzt, wurde die Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms ANTHEPROT 2000 release5 untersucht (**Abb. 20**). Durch dieses Programm werden die Aminosäuren in einer α -Helix als sog. „Helixrad“ angeordnet. In dieser Projektion werden die hydrophilen Anteile rot und die hydrophoben Anteile blau dargestellt. Zeigt die Projektion eine klare Trennung der Helix in eine hydrophile und eine hydrophobe Seite, liegt eine amphipatische Struktur-

eigenschaft vor. Aus **Abb. 20** ist deutlich erkennbar, dass DCD-1L einen ausgeprägten α -helikalen amphipatischen Charakter über die gesamte Länge von 48 Aminosäuren aufweist. Eine Besonderheit des DCD-1L Peptids zeigt sich in der Aminosäuresequenz, die nur neun verschiedene Aminosäuren beinhaltet (Alanin (4 mal), Aspartat (6 mal), Glutamat (3 mal), Glycin (8 mal), Histidin (1 mal), Leucin (8 mal), Lysin (7 mal), Serin (4 mal), Valin (7 mal)). Es sind keine Cysteine vorhanden, die eine Disulfidbrücke wie bei den Defensinen ausbilden könnten, sowie keine aromatischen Aminosäuren oder Prolin.

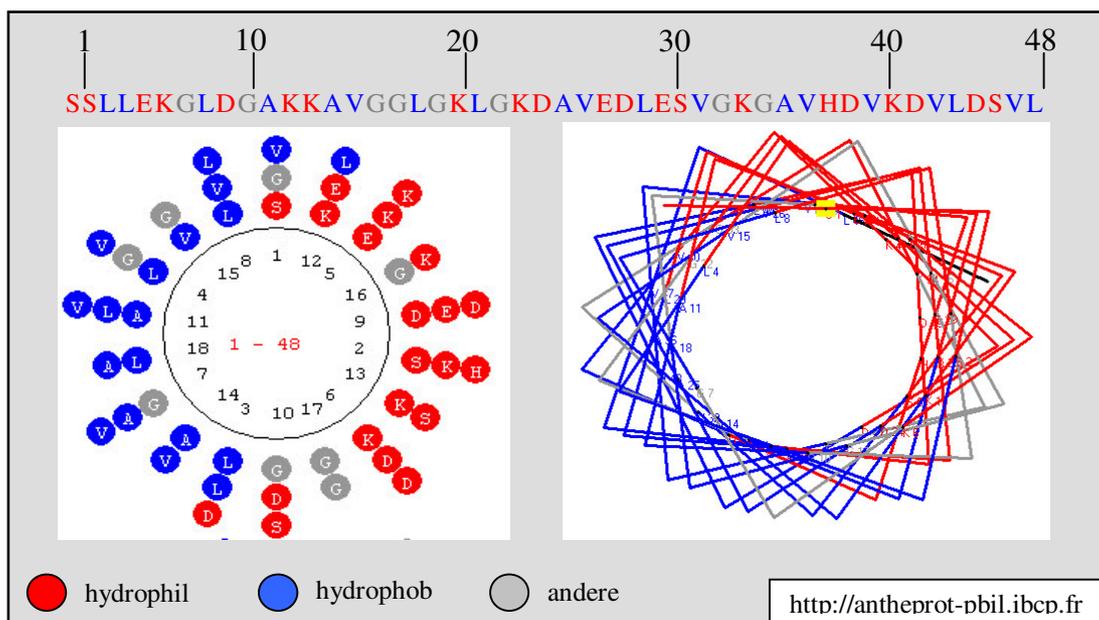


Abbildung 20: Schematische Projektionen der amphipathischen α -Helix von DCD-1L

Die Darstellung wurde mit Hilfe des Visualisierungsprogramms ANTHEPROT 2000 release5 erstellt (<http://antheptot-pbil.ibcp.fr>). Die amphipathische Helix zeichnet sich dadurch aus, dass deren eine Seite hydrophil (rot) und deren andere Seite hydrophob (blau) ist.

Weiterhin wurde in **Abb. 21** die Hydrophilizität des nicht prozessierten DCD-Proteins (110AS) mit Signalpeptid (AS-Position: 1-19AS) dargestellt. Bemerkenswert ist, dass die C-terminal prozessierten Peptide (AS-Position 63-110) einen amphipathischen Charakter, d.h. ein Wechsel zwischen hydrophilen und hydrophoben Bereichen aufweisen, hingegen die N-terminal abgeleiteten DCD-Peptide (AS-Positionen: 20-62) wie PIF, YDP-42 und Y-P30 (siehe Einleitung) ausschließlich einen hydrophilen Charakter besitzen.

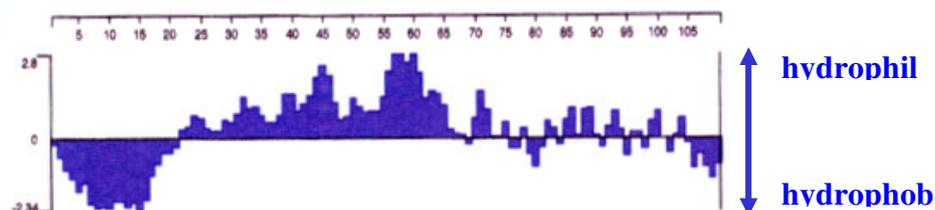


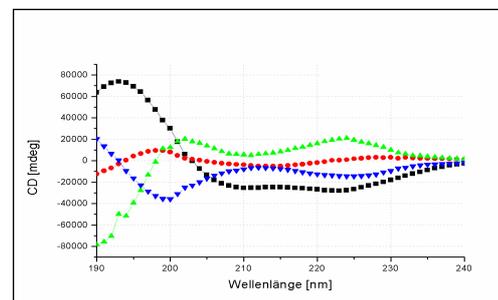
Abbildung 21: Hydrophilizität des volle-Länge Peptids DCD nach Kyte-Doolittle

3.4.2. CD-Spektroskopie

Mit Hilfe von Circular Dichroismus (CD)-Messungen wurde untersucht, ob die DCD-abgeleiteten Peptide Sekundärstrukturelemente wie α -Helix, β -Faltblatt, Turn und Zufallsknäuel aufweisen. Die CD-Spektren α -helikaler Peptide beispielsweise zeigen charakteristische UV-Spektren mit einem doppelten Minimum bei 222nm und 208nm sowie einem Maximum bei 190nm. Die β -Faltblatt Struktur weist ein Maximum bei 195nm und ein zugehörige Minimum bei 217nm auf. (Manning, M. C. und Woody, R. W. 1987; Woody, R. W. 1995). Die Zufallsknäuel-Struktur zeigt ein Minimum bei 195nm und die Turn-Struktur ein Minimum bei 190nm und ein Maximum bei 208nm. Anhand von Vergleichsspektren für α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel-Strukturen (**Abb. 22**) wurden die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen im Peptid berechnet. Für die Berechnung der Sekundärstrukturanteile wurde das Programm „Jasco Sekundär Struktur Software“ verwendet. Die Berechnungen können nur als mögliche Annäherung an die eigentliche Struktur verstanden werden, sie liefern keinerlei Hinweise auf die genaue Lage der jeweiligen Sekundärstrukturanteile.

Abbildung 22: CD- Vergleichsspektren

Diese CD-Vergleichsspektren wurden für die Berechnung der prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen im Peptid herangezogen. Die Berechnung erfolgte über die „Jasco Sekundär Struktur Software“. Strukturen: α -Helix (■), β -Faltblatt (●), Turn (▲), Zufallsknäuel (▼)



Für die Struktur-Untersuchungen wurden die Peptide DCD-1L, LEK-45, SSL-29, SSL-25 und SSL-23 mit verschiedenen Lösungsmitteln (H_2O , TFE, NAPB, NAPB/NaCl) versetzt und die CD-Spektren über einen Wellenlängen-Bereich von 180-260nm aufgenommen. Weiterhin wurde für die Peptide untersucht, ob sich bestimmte Sekundärstruktur-Elemente durch Zugabe von Liposomen induzieren lassen können. Ziel dieser Untersuchungen war es, die strukturellen Eigenschaften der DCD-Peptide zu analysieren.

3.4.2.1. Lösungsmittel induzierte α -helikale Konformationsänderung

Um zu untersuchen, ob DCD-Peptide in Lösungsmitteln eine α -helikale Konformation einnehmen, wurde jeweils zu 50 μ M Peptidlösung steigende Trifluorethanol (TFE)-Konzentrationen (0-80%, v/v) zugesetzt (**Abb. 23**). Die Ergebnisse der beobachteten induzierten Konformationsänderung wurden in **Tab. 14** zusammengestellt.

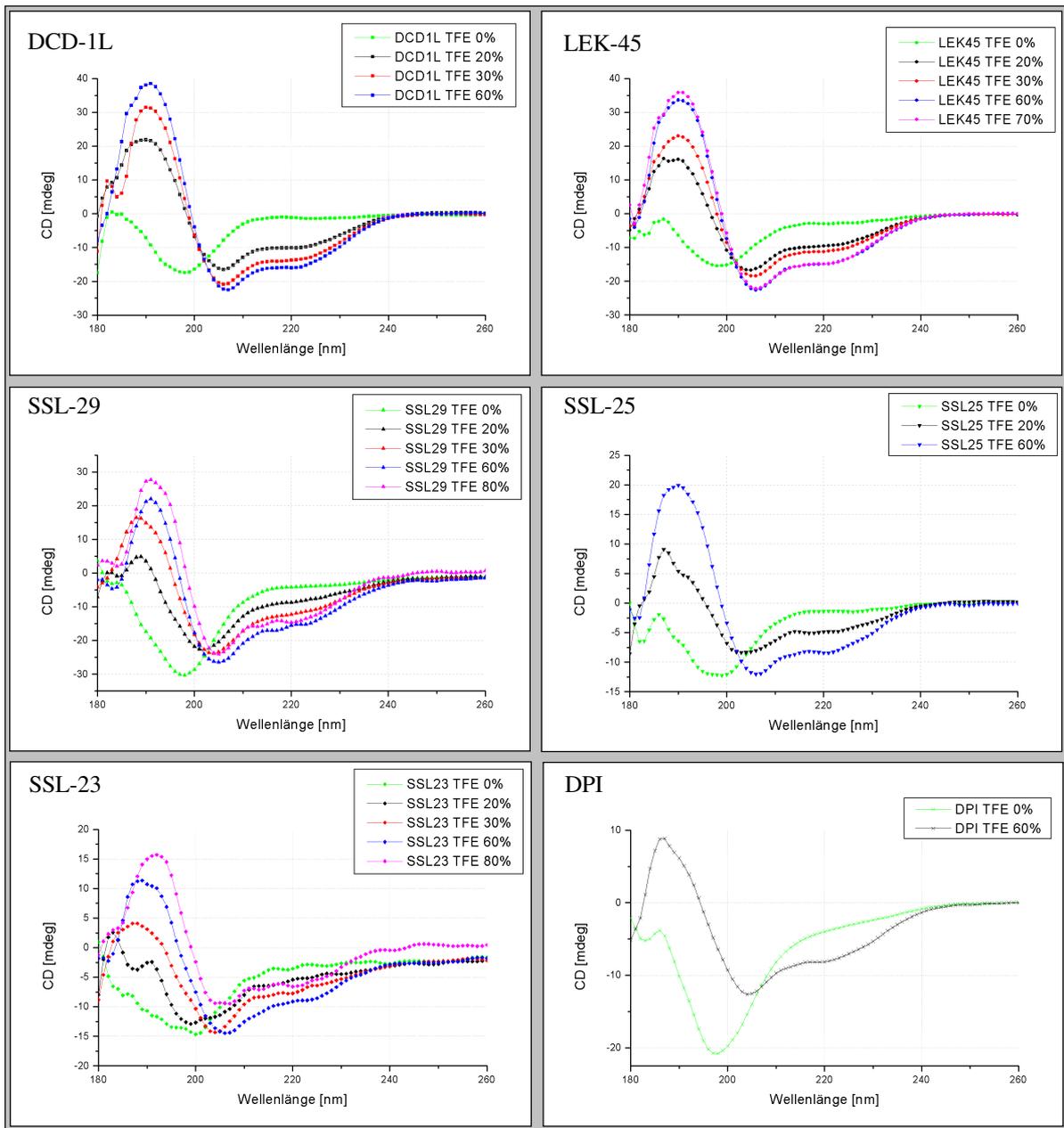
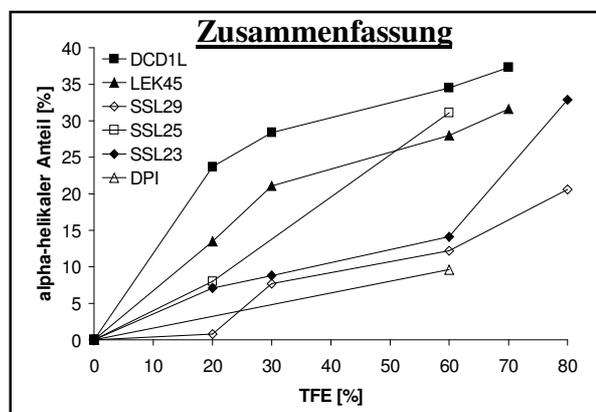


Abbildung 23: Ergebnisse der CD-Messungen von DCD-abgeleiteten Peptiden im Lösungsmittel TFE

Die Peptide DCD-1L, LEK-45, SSL-29, SSL-25, SSL-23 und DPI wurden mit verschiedenen TFE-Konzentrationen in dH₂O (0-80%, v/v) versetzt und die CD-Spektren innerhalb der ersten 5min aufgenommen. Die Ergebnisse der Lösungsmittel-induzierten Konformationsänderung der Peptide wurden zusammengefasst und graphisch dargestellt. Die Auswertung der α -helikalen Anteile [%] erfolgte durch die „Jasco Sekundär-Struktur-Software“



Die Strukturuntersuchungen (**Abb. 23**) zeigen, dass alle DCD-Peptide im helix-induzierenden Lösungsmittel Trifluorethanol eine α -Helix ausbilden können. Dagegen zeigen die Peptide in Wasser (dH₂O) keinen α -helikalen Anteil und liegen hauptsächlich in einer Zufallsknäuel-Struktur vor.

Weiterhin wird aus **Tab. 14** deutlich, dass die N- und C-terminal verkürzten DCD-Peptide prozentual unterschiedliche α -helikale Anteile in Anwesenheit von 60% TFE aufweisen. So zeigt DCD-1L einen α -helikalen Anteil von 35%, LEK-45 von 28%, SSL-29 von 12%, SSL-25 von 31% und SSL-23 von 14% an den Sekundärstrukturelementen. Das Peptid DPI, welches als Negativ-Kontrolle für die antimikrobiellen Tests verwendet wurde, weist in 60% TFE den geringsten α -helikalen Anteil von 9,6% auf.

Tabelle 14: Zusammenfassung der TFE induzierten Sekundärstrukturänderung von DCD-abgeleiteten Peptiden

Die Peptide DCD-1L, LEK-45, SSL-29, SSL-25, SSL-23 und DPI wurden mit verschiedenen TFE-Konzentrationen in dH₂O (0-80%, v/v) versetzt und die CD-Spektren innerhalb der ersten 5min aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch die „Jasco Sekundär-Struktur-Software“.

Peptide	Solvent	Sekundärstruktur [%]			
		α -Helix	β -Faltblatt	Turn	Zufallsknäuel
DCD-1L	dH ₂ O	0,0	28,8	16,4	54,9
	20% TFE	23,7	34,3	0,0	42,0
	30% TFE	28,4	31,2	0,0	40,3
	60% TFE	34,5	27,2	0,0	38,3
LEK-45	dH ₂ O	0,0	30,3	16,1	53,6
	20% TFE	13,5	42,4	0,0	44,1
	30% TFE	21,1	36,5	0,0	42,3
	60% TFE	28,0	31,0	0,0	41,0
SSL-29	dH ₂ O	0,0	24,3	20,3	55,4
	20% TFE	0,8	49,4	2,5	47,3
	30% TFE	7,7	48,2	0,0	44,6
	60% TFE	12,2	46,2	0,0	41,7
SSL-25	dH ₂ O	0,0	22,3	20,7	57,0
	20% TFE	8,0	49,0	0,0	43,0
	60% TFE	31,1	27,1	0,0	41,8
SSL-23	dH ₂ O	0,0	38,2	14,8	47,0
	20% TFE	7,1	26,8	15,8	50,3
	30% TFE	8,8	39,5	8,3	43,5
	60% TFE	14,1	40,8	4,9	49,2
	80% TFE	32,9	27,6	0,0	39,5
DPI	dH ₂ O	0,0	34,3	15,4	50,3
	60% TFE	9,6	42,0	6,0	42,5

3.4.2.2. Einfluß der Salzkonzentration auf die Sekundärstruktur von DCD-1L und LEK-45

Mit Hilfe der antimikrobiellen Tests konnte nachgewiesen werden, dass DCD-1L ein breites antimikrobielles Wirkspektrum im Gegensatz zum antimikrobiell inaktiven LEK-45 aufweist. Um zu überprüfen, ob ein struktureller Unterschied zwischen diesen beiden Peptiden vorhanden ist, wurde unter den im antimikrobiellen Test herrschenden Pufferbedingungen (10mM NAPB/10mM NaCl, pH 7,0) CD-Messungen durchgeführt und zusätzlich den Einfluß von steigenden Salzkonzentrationen (0-150mM NaCl) auf die Peptid-Konformation analysiert (**Abb. 24**).

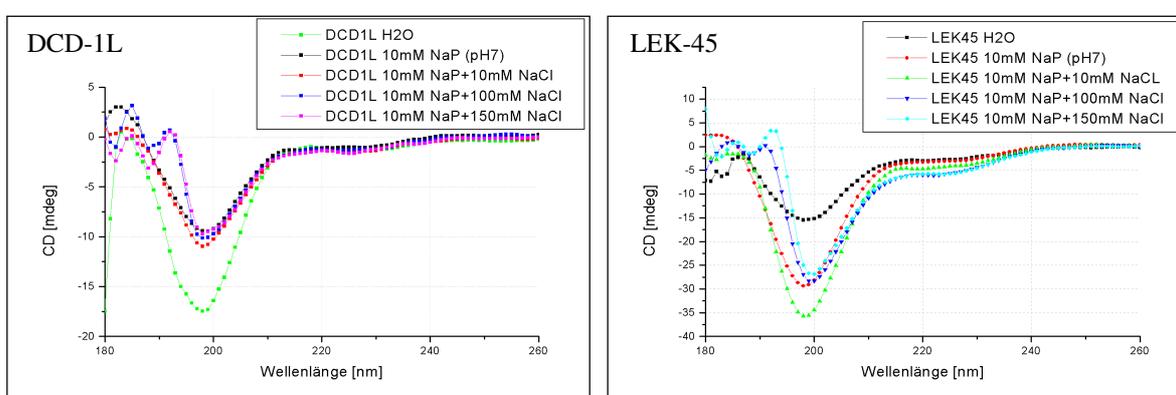


Abbildung 24: CD-Messungen der Peptide DCD-1L und LEK-45 in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen

Die Peptide DCD-1L und LEK-45 wurden in einer Konzentration von 50 μ M sowohl in H₂O als auch in 10mM NAPB (pH 7,0) mit steigenden NaCl-Konzentrationen (0-150mM) gelöst und das CD-Spektrum aufgenommen.

Aus **Abb. 24** und **Tab. 15** wird ersichtlich, dass die Peptide DCD-1L und LEK-45 in wässrigen Lösungen wie dH₂O und 10mM NAPB keine α -helikalen Anteile besitzen und zu 50-62% als Zufallsknäuel vorliegen. Steigende NaCl-Konzentrationen bewirken keine Induzierung einer erkennbaren Konformationsänderung. Desweiteren sind keine strukturellen Unterschiede zwischen dem antimikrobiell wirksamen DCD-1L und dem antimikrobiell inaktiven LEK-45 sichtbar.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Sekundärstrukturen von DCD-1L und LEK-45 in Abhängigkeit steigender Salzkonzentrationen

Die Peptide wurden in einer Konzentration von 50 μ M sowohl in H₂O als auch in 10mM NAPB (pH 7,0) mit steigenden NaCl-Konzentrationen (0-150mM) gelöst, das CD-Spektrum aufgenommen und die Auswertung über die Jasco Sekundär-Struktur-Software vorgenommen.

Peptide	Solvent	Sekundärstruktur [%]			
		α -Helix	β -Faltblatt	Turn	Zufallsknäuel
DCD-1L	dH ₂ O	0,0	28,8	16,4	54,9
	10mM NaP (pH 7,0)	0,0	17,5	20,5	62,0
	10mM NaP/10mM NaCl	0,0	19,1	19,4	61,4
	10mM NaP/100mM NaCl	0,0	21,8	0,0	78,2
	10mM NaP/150mM NaCl	0,0	32,1	0,0	67,9
LEK-45	dH ₂ O	0,0	30,3	16,1	53,6
	10mM NaP (pH 7,0)	0,0	13,6	21,2	62,2
	10mM NaP/10mM NaCl	0,0	17,0	19,5	63,5
	10mM NaP/100mM NaCl	0,0	41,8	0,0	58,2
	10mM NaP/150mM NaCl	0,0	41,5	0,0	58,5

3.4.2.3. Intermolekulare Wechselwirkungen mit artifiziellen Liposomen

In weiteren Untersuchungen sollte getestet werden, welche Struktur DCD-Peptide nach Kontakt mit der Bakterienmembran einnehmen. Dazu wurden artifizielle Phospholipide hergestellt, die den Kontakt mit der Bakterienmembran simulieren sollen. Die Induzierung einer α -Helix durch den Kontakt mit verschiedenen Phospholipiden wurde schon für das Cathelicidin LL-37 nachgewiesen (Turner, J. et al. 1998). Somit sollten diese Versuche Aufschluss darüber geben, welchen Einfluß die Phospholipide auf die Struktur von DCD-Peptiden haben.

Für diesen Versuch wurden, wie auch für den CF-Efflux-Versuch (siehe 3.3.2.2), zwei verschiedene Liposomenzusammensetzungen (DOPC und DOPC:DOPG 1:1 molares Verhältnis) gewählt, welche sich im Anteil der negativ geladenen Phospholipide unterscheiden. Die Herstellung der Liposomen erfolgte in 10mM NAPB (pH 7,0). Für die CD-Messungen wurden die Peptide DCD-1L, SSL-23, DPI und LL-37 in einer Konzentration von 50 μ M in 10mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) verwendet und die dosisabhängige Wirkung der Liposomen auf die Peptid-Konformation untersucht. Die Meßdaten zum Einfluß von DOPC:DOPG (1:1) Liposomen auf die Peptidkonformation wurden in **Abb. 25** dargestellt. In **Tab. 16** wurden die prozentualen Sekundärstrukturanteile zusammengefaßt.

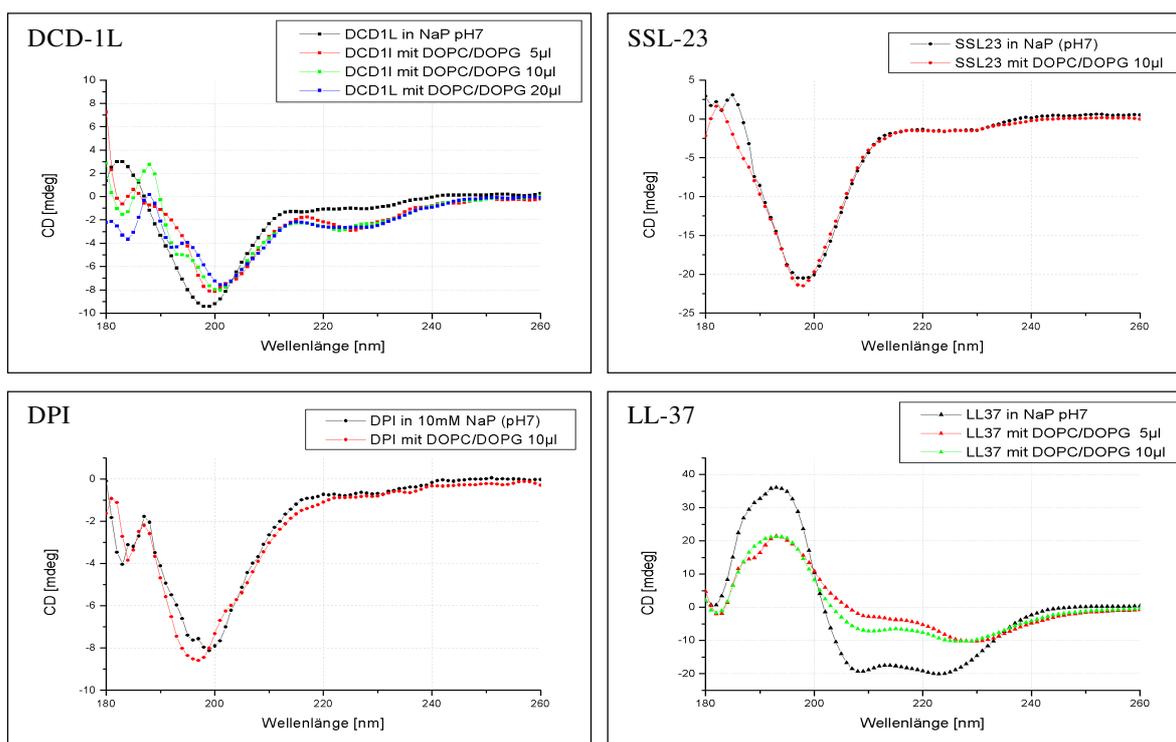


Abbildung 25: Einfluß der DOPC/DOPG-Liposomen auf die Peptidstruktur

Die Peptide (50 µM) DCD-1L, SSL-23, LL-37 und DPI wurden in 10mM NADP (pH 7,0) mit zunehmenden Mengen an Liposomen (DOPC/DOPG 1:1) versetzt und die CD-Spektren innerhalb der ersten 5 Minuten aufgenommen.

Aus den Meßdaten in **Abb. 25** und **Tab. 16** wird deutlich, dass keine Konformationsänderung der Peptide DCD1-L und SSL-23 durch die Liposomen DOPC:DOPG (1:1) induziert wurde. Auch für das Peptid DPI erfolgte keine Änderung der Sekundärstruktur. Die untersuchten DCD-Peptide weisen ausschließlich eine ausgeprägte ungeordnete Struktur (Zufallsknäuel) sowohl in 10mM NAPB als auch in Anwesenheit der Liposomen auf. Im Gegensatz dazu (**Tab. 16**, **Abb. 25**) konnte für LL-37 der α -helikale Anteil von 50% auf ca. 80% durch die Zugabe der Liposomen erhöht werden. Dies weist darauf hin, dass die Liposomen DOPC:DOPG, welche einen Anteil von 50% negativ geladener Phospholipide besitzen, einen Einfluß auf die Struktur von LL-37 nehmen. Hingegen gibt es keinen Einfluß der Liposomen auf die Struktur der DCD-Peptide.

Um auszuschließen, dass eine zeitverzögerte Konformationsänderung für die DCD-Peptide DCD-1L und SSL-23 durch die Liposomen DOPC:DOPG (1:1) stattfindet, wurden die CD-Spektren über einen Zeitraum von bis zu 2h aufgenommen (**Abb. 26**).

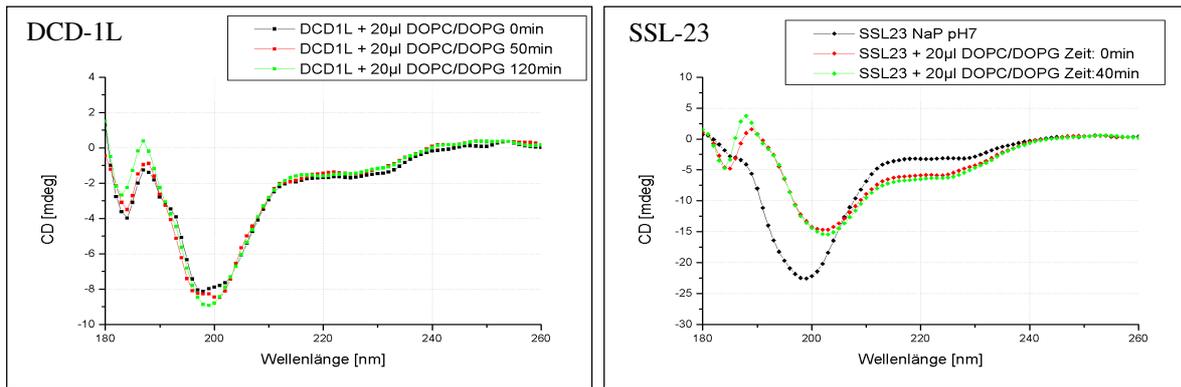


Abbildung 26: Zeitabhängiger Einfluß der DOPC/DOPG-Liposomen auf die Peptidstruktur

Die Peptide (50µM) DCD-1L und SSL-23 wurden in 10mM NAPD (pH 7,0) mit Liposomen (DOPC/DOPG) versetzt und das jeweilige CD-Spektrum über einen Zeitraum von bis zu 120min verfolgt.

Die Meßdaten aus **Abb. 26** und **Tab. 16** zeigen, dass keine zeitabhängige Strukturänderung für DCD-1L und SSL-23 in Anwesenheit der Liposomen erfolgt. Für das kationische Peptid SSL-23 ist eine geringfügige Änderung des α -helikalen Anteils von 1,3% auf 2,2% über die Zeit von 40min nachzuweisen.

Ferner wurden die CD-Spektren für die Peptide DCD-1L, SSL-23 und LL-37 in Anwesenheit von ungeladenen DOPC Liposomen aufgenommen und in **Abb. 27** dargestellt. In **Tab. 16** wurden die Diagrammdata schließlich in Form von prozentualen Sekundärstrukturanteilen ausgewertet.

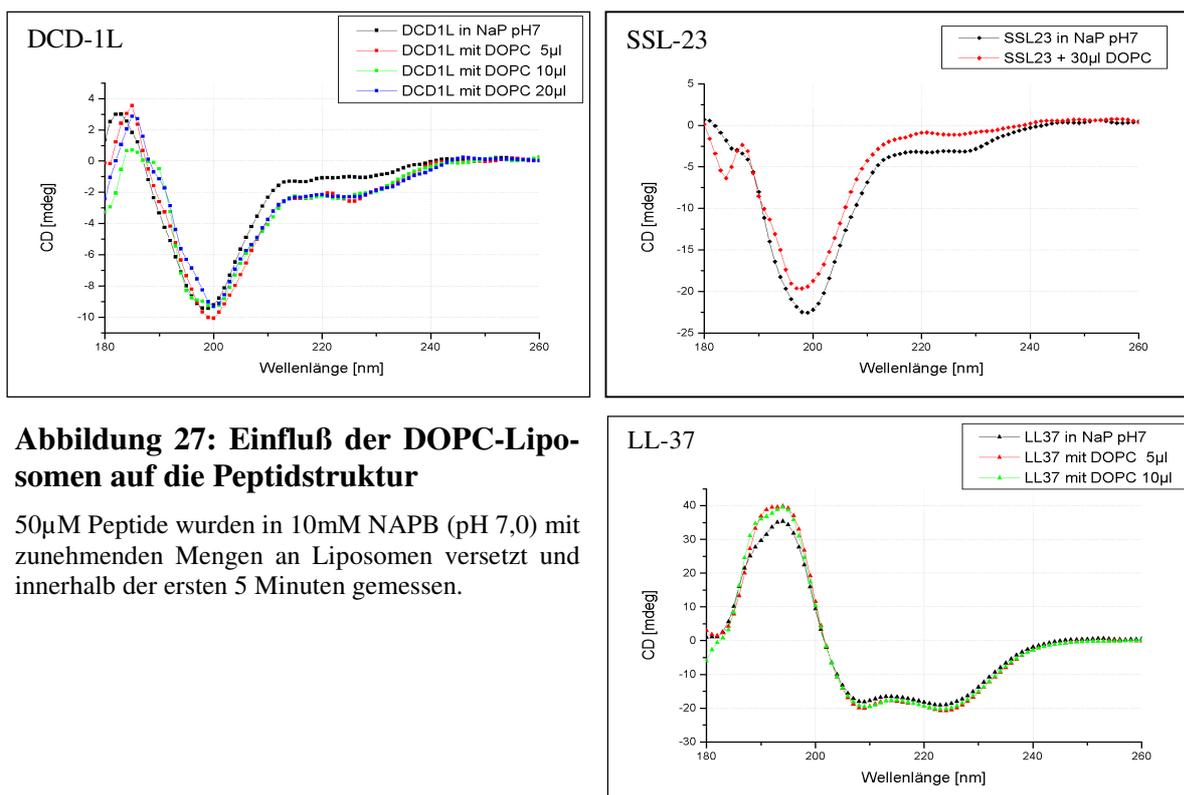


Abbildung 27: Einfluß der DOPC-Liposomen auf die Peptidstruktur

50µM Peptide wurden in 10mM NAPB (pH 7,0) mit zunehmenden Mengen an Liposomen versetzt und innerhalb der ersten 5 Minuten gemessen.

In **Abb. 27** zeigen die CD-Messungen mit ungeladenen Liposomen (DOPC) sowohl für die DCD-Peptide DCD-1L und SSL-23 als auch für LL-37 keine deutlichen Effekte in Form einer Sekundärstrukturänderung. Die DCD-Peptide liegen vorwiegend (55-65%) in NAPB als Zufallsknäuel vor. Hingegen nimmt das LL-37 in NAPB eine α -helikale Sekundärstruktur von 50% an. Somit nehmen die ungeladenen Liposomen keinen Einfluß auf die Struktur von den DCD-Peptiden und von LL-37.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Sekundärstrukturen der intermolekularen Wechselwirkung von DCD-1L, SSL-23, LL-37 und DPI mit artifiziellen Liposomen

50 μ M Peptide wurden in 10mM NAPD (pH 7,0) mit Liposomen versetzt und das jeweilige CD-Spektrum über einen Zeitraum von bis zu 120min verfolgt. Die Auswertung erfolgte über die Jasco Sekundär-Struktur-Software.

Peptide	Solvent	Sekundärstruktur [%]			
		α -Helix	β -Faltblatt	Turn	Zufallsknäuel
DCD-1L	10mM NAPB	0,0	17,5	20,5	62,0
	DOPC	0,0	35,2	9,8	55,0
	Zeit: 0min DOPC/DOPG	0,0	32,5	12,9	54,6
	Zeit: 50min DOPC/DOPG	0,0	27,8	15,4	56,8
	Zeit: 120min DOPC/DOPG	0,0	26,2	15,0	58,8
SSL-23	10mM NAPB	0,0	23,8	18,4	57,7
	DOPC	0,0	13,7	21,5	64,8
	Zeit: 0min DOPC/DPOG	1,3	50,2	2,9	45,6
	Zeit: 40min DOPC/DPOG	2,2	49,2	3,8	44,8
	LL-37	10mM NAPB	50,9	6,0	16,6
DOPC		54,1	6,4	14,0	25,5
DOPC/DOPG		80,2	0,0	8,7	11,0
DPI	10mM NAPB	0,0	25,8	19,4	54,8
	DOPC/DOPG	0,0	29,7	19,1	51,2

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass keine Strukturänderung des anionischen DCD-1L und des kationischen SSL-23 durch die unterschiedlichen Liposomenzusammensetzungen (DOPC und DOPG/DOPC) induziert wurde. Hingegen wurde für das kationische LL-37 eine Erhöhung des α -helikalen Anteils durch den Zusatz von Liposomen (DOPC/DOPG), die aus 50% negativ geladener Phospholipide zusammengesetzt sind, gemessen. Dies deutet auf eine ladungsspezifische Wechselwirkung des kationischen LL-37 mit den negativ geladenen Phospholipiden hin.

3.5. Intra- und inter- molekulare DCD-Peptid Wechselwirkungen

Bisherige Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die DCD-Peptide entweder mit sich selber oligomerisieren oder/und mit anderen im Schweiß vorkommenden Proteinen assoziieren können. So wurden anhand von Western Blot Analysen von nativem Schweiß und von synthetisch hergestellten DCD-Peptiden Banden mit unterschiedlichen Molekulargewichten detektiert.

Ziel der folgenden Untersuchungen war es aufzuklären, ob es sich möglicherweise um eine Oligomerisierung der DCD-Peptide oder/und um eine Assoziierung mit anderen im Schweiß vorkommenden Proteinen handelt.

3.5.1. Oligomerisierung

Erste Hinweise auf eine Oligomerisierung von DCD-Peptiden zeigten sich bei Western Blot Analysen von nativem Schweiß und von synthetisch hergestellten DCD-Peptiden (**Abb. 28**). Die Antikörper, die für die Western Blot Analysen verwendet wurden, richten sich gegen den C-Terminus des DCD-1L Peptids. Daher werden C-terminal verkürzte DCD-Peptide, wie das SSL-23 oder das SSL-29, nicht von den Antikörpern erkannt (**Abb.28B**). Die Molekulargewichte der synthetisch hergestellten Peptide sind 4,8kDa für DCD-1L, 4,7kDa für DCD-1, 4,5kDa für LEK-45, 2,9kDa für SSL-29 und 2,3kDa für SSL-23.

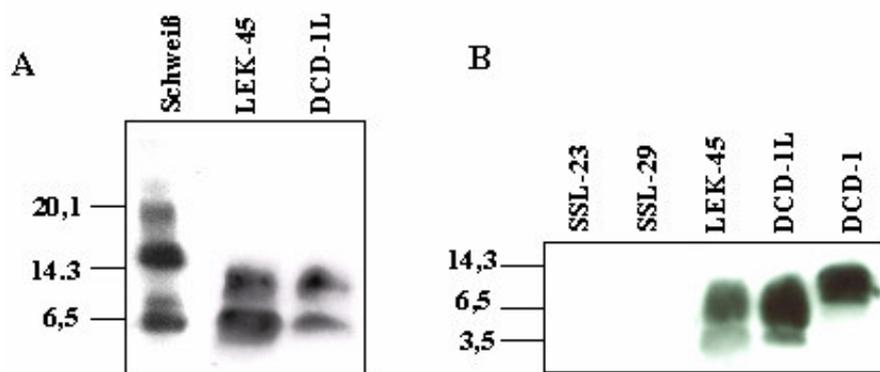


Abbildung 28: Nachweis von DCD-Oligomeren mittels Western Blot Analyse

(A) Synthetische Peptide LEK-45, DCD-1L (je 4 μ g) und 15 μ l menschlicher ekkriner Schweiß wurden unter reduzierenden Bedingungen (β -Mercaptoethanol) über ein 15%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Western Blot Analyse mit einem polyklonalen DCD-Antikörper (anti-DCD-1L) durchgeführt (B) Synthetische Peptide DCD-1L, DCD-1, LEK-45, SSL-29 und SSL-23 (je 4 μ g) wurden zuvor über ein 15%-iges Polyacrylamidgel unter reduzierenden u. denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und die Western Blot Analyse mit einem monoklonalen DCD-Antikörper (G-81) durchgeführt. Als Größenmarker [kDa] wurde der Rainbow-Marker RPN755 (Amersham, Freiburg) verwendet.

Die Western Blot Analyse in **Abb. 28** zeigt, dass sich SDS-stabile Oligomere bei den synthetisch hergestellten DCD-Peptiden DCD-1L, DCD-1 und LEK-45 ausbilden können. Sowohl über einen polyklonalen (anti-DCD-1L) als auch über einen monoklonalen (G-81) DCD-Antikörper ließen sich Banden mit einem Molekulargewicht, das einem Homodimer entsprechen würde, detektieren. Für die Peptide DCD-1L und LEK-45 wurden sowohl Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 5kDa (Monomer) und von ca. 10kDa (Dimer) detektiert. Das synthetische DCD-1 weist in **Abb. 28B** nur eine Bande auf, die ein deutlich höheres Molekulargewicht zeigt als die zu erwartenden 4,7kDa als Monomer.

Weiterhin wird in **Abb. 28A** gezeigt, dass im menschlichen ekkrinen Schweiß vier Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von etwa 5, 8, 15 und 20kDa mit einem polyklonalen Antikörper (anti-DCD-1L) detektiert wurden. Diese Proteinbanden könnten sowohl DCD-Oligomere als auch Komplexe mit anderen im Schweiß vorkommenden Proteinen sein.

Um weitere Hinweise zum Oligomerisierungsverhalten von DCD-1L zu erhalten, wurde das Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen (10-200µg/ml) in verschiedenen Puffern (salzhaltiger PBS-Puffer, basischer 1,5M Tris-Base Puffer, denaturierender 5M Harnstoff) über einen Zeitraum von 20h bei 4°C inkubiert und über eine Western Blot Analyse detektiert. Das Ergebnis dieser Analyse wird in **Abb. 29** gezeigt.

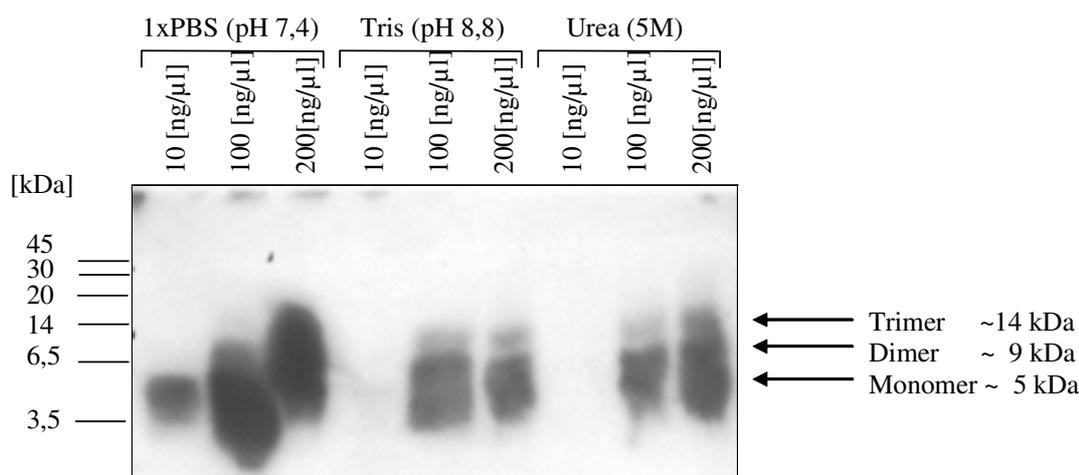


Abbildung 29: Oligomerisierung von DCD-1L in verschiedenen Puffern

DCD-1L wurde in verschiedenen Konzentrationen (10, 100, 200µg/ml) in verschiedenen Puffern (1,5M Tris-Base pH 8,8; 5M Harnstoff (Urea); 1xPBS pH 7,4) für 20h bei 4°C inkubiert und insgesamt für die Konzentration von 10µg/ml DCD-1L 200ng und für die restlichen 800ng Peptid auf ein 18%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Western Blot Analyse erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper (G-81) in der Verdünnung 1:4000 in 10%igem Magermilchpulver. Als Größenmarker [kDa] wurde der Rainbow-Marker RPN755 (Amersham, Freiburg) verwendet.

Aus der Western Blot Analyse in **Abb. 29** ist zu entnehmen, dass DCD-1L unter den verschiedenen Pufferbedingungen (1xPBS, (pH 7,4), 1,5M Tris-Base (pH 8,8), 5M Harnstoff) Oligomere (Dimere, Trimere) ausbildet. So wurden nach Inkubation von DCD-1L in 1xPBS (pH 7,4) mit zunehmender Peptid-Konzentration Banden mit einem Molekulargewicht detektiert, welche einem Homodimer oder einem Homotrimer entsprechen würden. Auch in den anderen Puffern, wie 1,5M Tris-Base (pH 8,8) und 5M Harnstoff (Urea), zeigten sich Banden mit größeren Molekulargewichten, die einem Homodimer oder Homotrimer entsprechen würden.

In einem weiteren Schritt wurde die Fähigkeit der DCD-Peptide überprüft, in Lösung Oligomere bzw. Aggregate zu bilden. Dazu wurde die von Ziv Oren (1999) beschriebene Methode verwendet. Das Prinzip dieser Meßmethode beruht darauf, dass ein Zusammenlagern bzw. eine Aggregation der Peptide eine Abnahme der zu messenden Fluoreszenz-Intensität (sog. Fluoreszenzlöschung) bewirkt. Somit ist das Ausmaß einer Aggregation von Peptiden um so größer je mehr die gemessene Fluoreszenz-Intensität abnimmt. Mit dieser Methode kann nur das unspezifische Zusammenlagern bzw. die Aggregation von Peptiden festgestellt werden, eine Aussage über die Ausbildung von stabilen Oligomeren ist in diesem Zusammenhang nicht möglich.

Für die Untersuchungsmethode wurden die Peptide DCD-1L (anionisch), SSL-23 (kationisch) und LL-37 mit einem Fluorophor (FITC) N-terminal markiert (siehe 2.2.1.2), um über die extrinsische Fluoreszenzlöschung (*Quenching*) den Nachweis für eine Peptid-Aggregation zu erbringen (siehe 2.2.4.2). Eine intrinsische Fluoreszenzspektroskopie war nicht möglich, da die Aminosäuresequenz der DCD-Peptide keine aromatischen Aminosäuren, wie das Tryptophan beinhaltet. Da für LL-37 die Fähigkeit zur Aggregation und zur Oligomerisierung nachgewiesen werden konnte (Oren, Z. et al. 1999), wurde es als Kontroll-Peptid für die folgenden Aggregationsuntersuchungen verwendet.

Zunächst wurde getestet, ob die FITC-markierten Peptide DCD-1L und LL-37 unter den gewählten Pufferbedingungen eine Fluoreszenz-Intensitäts-Abnahme über die Zeit aufweisen. Dazu wurden die Peptide in verschiedenen Konzentrationen (0-0,25 μ M) über einen Zeitraum von mindestens 2h bei RT in 1xPBS (pH 7,4) inkubiert und zeitgleich die extrinsische Fluoreszenz-Intensität bei einer Wellenlänge von 535nm (Anregung: 485nm) gemessen. Das Ergebnis wurde in **Abb. 30** als Diagramm dargestellt, wobei die relative Fluoreszenz-Intensität gegen die Peptidkonzentration [μ M] aufgetragen wurde.

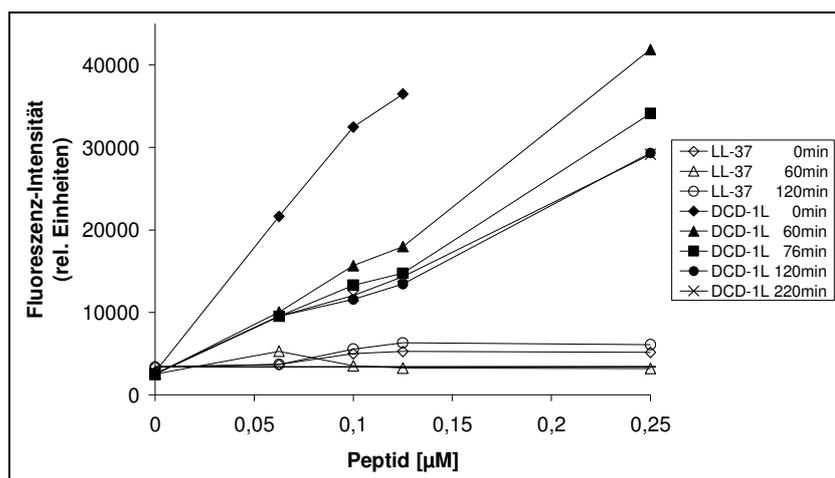


Abbildung 30: Untersuchungen zur zeitabhängigen Fluoreszenz-Abnahme von FITC-markierten Peptiden (DCD-1L und LL-37)

Die N-terminal FITC-markierten Peptide LL-37 und DCD-1L wurden für verschiedene Konzentrationen (0,01-0,25µM) in 1xPBS (pH 7,4) über einen Zeitraum von bis zu 220 Minuten bei RT inkubiert und die extrinsische Fluoreszenz-Intensität bei einer Wellenlänge von 535nm (Anregung: 485nm) gemessen. Die Fluoreszenz-Abnahme ist ein Maß für die Aggregations-Tendenz eines Peptids.

Aus **Abb. 30** wird deutlich, dass mit zunehmender Konzentration an DCD-1L die rel. Fluoreszenz-Intensität ansteigt, wohingegen für LL-37 keine Zunahme der rel. Fluoreszenz mit steigender Peptidkonzentration zu sehen ist. Außerdem zeigt DCD-1L eine Abnahme der rel. Fluoreszenz-Intensität über einen Zeitraum von 2h im Gegensatz zu LL-37 (**Abb. 30**). Eine weitere Abnahme der rel. Fluoreszenz-Intensität von DCD-1L nach 2h ist nicht zu erkennen. Somit scheint DCD-1L unter diesen Pufferbedingungen innerhalb der ersten 2h zeitabhängig zu aggregieren. Die Daten von LL-37 zeigen keine zeitabhängige Abnahme der rel. Fluoreszenz über einen Zeitraum von 2h. Dies weist darauf hin, dass LL-37 schon am Anfang der Messung im aggregierten Zustand vorlag.

Um schließlich zu klären, ob es sich um eine zeitabhängige Aggregation von DCD-1L und eine zeitunabhängige Aggregation von LL-37 handelte, wurden die Peptide unter den gleichen Bedingungen für verschiedene Zeiten (0-2h) bei RT in einer Konzentration von 0,25µM vorinkubiert und schließlich die Peptid-Aggregate durch Zugabe von Proteinase K aufgelöst.

Zur methodischen Überprüfung des Proteinase K Verdau wurden exemplarisch 1µM FITC-markiertes DCD-1L Peptid vor und nach dem dreistündigen Verdau auf eine Superdex 75-Säule (HR10/30) gegeben und sowohl bei einer Wellenlänge von 214nm die Absorption des Peptids als auch die Emission von dem Fluorophor FITC bei 540nm (Anregung: 490nm) gemessen (**Abb. 31**).

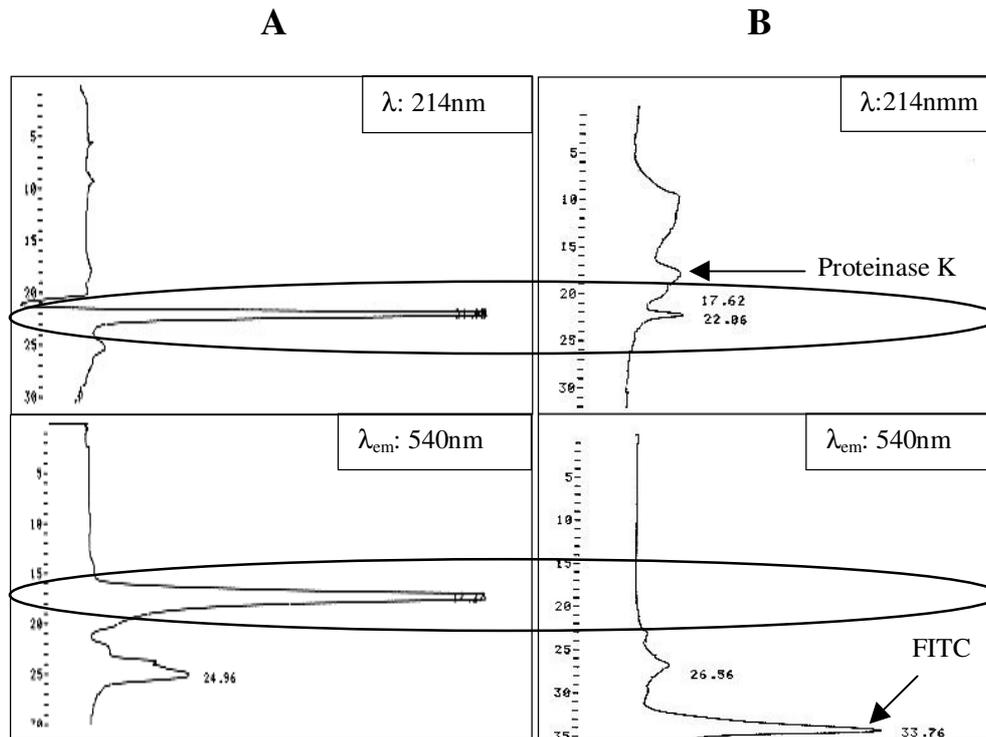


Abbildung 31: Methodische Überprüfung des enzymatischen Proteinase K Verdaus über FPLC

Der FPLC-Lauf wurde mit $1\mu\text{M}$ FITC-markiertem DCD-1L vor Zugabe von Proteinase K (A) und nach 3h Verdau mit Proteinase K (B) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte über eine Superdex 75 (HR10/30) Säule in 100mM Na-P Puffer (pH.7,4) mit einer Flussrate von $0,8\text{ml/min}$. Die Detektion der Peptide wurde bei einer Wellenlänge von 214nm (UV-Detektor) und die des Fluorophors bei 540nm (Anregung: 490nm) durchgeführt.

Aus der Überprüfung des Proteinase K Verdaus durch FPLC geht hervor (Abb. 31), dass in einer Peptidkonzentration von $1\mu\text{M}$ der Proteinase K Verdau nach einer Zeit von 3h vollständig war. Das markierte Peptid konnte nach dem dreistündigen Verdau nicht mehr bei einer Wellenlänge von 214nm nachgewiesen werden. Weiterhin war das Fluorophor FITC nicht mehr am Peptid gebunden und lag somit frei vor.

In diesem Versuch bewirkt die Zugabe von Proteinase K ein Freisetzen des Fluoreszenzfarbstoffes FITC und damit einen Anstieg der rel. Fluoreszenz-Intensität (*De-Quenching*). Für die Auswertung der Versuche wurden die Werte der Fluoreszenz-Intensität vor Zugabe von Proteinase K prozentual in Bezug zu den Werten nach 3h Proteinase K Verdau genommen. Der Wert nach 3h Proteinase K Verdau wurde für die Berechnungen als 100%-Wert gesetzt.

In Abb. 32 sind die prozentualen Fluoreszenz-Intensitäten aufgeführt, die vor der Zugabe von Proteinase K gemessen wurden. Je niedriger dieser Wert ist, desto größer das Ausmaß der Aggregation.

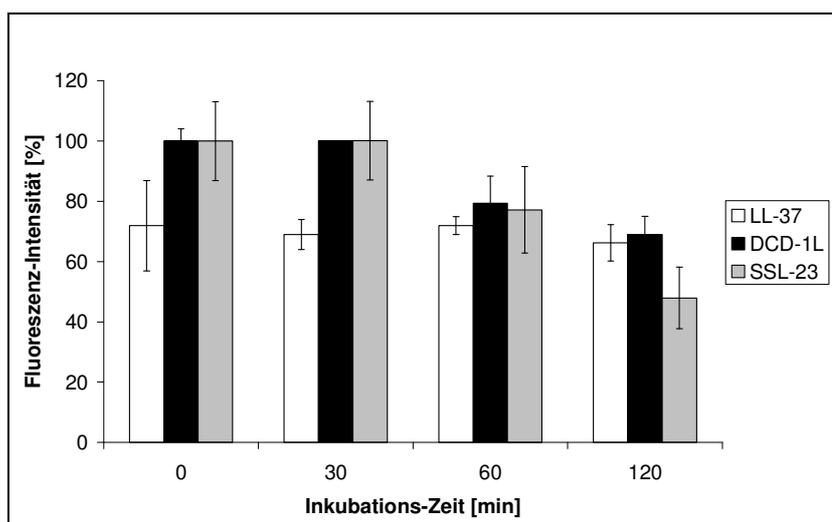


Abbildung 32: Analyse der zeitabhängigen Aggregation von Peptiden

Die N-terminal FITC-markierten Peptide LL-37, DCD-1L und SSL-23 wurden in einer Konzentration von $0,25\mu\text{M}$ für verschiedene Zeiten (0-120min) bei RT in 1xPBS (pH 7,4) vorinkubiert. Durch Zugabe von Proteinase K ($50\mu\text{g/ml}$) wurden die Aggregate aufgelöst, was zu einem Anstieg der rel. Fluoreszenz-Intensität führte. Für die Auswertung der Versuche wurden die Werte der Fluoreszenz-Intensität vor Zugabe von Proteinase K prozentual in Bezug zu den Werten nach 3h Proteinase K Verdau genommen. Die Fluoreszenz-Intensität der freiliegenden FITC-Moleküle nach 3h Proteinase K-Verdau wurde als 100%-Wert gesetzt. In der Abb. sind die prozentualen Fluoreszenz-Werte aufgeführt, die vor dem Auflösen der Aggregation durch Prot. K gemessen wurden. Alle Messungen (Anregung: 485nm Emission: 535nm) erfolgten in dreifacher Ausführung.

Die DCD-Peptide DCD-1L (anionisch) und SSL-23 (kationisch) zeigen ein zeitabhängiges Aggregationsverhalten (**Abb. 32**). So liegen die Peptide in den ersten 30min noch nicht aggregiert vor und aggregieren erst nach 60min Inkubation bei RT. Im Gegensatz zu den beiden DCD-Peptiden scheint LL-37 zeitunabhängig zu aggregieren. LL-37 liegt von Beginn der Messung an als Aggregat vor und zeigt im Ausmaß der Aggregation keine Veränderung über die Zeit von 2 Stunden. Diese Ergebnisse bestätigen somit die Vermutung aus dem vorherigen Versuch (**Abb. 30**).

Nachdem für die Peptide DCD-1L und SSL-23 eine zeitabhängige Aggregation innerhalb der ersten 2h festgestellt werden konnte (**Abb. 32/30**), wurde in einem weiteren Schritt das konzentrationsabhängige Aggregationsverhalten der Peptide untersucht (siehe 2.2.4.2). Dazu wurden die FITC-markierten Peptide LL-37, DCD-1L und SSL-23 in verschiedenen Konzentrationen ($0,0625\text{-}0,5\mu\text{M}$) für 2h bei RT in 1xPBS (pH 7,4) vorinkubiert und anschließend die Aggregate über den Proteinase K Verdau aufgelöst (**Abb. 33**).

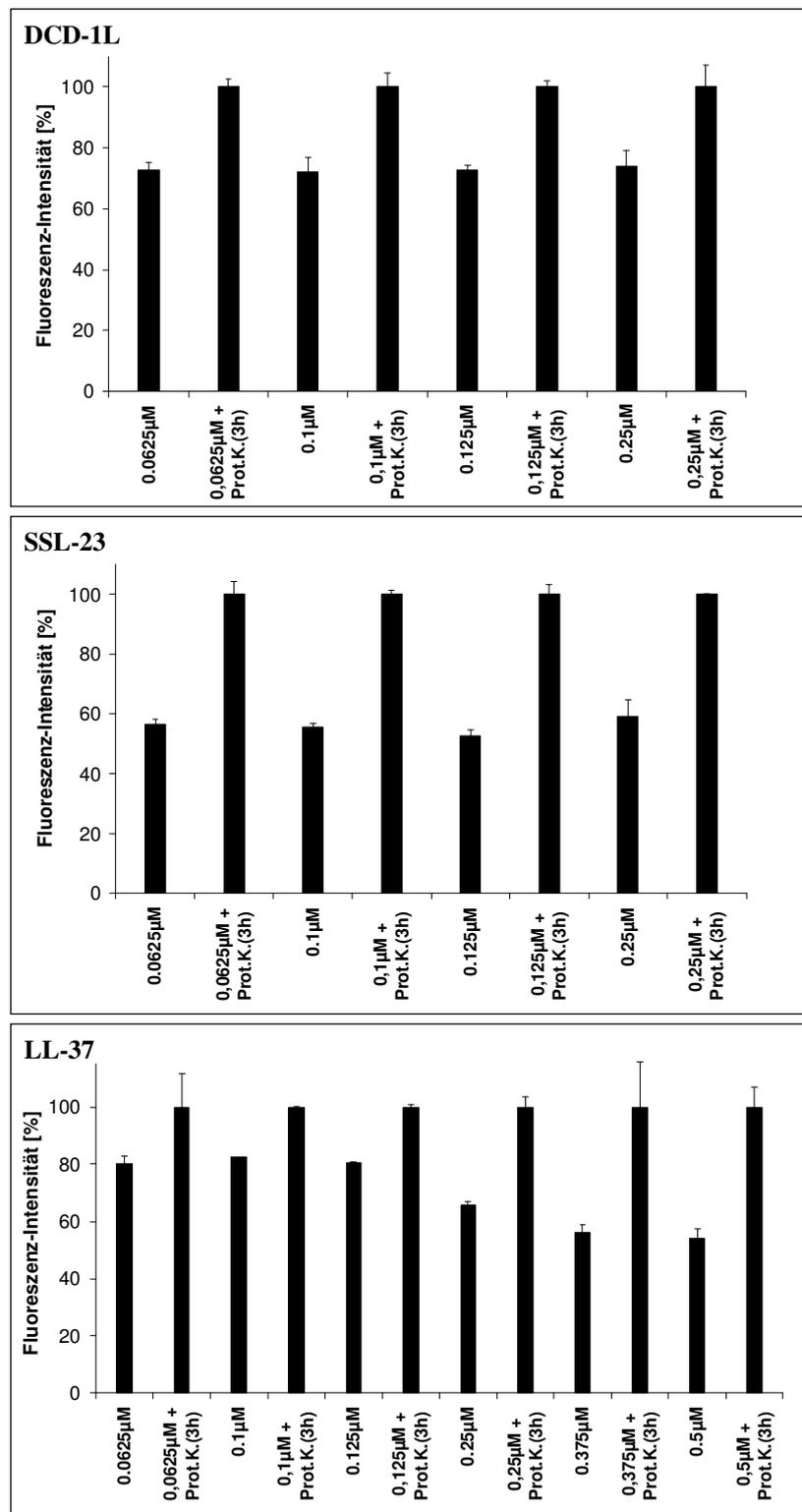


Abbildung 33: Analyse der konzentrationsabhängigen Aggregation von Peptiden

Die N-terminal FITC-markierten Peptide LL-37, DCD-1L und SSL-23 wurden in verschiedenen Konzentrationen (0,0625-0,5µM) für 2h bei RT in 1xPBS (pH 7,4) vorinkubiert. Durch Zugabe von Proteinase K (50µg/ml) wurden die Aggregate aufgelöst, was zu einem Anstieg der rel. Fluoreszenz-Intensität führte. Für die Auswertung der Versuche wurden die Werte der Fluoreszenz-Intensität vor Zugabe von Proteinase K prozentual in Bezug zu den Werten nach 3h Proteinase K Verdau genommen. Die Fluoreszenz-Intensität der freiliegenden FITC-Moleküle nach 3h Proteinase K-Verdau wurde als 100%-Wert gesetzt. Alle Messungen (Anregung: 485nm Emission: 535nm) erfolgten in dreifacher Ausführung.

Aus **Abb. 33** wird deutlich, dass die DCD-Peptide DCD-1L und SSL-23 in dem Konzentrationsbereich von 0,0625-0,25 μ M nicht konzentrationsabhängig aggregieren. Das DCD-1L weist eine Aggregation von 30% und das SSL-23 von bis zu 50% auf. Im Gegensatz zu den beiden DCD-Peptiden zeigt LL-37 eine konzentrationsabhängige Aggregation und liegt bis zu 50% aggregiert vor. Zusammengefaßt ist festzuhalten, dass unter den gewählten Bedingungen die DCD-Peptide DCD-1L und SSL-23, unabhängig von ihrer Nettoladung, zeitabhängig und konzentrationsunabhängig aggregieren. Dagegen aggregiert LL-37 zeitunabhängig und konzentrationsabhängig.

Um in einem nächsten Schritt Peptid-Oligomere nach ihrer Größe aufzutrennen und somit den Grad der Oligomerisierung zu bestimmen, wurde eine Größenausschlußchromatographie (FPLC) durchgeführt. Für die Bestimmung des Molekulargewichtes [kDa] wurde zunächst eine FPLC-Eichung der Superdex-75-Säule (HR10/30) in 100mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) durchgeführt (**Abb. 34**). Die Eichung wurde so gewählt, dass potentielle DCD-Peptid-Monomere (ca. 5kDa) von Dimeren (ca. 9kDa) und Trimeren (ca. 14kDa) unterschieden werden konnten.

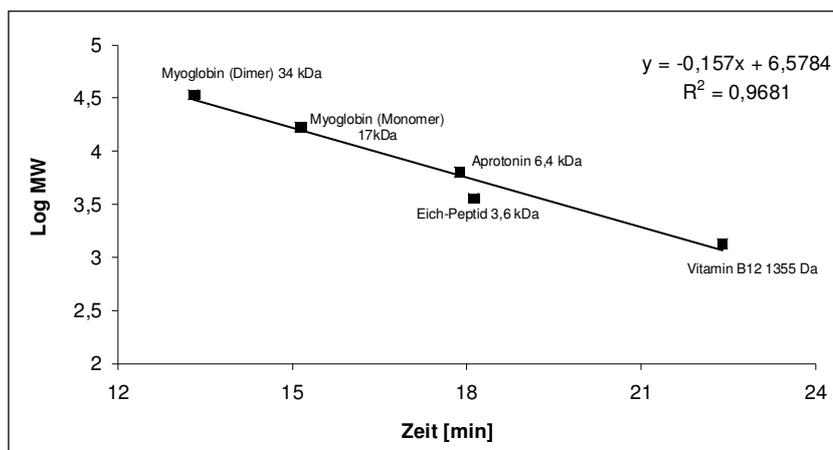


Abbildung 34: FPLC-Eichung zum Nachweis der Oligomerisierung von Peptiden

Für die FPLC-Eichung der Superdex 75-Säule (HR10/30) wurden Proteine (Myoglobin, Aprotonin, Eich-Peptid, Vitamin B12) mit bekannten Molekulargewichten in einem Bereich von ca. 1-30kDa mit einer Flussrate von 0,8ml/min in 100mM NAPB (pH 7,0) über Superdex 75 aufgetrennt. Die Detektion der Proben erfolgte bei 214nm. Der lineare Bereich erstreckte sich von ca. 2-30kDa. Aufgetragen wurde der Logarithmus des Molekulargewichtes gegen die Retentionszeit [min].

Nachdem die FPLC-Eichung (**Abb. 34**) in einem Bereich von ca. 3-30kDa durchgeführt worden war, wurden für DCD-1L verschiedene Pufferbedingungen, wie 1xPBS (pH 7,4), 100mM NAPB (pH 7,0) und 50mM NAPB (pH 7,0) mit 1% Acetonitril verwendet. Das organische Lösungsmittel Acetonitril wurde gewählt, um eine Oligomerisierung zu verhindern. Dazu wurden 5 μ g DCD-1L-Peptid vor dem Auftrag in 50mM NAPB mit 1%

Acetonitril für 20h bei 4°C versetzt und anschließend über die Superdex 75 (HR10/30)-Säule mit einer Flussrate von 0,8ml/min in 100mM NAPB (pH 7,0) aufgetrennt (**Abb. 35**).

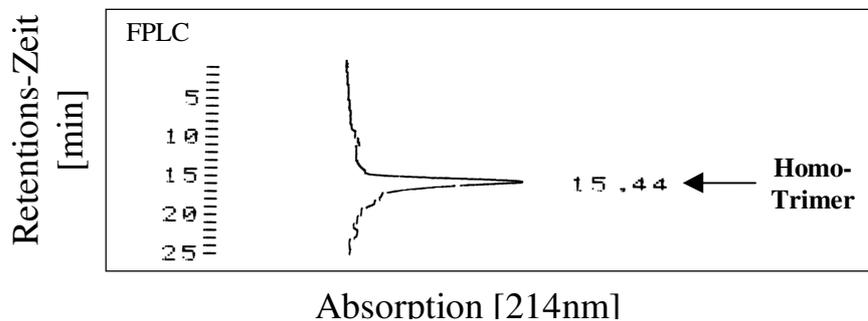


Abbildung 35: Nachweis der Oligomerisierung von DCD-1L mittels FPLC

5µg Peptid wurden vor dem Auftrag in 50mM NAPB mit 1% Acetonitril für 20h bei 4°C versetzt und anschließend über die Superdex 75 (HR10/30) Säule mit einer Flussrate von 0,8ml/min in 100mM NAPB (pH 7,0) aufgetrennt. Aufgrund der FPLC-Eichung (Abb. 33) ergab sich für das Retentat ein theoretisches Molekulargewicht von 14,3 kDa, was einem Homotrimer entsprechen würde.

Aufgrund der durchgeführten FPLC-Eichung (**Abb. 34**) ergibt sich aus der gemessenen Retentionszeit von 15,44min in **Abb. 35**, dass es sich bei dem Peak um ein Homotrimer von DCD-1L (14,3kDa) handeln könnte. Auch durch die Wahl verschiedener Lösungsmittel wie 1xPBS (pH 7,4) und 100mM NAPB (pH 7,0) gelang es nicht, das DCD-1L Peptid als Monomer oder als Dimer mittels Größenausschlußchromatographie zu identifizieren.

3.5.2. Interaktion von DCD-Peptiden mit Protein im Schweiß

Um DCD-abgeleitete Peptide im menschlichen ekkrinen Schweiß zu identifizieren, wurden RP-HPLC-Fractionen aus Schweiß isoliert und anschließend die Peptidsequenz in den Fractionen mittels Edmann Mikrosequenzierung und Tandem Massenspektrometrie bestimmt (mit freundlicher Unterstützung von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Stefanovits). Durch die Peptidbestimmung wurden im ekkrinen Schweiß die DCD-Peptide DCD-1L, DCD-1, SSL-46, LEK-44, LEK-43, SSL-25 und YDP-42 identifiziert und bestimmten HPLC-Fractionen (Nr.1-6) mit verschiedenen Retentionszeiten zugeordnet (**Abb. 36**). Daher zeigten die DCD-Peptide unterschiedliche hydrophobe Wechselwirkungen mit der unpolaren stationären Phase der HPLC-Säule. Generell konnten in weiteren RP-HPLC-Läufen dieses charakteristische Elutionsprofil von Schweiß gezeigt und die verschiedenen DCD-Peptide den Fractionen Nr.1-6 zugeordnet werden.

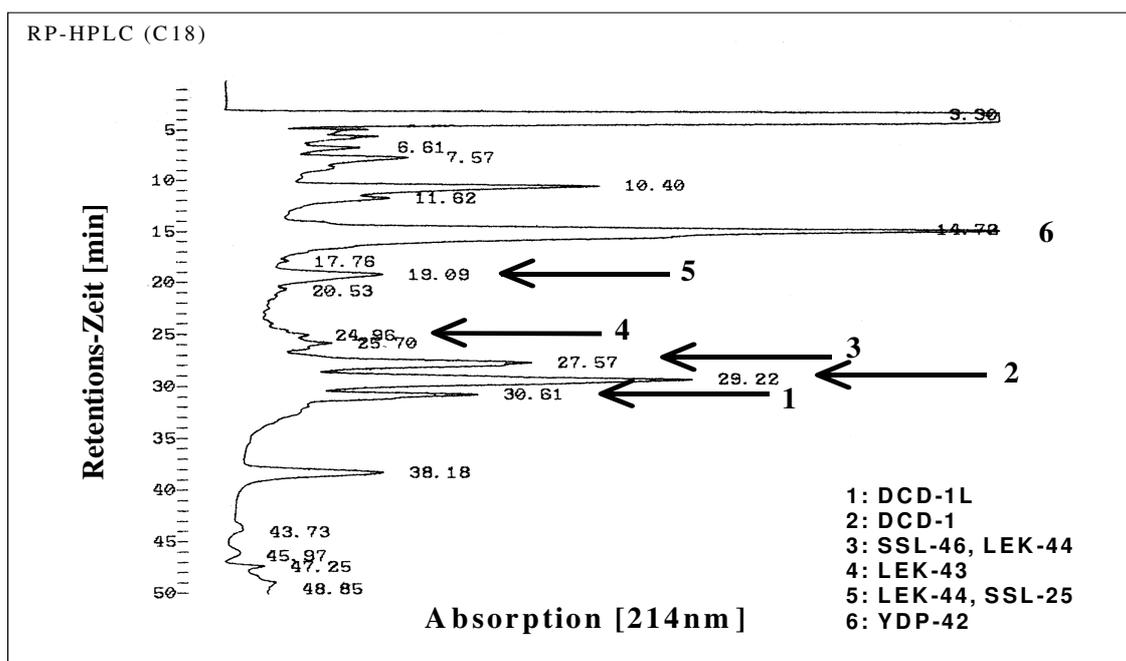


Abbildung 36: Identifizierung von DCD-Peptiden im Schweiß über RP-HPLC

Über eine Nucleosil 100 C18 (150x10mm) Säule wurden 1ml nativer Schweiß über einen Gradienten aus Puffersystem A und B (siehe 2.2.2.1) aufgetrennt und die gesammelten Fraktionen für die weitere Analyse lyophilisiert und zur Bestimmung zur Massenspektrometrie und Proteinsequenzierung gegeben. Es wurden in den sechs gesammelten Fraktionen verschiedene DCD-abgeleitete Peptide identifiziert.

Bei einer erneuten Aufreinigung von nativem Schweiß über RP-HPLC wurden die isolierten Fraktionen Nr.1-3 (**Abb. 37A**), welche die DCD-Peptide DCD-1L, DCD-1, SSL-46 und LEK-44 beinhalten sollten, mit Hilfe von Western Blot Analysen und Coomassie-Färbungen untersucht. Zuvor wurde 1ml nativer Schweiß über RP-HPLC aufgetrennt und die gesammelten Fraktionen für die weiteren Analysen lyophilisiert. Die HPLC-Fractionen wurden dann über ein 18%-iges Polyacrylamidgel nach Laemmli aufgetrennt.

Die Western Blot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper (G-81), welcher gegen den C-terminalen Bereich von DCD-1L gerichtet ist, ergab (**Abb. 37B**), dass in allen drei HPLC-Fractionen Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 5kDa und ca. 13kDa detektiert wurden. Das Molekulargewicht von 5kDa weist darauf hin, dass es sich hierbei um ein Peptid-Monomer handelt. Bei dem höheren Molekulargewicht von ca.13kDa handelt es sich entweder um ein Trimer von DCD-Peptiden oder um eine Assoziation mit einem anderen im Schweiß vorkommenden Protein.

Um das Auftreten der detektierten Bande mit einem Molekulargewicht von 13kDa aufzuklären, wurde eine Proteinsequenzierung durchgeführt (siehe 2.2.1.7). Dazu wurden Proteinbanden aus der HPLC-Fraktion Nr.1, nachdem diese durch Coomassie angefärbt

wurden, ausgeschnitten und die Proteine nach tryptischen Verdau über das charakteristische Bandenmuster bestimmt. Interessanterweise ließ sich in Fraktion Nr.1 (**Abb. 37A**), neben DCD-Peptid-Fragmenten, ein weiteres Protein namens PIP (*prolactin induced protein*) identifizieren. Aus diesem Ergebnis läßt sich schließen, dass PIP in der RP-HPLC mit dem DCD-Peptid koeluierte. Die anschließende Western Blot Analyse in **Abb. 37C** mit einem monoklonalen PIP Antikörper (siehe 2.1.3) macht deutlich, dass PIP mit einem Molekulargewicht von ca. 14kDa sowohl in nicht fraktioniertem Schweiß als auch in der HPLC-Fraktion Nr.3 detektiert wurde. Dieses Molekulargewicht stimmt etwa mit dem theoretischen Molekulargewicht aus der SWISS-Datenbank von 13,52kDa (ohne Signalpeptid) überein. Jedoch wurde kein PIP in den HPLC-Fractionen Nr.1 und Nr.2 mit Hilfe der Western Blot Analyse nachgewiesen. Die weiteren detektierten Banden in den HPLC-Fractionen Nr.2 und Nr.3 (**Abb. 37C**) stammen lediglich aus der zuvor durchgeführten Western Blot Analyse gegen DCD in **Abb. 37B**.

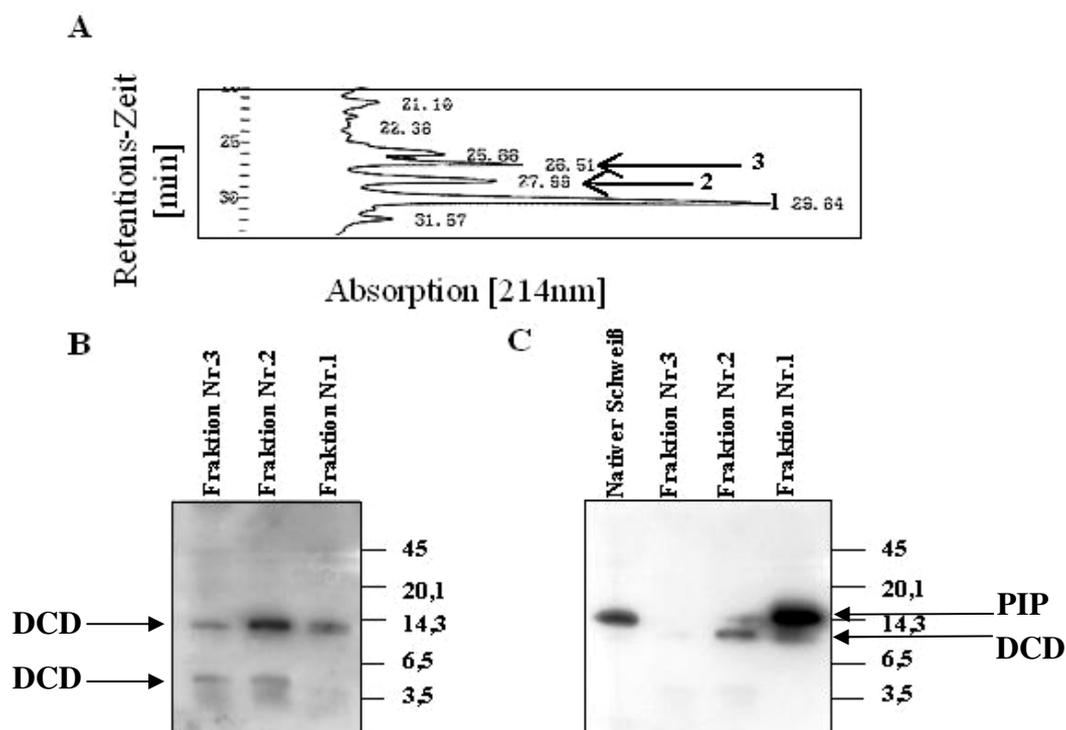


Abbildung 37: Nachweis von DCD-Peptiden und PIP im Schweiß

(A) RP-HPLC: Über eine Nucleosil 100 C-18 (150x10mm) Säule wurden 1ml nativer menschlicher Schweiß über einen Gradienten aus Puffersystem A und B (siehe 2.2.2.1) aufgetrennt und die gesammelten Fraktionen 1, 2 und 3 für die weitere Western Blot Analyse lyophilisiert. Die RP-HPLC-Fractionen wurden vollständig auf ein 18%-iges SDS-Gel aufgetragen und mit einem monoklonalen Antikörper gegen DCD (G-81) (**B**) und anschließend mit einem monoklonalen Antikörper gegen PIP (*prolactin induced protein*) (**C**) detektiert. Als Größenmarker [kDa] wurde der Rainbow-Marker RPN755 (Amersham, Freiburg) verwendet.

Da das Protein PIP ausschließlich in Fraktion Nr.3 nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob PIP spezifisch mit dem DCD-1L assoziieren könnte. PIP kommt in exokrinen Organen wie Schweiß, Speichel und Tränenflüssigkeit vor und könnte daher mit den DCD-Peptiden im Schweiß wechselwirken.

Um die Frage zu klären, ob eine Assoziation von DCD-1L mit dem Protein PIP (*prolactin induced protein*) möglich wäre, wurde eine Immunpräzipitation (IP) über Protein-A-Agarose gebundene Antikörper im *Batch*-Verfahren durchgeführt (siehe 2.2.1.8). Dazu wurde nativer Schweiß mit Antikörpern, die gegen PIP oder gegen DCD gerichtet sind, behandelt und über Protein-A-Agarose präzipitiert. Anschließend erfolgte die Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen PIP und DCD.

Für die Immunpräzipitation (IP) wurde jeweils 1ml nativer menschlicher Schweiß mit polyklonalen DCD-1L (anti-DCD-1L) oder monoklonalen DCD-1L (G-81) Antikörpern als auch mit monoklonalen anti-PIP Antikörpern inkubiert. Als Kontrolle für eine unspezifische Immunpräzipitation wurde ein Isotyp-Antikörper IgG verwendet, so daß insgesamt vier Immunpräzipitation durchgeführt wurden. Nach Präzipitation über Protein-Agarose wurden die Proben in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend zwei Western Blot gegen PIP und DCD durchgeführt. Für die Western Blot Analyse wurden Fraktionen aus der Immunpräzipitation aufgetragen, darunter P (Überstand der Pre-Adsorption von Schweiß an Protein-A-Agarose), A (Auftrag), D (Durchgang), W₁, W₂ (Waschen mit 1xPBS), und E (Elution mit Laemmli-Puffer). Die Western Blot Analysen mit dem PIP Antikörper wurden in **Abb. 38** und mit dem DCD-Antikörper (G-81) in **Abb. 39** dargestellt.

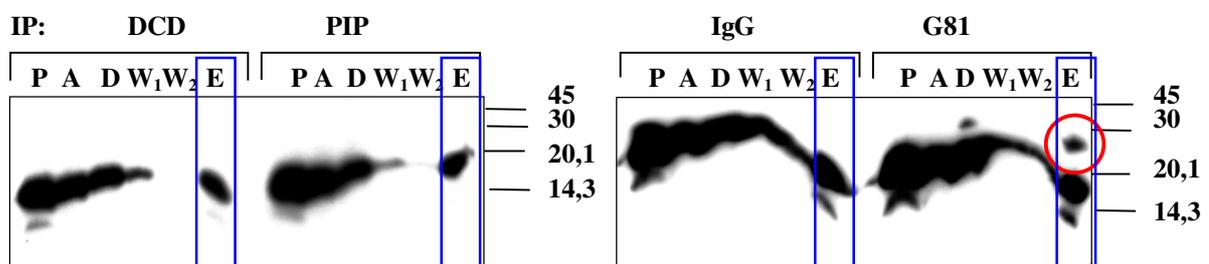


Abbildung 38: PIP-Western Blot Analyse einer Immunpräzipitation von Schweiß

1ml nativer Schweiß wurde sowohl mit polyklonalen anti-DCD und monoklonalen anti-DCD (G-81) als auch mit monoklonalen anti-PIP über Protein-A-Agarose immunpräzipitiert und anschließend über Western Blot Analyse mit anti-PIP detektiert. Als Isotyp-Kontrolle für die IP wurde IgG verwendet. P: Überstand der Pre-Adsorption an Protein-A-Agarose, A: Auftrag, D: Durchgang, W₁, W₂: Waschen, E: Eluat. Als Größenmarker [kDa] wurde der Rainbow-Marker RPN755 (Amersham, Freiburg) verwendet.

In **Abb. 38** wird anhand der Western Blot Analyse mit dem PIP-Antikörper deutlich, dass kein Unterschied zwischen der Immunpräzipitation (IP) mit polyklonalem DCD-Antikörper (anti-DCD-1L), der IP mit monoklonalem PIP-Antikörper und der IP mit der Isotyp-Kontrolle IgG zu erkennen ist. Eine Aussage über eine mögliche Assoziation von DCD-1L mit PIP kann daher nicht gemacht werden. Allein die IP mit monoklonalem DCD-Antikörper (G-81) zeigt gegenüber der Isotyp-Kontrolle eine weitere Bande im Eluat (E) mit einem Molekulargewicht von ca. 20-30kDa (mit **O** gekennzeichnet), welches deutlich größer als das theoretische Molekulargewicht (13,52kDa) von PIP ist.

Die weitere Western Blot Analyse mit monoklonalem DCD-Antikörper (G-81) (**Abb. 39**) zeigt, dass bei den Immunpräzipitationen mit polyklonalem DCD- oder monoklonalem PIP-Antikörper sowie bei der IP mit der Isotyp-Kontrolle IgG kein detektierbares DCD-Eluat nachzuweisen ist. Wie auch in der vorherigen PIP-Western-Blot-Analyse in **Abb. 38** Diese Immunpräzipitationen sind daher für eine Auswertung nicht zu verwenden.

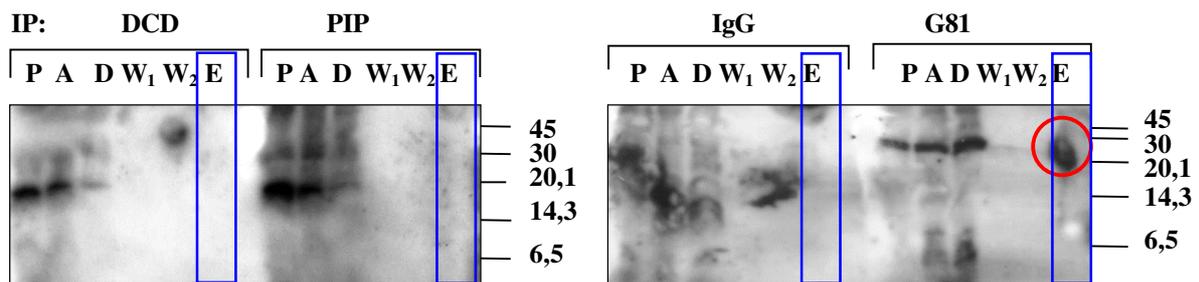


Abbildung 39: DCD-Western Blot Analyse einer Immunpräzipitation von Schweiß

1ml nativer Schweiß wurde sowohl mit polyklonalen anti-DCD und monoklonalen anti-DCD (G-81) als auch mit monoklonalen anti-PIP über Protein-A-Agarose immunpräzipitiert und anschließend über Western-Blot-Analyse mit anti-DCD (G-81) detektiert. Als Isotyp-Kontrolle für die IP wurde IgG verwendet. P: Überstand der Pre-Adsorption an Protein-A-Agarose, A: Auftrag, D: Durchgang, W₁,W₂: Waschen, E: Eluat. Als Größenmarker [kDa] wurde der Rainbow-Marker RPN755 (Amersham, Freiburg) verwendet.

Interessanterweise wurde bei der IP mit monoklonalem DCD-Antikörper (G-81), wie auch in **Abb. 38**, eine Bande im Eluat (E) (mit **O** gekennzeichnet) mit einem Molekulargewicht von ca. 20-30kDa detektiert. Da beide Western Blot Antikörper, sowohl der PIP- als auch der DCD (G-81)-Antikörper, die Bande mit dem Molekulargewicht von 20-30kDa detektieren konnten und dieses Molekulargewicht die theoretische Summe aus PIP (ca. 14kDa) und DCD-1L (ca. 5kDa) sein könnte, lässt sich eine mögliche Assoziation von DCD-1L mit PIP herleiten. Dieses IP-Experiment wurde einmal durchgeführt und sollte zur Bestätigung wiederholt und mit Bindungsstudien ergänzt werden.

3.5.3. Untersuchungen zum Vorkommen von weiteren antimikrobiellen Peptiden oder Proteinen im ekkrinen Schweiß

In den Epithelien menschlicher Haut werden verschiedene AMPs synthetisiert (Tossi, A. und Sandri, L. 2002). Diese können sowohl einzeln als auch in Kombination mit anderen antimikrobiellen Substanzen wirken (Yan, H. und Hancock, R. E. 2001). Das Vorkommen von weiteren antimikrobiellen Peptiden oder Proteinen im menschlichem Schweiß wurde anhand von Western Blot Analysen mit frischem menschlichem Schweiß gegen DCD (anti-DCD-1L), α -Defensine 1/2 (HNP-1/2), β -Defensin 2 (HBD-2) und gegen das humane Lysozym überprüft (Abb. 40). Dazu wurde sowohl unbehandelter ekkriner Schweiß als auch sterilfiltrierter Schweiß, sowie sterilfiltrierter Speichel auf ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und die nachzuweisenden Substanzen immunchemische analysiert. Neben DCD wurden keine weiteren antimikrobiellen Peptide wie HNP-1/2, HBD-2 oder Lysozym im menschlichem Schweiß in signifikanten Mengen detektiert.

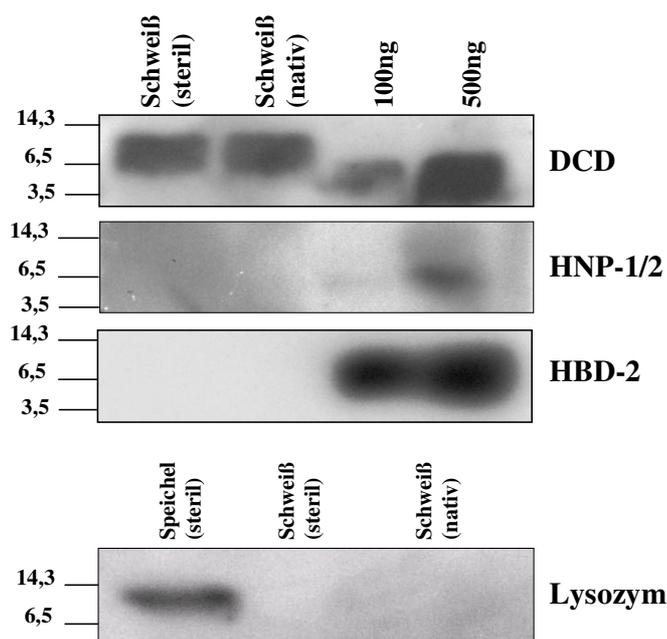


Abbildung 40: Western Blot Analyse von nativem Schweiß

15 μ l menschlicher ekkriner Schweiß von der Stirn wurden sowohl als Sterilfiltrat (0,22 μ m) als auch nativ über ein 15%iges SDS-Gel aufgetrennt und mit verschiedenen Antikörpern gegen Dermcidin (anti-DCD-1L), HNP-1/2, HBD-2 und gegen Lysozym detektiert. Als Positiv-Kontrollen wurden jeweils 100ng und 500ng synthetisches oder rekombinantes Peptid aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle für die Lysozym-Detektion dienten 15 μ l sterilfiltrierter (0,22 μ m) menschlicher Speichel. Als Größenmarker [kDa] wurde der Rainbow-Marker RPN755 (Amersham, Freiburg) verwendet.

Das Ergebniss dieser Western Blot Analyse wurde weiterhin durch SELDI (*surface-enhanced laser desorption/ionisation*) Analysen (Rieg *et al.*, 2006) bestätigt. Die SELDI-TOF-MS Analysen von Schweißproben von insgesamt 18 gesunden Individuen zeigten, dass weder LL-37 (4493,32Da) noch die Derivate KR-20 (2468,93Da), RK-31 (3800,51Da) und KS-30 (3644,32Da) und auch nicht die β -Defensine HBD-1 (3934,57Da), HBD-2 (4334, 24Da), HBD-3 (5161,20Da) oder die α -Defensine HNP-1 (3448,09Da), HNP-2 (3377,01Da) und HNP-3 (3492,1Da) im Schweiß bis zu einer Nachweisgrenze von 2 μ M nachgewiesen werden konnten. Somit sollten die Defensine noch LL-37 zur antimikrobiellen Aktivität menschlichen Schweißes signifikant beitragen.

3.6. Expressionsanalyse von DCD

3.6.1. Expressionsanalyse von DCD in der Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3

Dermcidin wird konstitutiv und selektiv in den muzinösen Zellen des Drüsenkörpers von ekkrinen Schweißdrüsen exprimiert. In Keratinozyten gesunder Haut wurde keine Expression von Dermcidin festgestellt (Schittek, B. *et al.* 2001). Um untersuchen zu können, wie die DCD-Expression in den ekkrinen Schweißdrüsen reguliert wird, wurde die Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3 (Lee, C. M. und Dessi, J. 1989) zunächst auf RNA- und Protein-Ebene auf DCD-Expression hin analysiert. Die Untersuchungen wurden auf RNA-Ebene mit Hilfe einer Northern Blot- und einer RT-PCR-Analyse und auf Proteinebene mit Hilfe einer FACS-, einer Western Blot- und einer Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt.

Für die Northern Blot Analyse (**Abb. 41**) wurden je 10 μ g der Gesamt-RNA von den Schweißdrüsenzellen NCL-SG3 mit unterschiedlicher Passagenzahl (P81, P224) und von gesunder Haut aufgetragen. Um zusätzlich zu untersuchen, ob in der Maus *DCD*-Transkripte vorhanden sind, wurde auch die gleiche Menge an Gesamt-RNA von Mäusefüßen mit aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle diente das 480bp große *DCD*-cDNA-Fragment, welches zuvor aus dem pBluescript-Vektor über *EcoRI* und *HindIII* ausgeschnitten wurde.

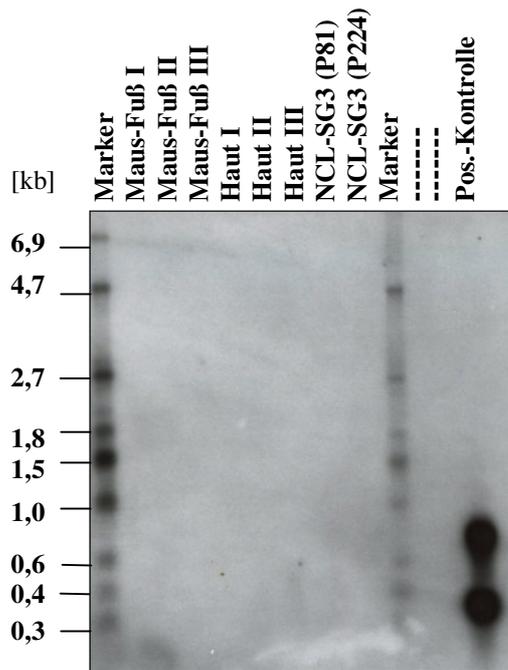


Abbildung 41: DCD-Transkriptionsanalyse mittels Northern Blot Analyse

10µg Gesamt-RNA von zwei Schweißdrüsenzelllinien NCL-SG3 mit unterschiedlicher Passagenzahl (P81, 224) sowie von Mäusefüßen und gesunder Haut wurden aufgetragen und mit Hilfe einer DCD-Hybridisierungs-Sonde (siehe 2.2.7.4.1) detektiert. Die Positiv-Kontrolle bestand in dem Auftrag von dem 480bp großen DCD-cDNA-Fragment (50ng), welches zuvor über einen Restriktionsverdau aus dem pBluescript-Vektor hergestellt wurde.

Die Northern Blot-Analyse in **Abb. 41** zeigt, dass weder in der Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3 noch in menschlicher Haut oder in Mäusefüßen ein *DCD*-Transkript detektiert werden konnte. Der Grund dafür, dass in der menschlichen Haut sowie in den Mäusefüßen kein *DCD*-Transkript detektiert wurde, liegt wahrscheinlich an der zu geringen Anzahl an Schweißdrüsenzellen in der untersuchten Haut. Um dieses quantitative Problem ausschließen zu können, wäre eine Positiv-Kontrolle auf RNA-Ebene für die Northern Blot Analyse notwendig. Weitere Untersuchungen der verschiedenen RNA-Proben mit Hilfe einer RT-PCR zeigten keine spezifische Amplifizierung der cDNA von *DCD* aus der Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3 (Daten nicht gezeigt). Als Positiv-Kontrolle für die Amplifizierung wurde die klonierte cDNA von *DCD* im pBluescript-Vektor verwendet.

Die Untersuchungen der *DCD*-Expression in der Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3 wurden auf Proteinebene mit Hilfe einer FACS-Analyse weitergeführt. Dazu wurden die NCL-SG3 Zellen fixiert und mit nicht-immunaffinitätsaufgereinigten *DCD*-Antikörper oder *DCD*-1L Antikörper (anti-*DCD*-1L) behandelt und über den anti-Kaninchen Sekundärantikörper (EAK-Cy3) detektiert. Als Negativ-Kontrollen dienten sowohl unbehandelte als auch nur mit dem Sekundärantikörper (EAK-Cy3) behandelte Zellen. In der FACS-Analyse in **Abb. 42** wurden die Zellen als FSC/SSC-Dot Plot dargestellt, indem die Seitwärtslichtstreuung (*side scatter*, SSC) gegen die Vorwärtslichtstreuung (*forward scatter*, FSC) aufgetragen wurde. Die ausgewählte Zellpopulation (*Gate*) wurde in Abhängigkeit ihrer Fluoreszenzeigenschaft näher charakterisiert, indem die Anzahl der Zellen

(counts) in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität als Histogramm aufgetragen wurden.

Anhand der FACS-Analyse in **Abb. 42** konnte keine DCD-Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden. Vielmehr wurde deutlich, dass der nicht-affinitätsaufgereinigte DCD-Antikörper unspezifisch an die Zellen bindet, da der Histogramm-Plot des affinitätsaufgereinigten DCD-1L Antikörpers im Gegensatz keine Detektion von DCD zeigte.

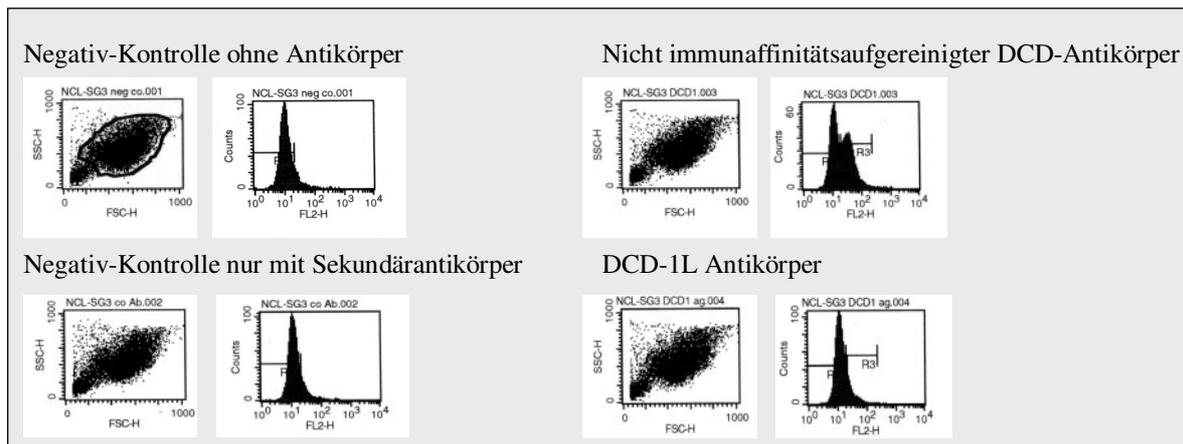


Abbildung 42: DCD-Expressionsanalyse der Schweißdrüsenzelllinie mittels FACS

Die NCL-SG3 Zellen (P82) wurden fixiert und mit nicht-immunaffinitätsaufgereinigten DCD-Antikörper oder mit DCD-1L Antikörper (anti-DCD-1L) behandelt und über den anti-Kaninchen Sekundäntikörper EAK-Cy3 detektiert. Als Negativ-Kontrollen dienen sowohl unbehandelte als auch nur mit dem Cy3-markierten Sekundäntikörper behandelte Zellen. Die durchflusszytometrisch erhaltenen Daten wurden als Dot-Plot, und als Histogramm-Plot dargestellt

Dieses Ergebnis der Expressionsanalyse wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Untersuchung (siehe 2.2.6.4) an der NCL-SG3-Zelllinie mittels Zytospins und anschließender Immunfärbung bestätigt.

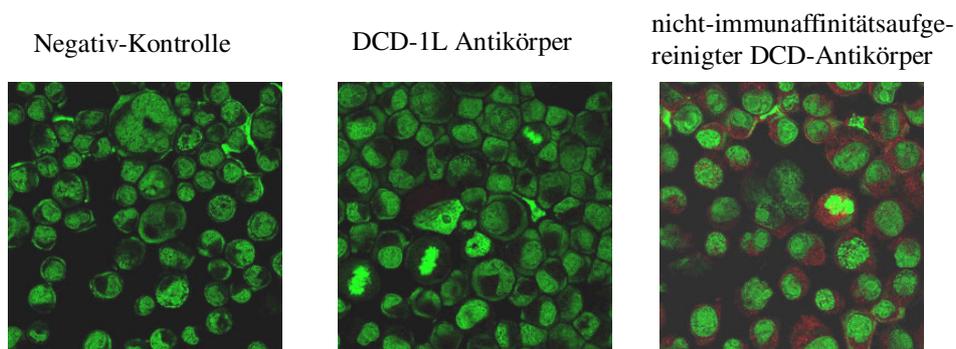


Abbildung 43: DCD-Expressionsanalyse der Schweißdrüsenzelllinie mittels Immunfluoreszenz

Die NCL-SG3 Zelllinie (P82) wurde mit Hilfe von Zytospins auf Objektträger fixiert und mit Hilfe eines DCD-1L Antikörpers oder eines nicht-immunaffinitätsaufgereinigten Antikörpers gegen DCD analysiert. Es wurde ein **EAK-Cy3 Sekundäntikörper (rot)** sowie für die **Kernfärbung YOPRO (grün)** verwendet. Als Negativ-Kontrolle dienen nur mit YOPRO behandelte Zellen. Die Aufnahmen erfolgten mit einem konfokalen Laserskannmikroskop (Leica TCS SP, Leica Microsystems, Bensheim).

In **Abb. 43** zeigen die konfokalen Lasermikroskop-Aufnahmen keine DCD-Expression auf Proteinebene. Auch hier wurde, wie bei der FACS-Analyse, eine unspezifische Bindung des verwendeten nicht-affinitätsaufgereinigten DCD-Antikörpers an die Zellen nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Schweißdrüsenzelllinien sowohl in serumfreien als auch in serumhaltigen (5% FCS) Medium kultiviert und über eine Western Blot Analyse mit einem monoklonalen DCD-Antikörper (G-81) analysiert (Daten nicht gezeigt). Es konnte auch über diese Methode keine DCD-Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden. Zusammengefaßt zeigten die Untersuchungen sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene keine offensichtliche Expression von DCD in der Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3.

3.6.2. Homologie-Analyse des *DCD*-Gens zu anderen Säugern

Datenbankrecherchen im Internet gaben zu diesem Zeitpunkt keinen Hinweis auf ein weiteres homologes *DCD*-Gen im Menschen oder in anderen Spezies. Um nach homologen *DCD*-Genen beim Menschen, aber auch in anderen Spezies wie Maus, Schwein und Kaninchen zu suchen, wurde die genomische DNA dieser Spezies mit Hilfe einer Southern Blot Analyse untersucht (**Abb. 44**). Dazu wurden 10µg genomische DNA jeweils mit den Enzymen *EcoRI* oder *HindIII* geschnitten, die nicht innerhalb der kodierenden humanen *DCD*-Sequenz schneiden, und nach Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel auf eine Nylonmembran kapillarisch übertragen. Anschließend wurde die Membran mit einer einzelsträngigen DIG-markierten *DCD*-Sonde behandelt.

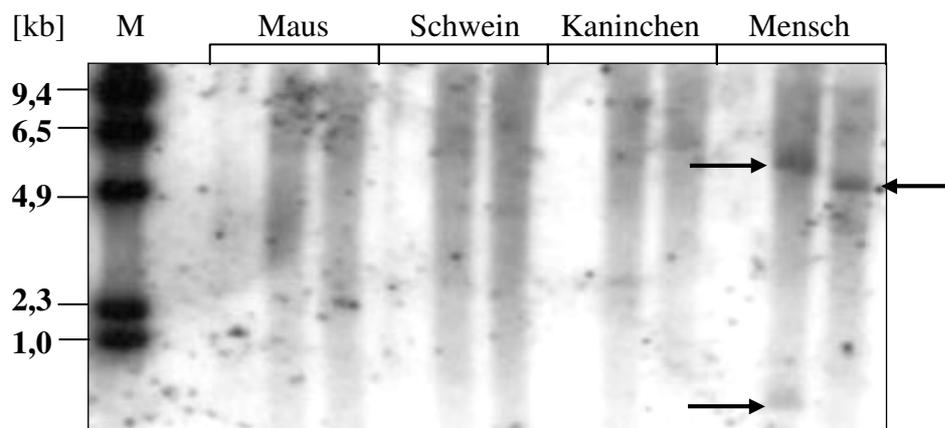


Abbildung 44: Genomische Southern Blot Analyse gegen *DCD*

Genomische DNA (10µg) von Maus, Schwein, Kaninchen und Mensch wurden jeweils auf ein 0,9%iges Agarosegel in der folgenden Reihenfolge von links nach rechts aufgetragen: ungeschnitten, mit *EcoRI*-Enzym, mit *HindIII*-Enzym geschnitten. Für die Hybridisierung wurde eine DIG-markierte *DCD*-Sonde (siehe 2.2.7.4.1) verwendet. Der Blot wurde unter nicht-stringenten Bedingungen gewaschen. Die Pfeile zeigen auf die detektierten Banden im menschlichen Genom.

Mit Hilfe der genomischen Southern Blot Analyse in **Abb. 44** ließen sich mit der humanen *DCD*-Sonde keine weiteren homologen *DCD*-Gene in anderen Spezies nachweisen. Dagegen ließ sich im menschlichem Genom für beide enzymatischen Verdau (EcoRI, HindIII) Banden detektierten. Die untere Bande im Bereich von ca. 300bp läßt vermuten, dass *EcoRI* innerhalb des nicht-kodierenden Intronbereichs von *DCD* geschnitten hat.

Für Mäusefüße, welche Schweißdrüsen enthalten, wurden weitere Untersuchungen auf RNA-Ebene durchgeführt. Weder mit Hilfe von RT-PCR-Analysen (Daten nicht gezeigt) noch mit Northern Blot Analysen (**Abb. 41**) gelang ein Nachweis von *DCD*-Transkripten in den Mäusefüßen. Die RNA-Analysen wurden weiterhin durch Untersuchungen auf Proteinebene mittels *in situ* Immunlokalisation von *DCD* in Mäusefüßen ergänzt (**Abb. 45**).

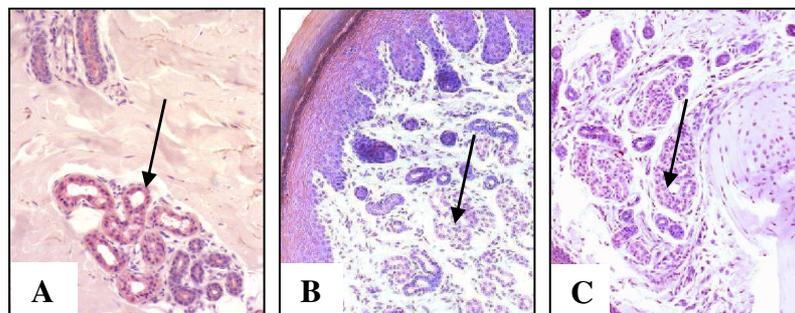


Abbildung 45: *In situ* Immunlokalisation von *DCD* in menschlicher Haut und Mäusefüßen

Immunlokalisation von *DCD* (anti-*DCD*-1L) in gesunder menschlicher Haut (**A**) und in Mäusefüßen (**C**). Als Kontrolle für die Immunlokalisation in Mäusefüßen (**B**) wurde der sekundäre biotinylierte Antikörper (KAZ; siehe Tab. 5) verwendet. Die Detektion erfolgte über das umgesetzte Substrat Neu-Fuchsin (rot). Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE) durchgeführt (blau-violett). Die Pfeile zeigen auf die Schweißdrüsenkörper.

Die *in situ* Färbung gegen *DCD* in den Schweißdrüsen der Maus (**Abb. 45C**) zeigte gegenüber der Sekundärantikörper-Kontrolle keine höhere Intensität (**Abb. 45B**). Hingegen wurde *DCD* in den Schweißdrüsen der menschlichen Haut lokalisiert (**Abb. 45A**). Auch mit dieser Methode konnte kein Hinweis auf eine mögliche Expression von *DCD* in der Maus erhalten werden.

4. Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Isolierung der antimikrobiell wirksamen Dermcidin (DCD)-abgeleiteten Peptide DCD-1L und DCD-1 (Schittek, B. et al. 2001). Dermcidin wird spezifisch und konstitutiv in ekkrinen Schweißdrüsen menschlicher Haut exprimiert und über sekretorische Granula in den Schweiß sezerniert. Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Schweiß insgesamt 14 proteolytisch generierte DCD-abgeleitete Peptide vorkommen (Rieg, S. et al. 2006). Es wurden 13 C-terminal abgeleitete Peptide und ein N-terminale abgeleitetes Peptid namens YDP-42 sowie dessen Dimer identifiziert. Diese DCD-abgeleiteten Peptide unterscheiden sich voneinander sowohl in der Länge (24 bis 48AS) als auch in ihrer Nettoladung (-2 bis +2). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die anionischen DCD-Peptide DCD-1L und DCD-1 eine konzentrationsabhängige antimikrobielle Aktivität gegenüber den Pathogenen *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* und *C. albicans* besitzen (Schittek, B. et al. 2001), wohingegen das N-terminale Peptid YDP-42 keine toxische Wirkung zeigte (Rieg, S. et al. 2006). Zusätzlich konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass DCD-1L und DCD-1 auf weitere Keime eine antimikrobielle Wirkung besitzen. DCD-1L wirkt antimikrobiell auf *Pseudomonas putida*, rifampicin- und isoniazid-resistenter *M. tuberculosis* (Lai, Y. P. et al. 2005) und DCD-1 wirkt auf *E. coli* ML-35p, *Salmonella typhimurium* 5156, *Listeria monocytogenes* 264, klinische *S. aureus* Isolate und auf ein klinisches *C. albicans* Isolat (Cipakova, I. et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die antimikrobielle Aktivität als auch der Wirkmechanismus von prozessierten C-terminalen DCD-Peptiden untersucht. Dazu wurden die zwei anionischen Peptide DCD-1L (48AS) und LEK-45 (45AS) ausgewählt. Beide besitzen eine Nettoladung von -2 und unterscheiden sich voneinander um die drei N-terminalen Aminosäuren (SSL). Weiterhin wurden die C-terminal verkürzten Peptide SSL-29, SSL-25 und SSL-23 gewählt, da sie verschiedene Nettoladungen und Peptidlängen aufweisen. So trägt SSL-29 eine neutrale, das kürzere Peptid SSL-25 eine positive Nettoladung von +2 und SSL-23 eine positive Nettoladung von +3. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Nettoladung und die Peptidlänge der DCD-Peptide auf die antimikrobielle Aktivität haben. Weiterhin sollte analysiert werden, ob die DCD-Peptide eine membranschädigende Wirkung auf Mikroorganismen besitzen.

4.1. Antimikrobielle Aktivität von DCD-abgeleiteten Peptiden

Untersuchungen zum antimikrobiellen Wirkspektrum ergaben, dass das anionische Peptid DCD-1L zusätzlich zu den bereits in anderen Veröffentlichungen getesteten Mikroorganismen (Cipakova, I. et al. 2005; Lai, Y. P. et al. 2005) eine antimikrobielle Aktivität gegenüber *S. epidermidis* und methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) besitzt, jedoch keine gegen die nicht-mukoide Form von *P. aeruginosa*. Die postsekretorisch verkürzten DCD-Peptide SSL-25 und SSL-23, welche eine kationische Nettoladung haben, weisen eine zu DCD-1L vergleichbare antimikrobielle Wirkung gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien auf, darunter auch gegen MRSA. Aus diesem Befund kann abgeleitet werden, dass die DCD-Peptide unabhängig von ihrer Nettoladung eine antimikrobielle Wirkung auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien haben. Desweiteren zeigte SSL-29, welches eine neutrale Nettoladung und vier zusätzliche Aminosäuren verglichen mit SSL-25 besitzt, keine antimikrobielle Wirkung auf alle getesteten Mikroorganismen bis zu einer Konzentration von 200µg/ml (70µM). Folglich scheint das Vorhandensein von negativer oder positiver Nettoladung oder/und bestimmte strukturelle Peptid-Eigenschaften eine Voraussetzung für die antimikrobielle Wirkung zu sein. Die Bedeutung von strukturellen Eigenschaften zeigte sich besonders bei den antimikrobiellen Tests von LEK-45, welches um drei N-terminale Aminosäuren (SSL) gegenüber dem DCD-1L verkürzt ist und die gleiche Nettoladung von -2 trägt. Da für LEK-45 im Vergleich zu DCD-1L keine Aktivität auf die getesteten Mikroorganismen festzustellen war, sind diese drei Aminosäuren höchstwahrscheinlich für die antimikrobielle Wirkung von DCD-Peptiden essentiell.

Weiterhin läßt sich aus den antimikrobiellen Tests mit dem kürzesten Peptid SSL-23 ableiten, dass die ersten 23 Aminosäuren innerhalb des DCD-1L-Peptids entscheidend für die antimikrobielle Aktivität sind. Dieser kationisch geladene Teilbereich des insgesamt anionisch geladenen DCD-1L könnte für die Bindung an die negativ geladene Bakterienmembran verantwortlich sein. Da jedoch alle C-terminal längeren Peptide, wie z.B. SSL-29, diesen positiv geladenen Bereich auch beinhalten, scheint nicht nur die Ladung sondern auch strukturelle Eigenschaften der Peptide eine Rolle zu spielen.

Für das humane Cathelicidin LL-37 konnte gezeigt werden, dass es auf der Haut zu weiteren verkürzten Peptiden KR-20, RK-31 und KS-30 durch eine noch nicht identifizierte Serin-**Protease** postsekretorisch prozessiert wird (Murakami, M. et al. 2004). Die drei verkürzten Peptide zeigen im Vergleich zu LL-37 eine gesteigerte antimikrobielle Aktivität auf verschiedene Mikroorganismen. Die ersten 6 bis 7 Aminosäuren von LL-37

scheinen nicht für die antimikrobielle Aktivität notwendig zu sein (Murakami, M. et al. 2004).

Kürzlich wurde nachgewiesen, dass sowohl die Aspartat Proteinase Cathepsin D und eine 1,10-Phenanthrolin (Metalloprotease-Inhibitor) sensitive Carboxypeptidase an der post-sekretorischen Prozessierung von DCD-Peptiden involviert sind (Baechle, D. et al. 2006). So wurde gezeigt, dass die Protease Cathepsin D das DCD-1L zwischen den Aminosäuren L¹⁰⁶ und D¹⁰⁷ und zwischen L⁹¹ und E⁹² vollständig schneidet. Dagegen schneidet im C-terminalen Bereich von DCD-1L die Carboxypeptidase und generiert verschiedene C-terminal verkürzte DCD-1L-Peptide. Insgesamt stimmt das proteolytische Muster der zwei identifizierten Enzyme weitgehend mit dem im nativen Schweiß überein. Jedoch ist unklar, welche Proteasen für die Generierung von DCD-1L zwischen R⁶² und S⁶³ sowie von den verkürzten Peptiden LEK-45 und LEK-24 zwischen L⁶⁵ und L⁶⁶ verantwortlich sind.

Die Erstellung einer **Zeitkinetik** zeigte, dass sowohl das kationische Peptid SSL-23 als auch das anionische DCD-1L erst nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden ihre antimikrobielle Wirkung auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien entfalten. Im Gegensatz dazu wirkte das kationische LL-37 schon innerhalb der ersten Minuten toxisch auf die Bakterien. Diese zeitliche Differenz in der antimikrobiellen Wirkung deutet darauf hin, dass die beiden DCD-Peptide über einen anderen antimikrobiellen Wirkmechanismus als das Cathelicidin LL-37 die Bakterien abtöten. Andere AMPs wie Magainin II (Zasloff, M. 1987), Cecropin P1, PR-39 (Boman, H. G. et al. 1993) und SMAP-29 (Kalfa, V. C. et al. 2001) töten Bakterien innerhalb von 15-90 Minuten. *P. aeruginosa* wird nach Behandlung mit SMAP-29, welches zur Familie der Cathelicidine gehört, schon nach 15 Minuten über Membranpermeabilisierung getötet. Das Peptid SMAP-29 konnte sofort nach Zugabe zu den Bakterien im Zytoplasma lokalisiert und der Vorgang der Membranschädigung bis zu 8 Stunden verfolgt werden (Kalfa, V. C. et al. 2001).

Die positive **Nettoladung** von AMPs wird generell als eine notwendige Voraussetzung zur Wechselwirkung mit der negativ geladenen Bakterienoberfläche angesehen. Durch die Identifizierung von anionischen antimikrobiellen Peptiden, darunter DCD-1L, scheint diese ladungsabhängige Interaktion mit der Bakterienmembran nicht essentiell für die Abtötung zu sein. Es konnte ein anionisches AMP aus dem Frosch der Gattung *Bombina maxima* namens Maximin H5 isoliert werden. Dieses Peptid besteht aus 20AS und besitzt eine antimikrobielle Aktivität gegen den Gram-positiven Stamm *S. aureus* (MIC: 80µM), wirkt

aber nicht gegen Gram-negative Bakterien oder gegen *C. albicans* (Lai, R. et al. 2002). Erst kürzlich wurden zwei anionische Defensin-ähnliche AMPs aus der Hämolymphe der weiblichen tropischen Zecke *Amblyomma hebraeum* isoliert (Lai, R. et al. 2004). Diese 41 Aminosäuren langen Peptide besitzen 6 Cysteine und wurden als *Amblyomma* Defensin-1 und *Amblyomma* Defensin-2 bezeichnet. Interessanterweise besitzen alle bisher bekannten Defensine und Defensin-ähnlichen Peptide eine positive Nettoladung und interagieren ladungsabhängig mit LPS von Gram-negativen Bakterien und mit Teichonsäuren sowie Phospholipiden von Gram-positiven Bakterien (Raj, P. A. und Dentino, A. R. 2002; Weinberg, J. M. et al. 1998). Das *Amblyomma* Defensin-2 besitzt eine zu DCD-1L vergleichbare antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* und *S. aureus* im micromolaren Bereich (MIC: 30 μ M; 7,5 μ M), nicht aber gegen *C. albicans* (SC 5314) und *C. glabrato* (ATCC 2001). Es wurde angenommen, dass diese anionischen Defensin-Peptide über den positiv geladenen und hydrophoben Teil am C-Terminus mit der Bakterienmembran wechselwirken. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Expression von *Amblyomma* Defensin-1 durch einen Zeckenbiß in der Hämolymphe der Zecke über einen Zeitraum von 4 Tagen induziert werden kann.

Weitere anionische AMPs ähneln in ihrer Struktur den ladungsneutralisierenden Pro-Peptiden von Gruppe I Serinproteasen und werden in Lungenepithelien von Rindern exprimiert (Brogden, K. A. et al. 1996). Diese recht kleinen (721.6–823.8 Da) anionischen Peptide werden in millimolaren Konzentrationen produziert und wirken antimikrobiell in Abhängigkeit von Zinkionen auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien (Brogden, K. A. 2005).

Allgemein reicht die Peptidlänge der AMPs von 6 bis über 59 Aminosäuren (Brogden, K. A. 2005). Die Länge der Aminosäuresequenz der Peptide zeigt im Hinblick auf das antimikrobielle Wirkspektrum keinen erkennbaren Einfluß. Das kürzeste kationische AMP Indolicidin besteht aus 13 Aminosäuren und besitzt ein antimikrobielles Wirkspektrum auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie auf Pilze und Protozoen (Rozek, A. et al. 2000; Falla, T. J. et al. 1996; Subbalakshmi, C. und Sitaram, N. 1998).

Untersuchungen zum Einfluß der **Salzkonzentration** auf die antimikrobielle Aktivität der DCD-Peptide ergaben, dass die Aktivität auch in hohen NaCl-Konzentration bis 150mM erhalten bleibt (Schitteck, B. et al. 2001). In dieser Arbeit war die antimikrobielle Aktivität der DCD-Peptide in einer niedrigen NaCl-Konzentration von 10mM im Vergleich zu Pufferbedingungen ohne Salz am höchsten. Antimikrobielle Tests unter schweißähnlichen

Bedingungen (40mM NaCl, 10mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl, 1mM NaH₂PO₄, pH 5,5 bzw. 6,5) ergaben, dass DCD-1L auch unter physiologischen Bedingungen aktiv ist (Schitteck, B. et al. 2001). Hingegen wurde für LL-37 und für Defensine beschrieben, dass diese sensitiv auf hohe Salzkonzentrationen reagieren, so dass deren antimikrobielle Aktivität vermindert wird (Turner, J. et al. 1998; Garcia, J. R. et al. 2001b; Bals, R. et al. 1998a; Valore, E. V. et al. 1998; Goldman, M. J. et al. 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von 25mM Carbonat-Anionen (HCO₃⁻) im Medium von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien eine Abnahme der Bakterienmembrandicke und somit eine erhöhte Membranaktivität der kationischen Peptide LL-37, CRAMP, PR-39 murines α -Defensin Cryptdin-4 und β -Defensin-2 bewirkte (Dorschner, R. A. et al. 2006). Hingegen wurde für das anionische DCD-1L keine erhöhte antimikrobielle Aktivität auf die Mikroorganismen in Anwesenheit von Carbonat-Anionen festgestellt (Dorschner, R. A. et al. 2006).

Im menschlichen **Schweiß** sind, neben den DCD-Peptiden, diverse Proteasen wie z.B. Kallikrein und Kininase II (Fraki, J. E. et al. 1970; Hibino, T. et al. 1994), Cathepsin B1 und Cathepsin D (Fraki, J. E. 1976) sowie Matrix-Metalloproteinase 19 (Sadowski, T. et al. 2003) identifiziert worden. Neben den Proteasen sind im Schweiß Immunglobulin A (Okada, T. et al. 1988) Interleukin IL-1 und IL-8 (Didierjean, L. et al. 1990), (Sato, K. und Sato, F. 1994), IL-6 sowie TNF- α (Ahmed, A. A. et al. 1994; Ahmed, A. A. et al. 1996), TGF- β (Wollina, U. et al. 1999), EGF (Sato, K. et al. 1989) und LL-37 (Murakami, M. et al. 2002a) vorhanden. In den Schweißdrüsenkanälen sowie in den sekretorischen Endstücken der Schweißdrüsen wurden die folgenden Proteine nachgewiesen: humanes Albumin (Nakayashiki, N. 1990; 65kDa), Protease Inhibitor Cystatin A (Zeeuwen, P. L. et al. 2002; Zeeuwen, P. L. et al. 2001; 12kDa), Cytokeratin I (Schon, M. et al. 1999; 53kDa), Zn- α -Glykoprotein (Tada, T. et al. 1991; 38kDa) sowie PIP (*prolactin inducible protein*) (Myal, Y. et al. 1991; 15kDa). Desweiteren wurden erstmalig im ekkrinen Schweiß Apolipoprotein D, Lipophilin B und Cathepsin D identifiziert (Baechle, D. et al. 2006). Für die DCD-abgeleiteten Peptide wurde nachgewiesen, dass diese in antimikrobiellen Mengen im Schweiß vorhanden sind (Flad, T. et al. 2002; Rieg, S. et al. 2006), während LL-37 in einer nicht antimikrobiell wirksamen Menge von 0,1 μ M nachgewiesen wurde (Murakami, M. et al. 2002b). Da AMPs sowohl einzeln als auch in Kombination wirken können (Yan, H. und Hancock, R. E. 2001), stellt sich die Frage, ob sich die antimikrobielle Wirkung von DCD-Peptiden durch Interaktion mit anderen Proteinen oder

AMPs synergistisch steigern läßt. So konnte für Magainin eine **synergistische Wirkung** mit Tachyplesin (Kobayashi, S. 2002) oder auch Dermaseptin (Mor, A. et al. 1994) nachgewiesen werden. Verschiedene AMPs wie β -Defensin-1, -2, -3 und LL-37 zeigen *in vitro* eine synergistische Wirkung mit Lysozym gegen *S. aureus* und *E. coli* (Chen, X. et al. 2005). Dieser Effekt erklärt sich vermutlich dadurch, dass Lysozym die Polysaccharidketten des Mureins in der bakteriellen Zellwand spaltet und so den kationischen antimikrobiellen Peptiden (CAMPs) das Eindringen in die Bakterienzelle erleichtert. Da DCD-Peptide in signifikanten Mengen im Schweiß vorkommen, ist es durchaus möglich, dass diese auch synergistische Wirkungen miteinander aufweisen, um die antimikrobielle Wirkung gegen pathogene Keime auf der Haut zu verstärken.

4.2. Untersuchungen zum Wirkmechanismus von DCD-abgeleiteten Peptiden

Die Fähigkeit von AMPs, sich an Zellmembranen anzulagern und diese zu permeabilisieren, wird in vielen Fällen als genereller Wirkmechanismus gegen Mikroorganismen angesehen (Andreu, D. und Rivas, L. 1998). Daher wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der antimikrobiellen Wirksamkeit der prozessierten DCD-Peptide und der Fähigkeit gibt, Bakterienmembranen zu permeabilisieren.

Untersuchungen zur **Permeabilisierung** von Bakterienmembranen ergaben, dass die getesteten DCD-Peptide DCD-1L, LEK-45, SSL-29, SSL-25 und SSL-23 keine Permeabilisierung von Gram-negativen Bakterien (*E. coli* ML-35p) und auch von Liposomen (DOPC, DOPG) zeigten, die als Modelmembranen für die Phospholipiddoppelschicht von Bakterien dienen. Auch führten sowohl das anionische DCD-1L als auch das kationische SSL-23 zu keiner elektronenmikroskopisch sichtbaren Schädigung der bakteriellen Zellmembran in Form einer Membranausstülpung. Dagegen wurde die Fähigkeit von LL-37 nachgewiesen, Bakterien und Liposomen schon in wenigen Minuten zu permeabilisieren. Für den Wirtsorganismus ist es lebenswichtig, dass bakterielle Membranen selektiv geschädigt werden, während die Zellen des Wirtes möglichst unbeeinflusst bleiben. Untersuchung zur zytotoxischen Wirkung von DCD-Peptiden auf Erythrozyten ergaben keine Permeabilisierung bzw. Hämolyse bis zu einer Peptidkonzentration von 200 μ g/ml. In einer weiteren Veröffentlichung wurde dieses Ergebnis für DCD-1L bis zu einer Peptidkonzentration von 500 μ g/ml (105 μ M) bestätigt (Lai, Y. P. et al. 2005). Für das Cathelicidin LL-37 wurde eine antimikrobielle Aktivität auf Bakterien (2-5 μ M) und in

höheren Konzentrationen ($>13\mu\text{M}$) eine zytotoxische Wirkung auf Säugetierzellen nachgewiesen (Gennaro, R. und Zanetti, M. 2000; Johansson, J. et al. 1998).

Anhand von immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte eine Anlagerung von DCD-1 in Form von Clustern an die Außenseite der Gram-positiven Bakterienmembran von *S. aureus* gezeigt werden. Dagegen konnte im Zytoplasma kein DCD-1-Peptid nachgewiesen werden. Zusammengefaßt ergibt sich aus den Membranpermeabilisierungs-Untersuchungen, dass der antimikrobielle Wirkmechanismus der DCD-Peptide nicht in der Permeabilisierung der Bakterienmembran besteht.

Für einige AMPs konnte neben der permeabilisierenden Wirkung auf Bakterienmembranen die Bindung an **intrazelluläre Zielstrukturen**, wie Nukleinsäuren, Enzyme oder Rezeptoren nachgewiesen werden. Entsprechend sind AMPs durchaus in der Lage die Bakterienmembran, ohne diese offensichtlich zu beschädigen, zu durchwandern (Futaki, S. et al. 2003), um letztendlich im Zytoplasma der Bakterien über die Bindung an solche Zielstrukturen bestimmte essentielle Funktionen zu inhibieren. Es wurde für einige Peptide beschrieben, dass der Verlust des Membranpotentials, induziert durch Membranpermeabilisierung, nicht *per se* zum Zelltod führt (Koo, S. P. et al. 2001). So wurde für das α -helikale Buforin II (21AS) gezeigt, dass es durch die Bakterienmembran penetriert, um dann im Zytoplasma an Nukleinsäuren zu binden (Park, C. B. et al. 2000). Als Schlüsselstruktur für diese Fähigkeit wird das Vorhandensein von Prolin in der Peptidsequenz diskutiert, da Analoge ohne dieses Prolin nicht im Zytoplasma zu finden waren sondern an der Zelloberfläche der Bakterien. Ähnlich zu Buforin tötet auch α -Defensin-1 in einem langsamen Prozeß (1-2h) die Bakterien, indem es die Protein- und DNA-Synthese im Zellinneren hemmt (Xiong, Y. Q. et al. 1999). Auch das aus dem Frosch isolierte α -helikale AMP Dermaseptin verursacht eine geringe Permeabilisierung der Bakterienmembran und inhibiert die RNA-Synthese des Bakteriums innerhalb von 5 Minuten (Patrzykat, A. et al. 2002). Weiterhin wurde für das prolin- und argininreiche Apidaecin (13AS) aus der Honigbiene (Boman, H. G. 1995) gezeigt, dass es über mehrere Schritte in das Zytoplasma des Bakteriums gelangt (Castle, M. et al. 1999). So heftet sich das kationische Peptid erst unspezifisch an die Außenmembran und gelangt ins Periplasma, wo es dort an ein membrangebundenes Rezeptormolekül irreversibel bindet. Schließlich wird das Rezeptor-gebundene Peptid ins Zytoplasma überführt, um dort in die Proteinsynthese des Bakteriums einzugreifen. Wie auch die anderen kurzen Prolin-reichen Peptide Pyrrhocoricin und Drosocin bindet Apidaecin spezifisch an das 70kDa große Hitzeschock-Protein DnaK, so dass dessen Funktion inhibiert wird (Otvos, L., Jr. et al. 2000). Die Folge

ist, dass dessen ATPase Funktion inaktiviert wird und keine korrekte Faltung der vom Bakterium synthetisierten Proteine mehr stattfindet.

Der Einfluß von bestimmten **Modifikationen in der Bakterienmembran** oder in der Biofilmbildung von Bakterien auf die antimikrobielle Aktivität wurde für kationische antimikrobielle Peptide (CAMPs) wie α -Defensine, Protegrine PG3, PG5 und Magainin II beschrieben (Peschel, A. et al. 2001; Peschel, A. et al. 2000; Vuong, C. et al. 2004; Gotz, F. 2002). Diese Modifikationen beinhalten einen zusätzlichen Einbau von positiv geladenen Molekülen und bewirken dadurch eine elektrostatische Abstoßung von CAMPs. Die Bakterienmutanten, die diese Modifikationen nicht tragen, zeigen generell eine erhöhte Sensitivität gegenüber kationischen Peptiden.

Die Untersuchungen ergaben, dass die *S. aureus*-Mutanten *mprF* und *dltA* im Vergleich zum Wildtyp-Stamm sensibler gegenüber kationischen (SSL-23) als auch anionischen (DCD-1L) DCD-Peptiden reagierten. Besonders sensitiv reagierte die *dltA*-Mutante auf das anionische Peptid DCD-1L. Daher scheint das Fehlen der Membran-Modifikation von Phosphatidylglycerol in der Bakterienmembran mit D-Alanin die Sensitivität der DCD-Peptide zu erhöhen. Somit spielt möglicherweise die ladungsabhängige Interaktion von DCD-Peptiden mit der negativ geladenen Bakterienmembran für die antimikrobielle Wirksamkeit eine Rolle.

Antimikrobielle Tests mit der *S. epidermidis*-Mutante, welche durch eine Mutation innerhalb des *ica*-Operons eine verminderte Biofilmbildung zeigt, ergab keine erhöhte Sensitivität gegenüber dem anionischen DCD-1L-Peptid. Vielmehr schien die *ica*-Mutante weniger sensitiv als der dazugehörige Wildtyp-Stamm auf DCD-1L zu sein. Daher scheint das positiv geladene Schleimpolymer namens PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) (Mack, D. et al. 1996), welches für die Adhäsion der Zelle bei der Biofilmbildung verantwortlich ist, die antimikrobielle Wirkung von DCD-1L zu beeinflussen.

Diesbezüglich wurde für DCD-1L beschrieben, dass durch erhöhte Salzkonzentrationen von 150mM NaCl in 10mM Natriumphosphatpuffer die *ica*-Mutante eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp-Stamm gegenüber DCD-1L aufwies (Vuong, C. et al. 2004). Hingegen unter salzfreien Pufferbedingungen (10mM NAPB, pH 7,0) wurde kein Unterschied in der antimikrobiellen Wirkung von DCD-1L festgestellt (Vuong, C. et al. 2004). Bemerkenswert ist hierbei, dass die kationischen Peptide β -Defensin-3 und LL-37 sowohl in hohen NaCl Konzentrationen (150mM) als auch unter salzfreien Bedingungen eine erhöhte antimikrobielle Aktivität gegenüber der *ica*-Mutante aufwiesen. Weiterhin war in hohen Salzkonzentrationen die antimikrobielle Aktivität der CAMPs

sowohl gegen die Mutante als auch gegen den Wildtyp geringer als unter salzfreien Bedingungen, wohin hingegen das anionische DCD-1L unter beiden Pufferbedingungen eine gleichbleibende Aktivität gegen den Wildtyp-Stamm zeigte (Vuong, C. et al. 2004). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die einwertigen Na^+ -Ionen, welche durch die Zytoplasmamembran ins Zellinnere der Bakterien frei diffundieren können, die antimikrobielle Wirkung von DCD-1L gegen die *ica*-Mutante verstärken.

Einerseits zeigen die Befunde, dass generell die *ica*-Mutante mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber verschiedenen CAMPs aufgrund von erhöhten elektrostatischen Wechselwirkungen reagiert (Vuong, C. et al. 2004; Gotz, F. 2002). Diesbezüglich vermindern einwertige Na^+ -Ionen die antimikrobielle Wirkung der Peptide. Andererseits weisen die Daten darauf hin, dass das anionische Peptid DCD-1L mit erhöhter Konzentration an einwertigen Na^+ -Ionen eine gesteigerte antimikrobielle Wirkung auf die *ica*-Mutante zeigt. Daraus lässt sich ableiten, dass möglicherweise der Schutzmechanismus von *S. epidermidis* gegen das anionische DCD-1L nicht auf einer elektrostatischen Abstoßung beruht.

Interessanterweise konnte für DCD-1L keine antimikrobielle Aktivität auf *P. aeruginosa* (nicht-mukoide Form) bis zu einer Konzentration von $200\mu\text{g/ml}$ ($42\mu\text{M}$) festgestellt werden. Diese **Resistenz** könnte zum weiteren Verständnis für den Wirkmechanismus beitragen. Es wurde für *P. aeruginosa* beschrieben, dass durch den Einbau von Aminoarabinose in Lipid A die ladungsabhängige Interaktion mit CAMPs vermindert wird (Peschel, A. 2002). Außerdem können durch Modifikationen von Lipid A durch 2-Hydroxymyristinsäure oder Palmitinsäuren die hydrophoben Interaktionen der AMPs mit der Membran verringert und auch ausgeschlossen werden (Guo, L. et al. 1998; Ernst, R. K. et al. 1999; McPhee, J. B. et al. 2003). Da anscheinend für das anionische DCD-1L keine ladungsabhängige Interaktion mit der Bakterienmembran vorliegt, wäre eine Anlagerung des amphipathischen Peptids an die Bakterienmembran über hydrophobe Wechselwirkung durchaus möglich.

Für viele AMPs wie Magainin (Macias, E. A. et al. 1990; Matsuzaki, K. 1999), Cecropin (De Lucca, A. J. et al. 1995) und Polymyxin (Srimal, S. et al. 1996); (Thomas, C. J. et al. 1999) konnte eine Wechselwirkung mit LPS bzw. mit Lipid A nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist dabei, dass eine Enterobakterium-Mutante, welche eine defekte Außenmembran aufwies, im Vergleich zum Wildtyp für Polymyxin resistent war, hingegen Cecropin B weiterhin antimikrobiell aktiv war (Vaara, M. und Vaara, T. 1994). Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass die beiden AMPs an verschiedene Zielstrukturen an

der äußeren Bakterienmembran binden. Desweiteren binden die Lantibiotika Nisin und Mersacidin das bakterielle membrangebundene Lipid II, welches in der Peptidoglykan-Synthese involviert ist (Brotz, H. et al. 1998). Diese Befunde verdeutlichen, dass es zu spezifischen Interaktionen von AMPs mit Komponenten der Bakterienmembran kommt.

Ein weiterer Resistenzmechanismus von *P. aeruginosa* gegen die DCD-Peptide könnte in der Produktion von extrazellulären Proteasen bestehen, welche als Virulenz- bzw. als Pathogenitäts-Faktoren bei Infektionen eine wichtige Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl LL-37 (Schmidtchen, A. et al. 2002) als auch Cecropin in Insekten (Jarosz, J. 1997) durch die LasB-Elastase von *P. aeruginosa* degradiert werden und die Expression dieser Elastase *ex vivo* zu einer höheren Überlebensrate von *P. aeruginosa* führt (Schmidtchen, A. et al. 2002). *S. aureus* verfügt dagegen über die Metalloproteinase Aureolysin, welche LL-37 konzentrations- und zeitabhängig inaktivieren kann (Sieprawska-Lupa, M. et al. 2004). Die Expression dieser Virulenzfaktoren wird über das „**Quorum-Sensing**“-System des jeweiligen Keimes gesteuert. Dieses System ermöglicht es den Bakterien, Änderungen ihrer Umwelt wahrzunehmen und entsprechend zu reagieren. Für *P. aeruginosa* konnten bisher zwei, zum Teil interagierende Systeme des „*Quorum-Sensing*“, (*las*-System und *rhl*-System) identifiziert werden. Das *las*-System reguliert die Synthese verschiedener Virulenzfaktoren wie LasB-Elastase (Toder, D. S. et al. 1991) LasA Elastase (Passador, L. et al. 1993), alkalische Proteasen und Exotoxin A (Gambello, M. J. et al. 1993). Daneben aktiviert es die Gene *xcpP* und *xcpR*, welche die Proteine des Sekretionsapparates kodieren (Chapon-Herve, V. et al. 1997). Das *rhl*-System ist für die Synthese von Rhamnolipiden (Pearson, J. P. et al. 1997), LasB-Elastase (Brint, J. M. und Ohman, D. E. 1995), LasA-Protease (Winson, M. K. et al. 1995), Pyocyanin (Ochsner, U. A. und Reiser, J. 1995), Cyanide (Pearson, J. P. et al. 1997), Lektine (Winzer, K. et al. 2000) und alkalische Protease (Pessi, G. und Haas, D. 2000) von Bedeutung. Kürzlich konnte für *S. epidermidis* unter suboptimalen Wachstumsbedingungen nachgewiesen werden, dass das Virulenzgen *agr* als Teil des „*Quorum-Sensing*“-Systems eine entscheidende Rolle in der Hochregulierung von zahlreichen Virulenz-, Streß- und Überlebens-Faktoren und in der Herunterregulation von Prozessen einnimmt, die die Zellteilung und Translation betreffen (Yao, Y. et al. 2006). Außerdem wird dieses Gen während der Biofilmbildung hochreguliert (Vuong, C. et al. 2000) und spielt als Resistenzgen gegen AMPs eine entscheidende Rolle (Yao, Y. et al. 2006). So wurde für eine *arg*-defizienten Mutante von *S. epidermidis* eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem

anionischen Peptid DCD-1L und den kationischen Peptiden LL-37 und β -Defensin-3 festgestellt (Yao, Y. et al. 2006).

Für viele CAMPs nimmt die Wirksamkeit mit steigender **Ionenkonzentration** des Mediums ab. Einwertige Kationen wie Na^+ haben offensichtlich nur minimalen Einfluss, während eine Zunahme an zweiwertigen Kationen eine starke Abnahme der antimikrobiellen Aktivität gegen Mikroorganismen bewirkt (Garcia, J. R. et al. 2001b; Valore, E. V. et al. 1998; Goldman, M. J. et al. 1997). Dieser Befund läßt sich mit einem Modell erklären, das für Gram-negative Bakterien postuliert wurde. Dieses Modell besagt, dass kationische Peptide durch ihre Bindung an das negativ geladene bakterielle LPS die für die Stabilität der Bakterienoberfläche essentiellen zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} von ihren Bindestellen verdrängen und so die Integrität der äußeren Membran zerstören (Hancock, R. E. und Scott, M. G. 2000). Dies zeigt sich insbesondere in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Membranausstülpung. Da die CAMPs mit den Kationen um deren Bindungsstellen in der äußeren Membran konkurrieren (van 't, Hof W. et al. 2001), würde sich die mit zunehmender Konzentration an Kationen abnehmende Aktivität der Peptide erklären, da diese nur noch begrenzt mit der Bakterienmembran interagieren können. Hingegen wurde für die anionischen DCD-Peptide DCD-1L und DCD-1 eine antimikrobielle Wirkung auch unter schweiß-ähnlichen physiologischen Bedingungen, die auch zweiwertige Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} (1mM) beinhalten, festgestellt (Schitteck, B. et al. 2001). Insofern wird die antimikrobielle Aktivität dieser DCD-Peptide nicht von zweiwertigen Kationen beeinflusst. Desweiteren wurde vor kurzem beschrieben, dass Carbonat-Anionen (HCO_3^-) die Sensitivität von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien gegenüber verschiedenen CAMPs erheblich erhöhen (Dorschner, R. A. et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass die gesteigerte antimikrobielle Aktivität der Peptide LL-37, CRAMP, PR-39 murines α -Defensin Cryptdin-4 und β -Defensin-2 nicht auf deren Strukturänderung durch Carbonat-Anionen basiert, sondern auf der veränderten Genregulation des jeweiligen Bakteriums. So bewirkte die Anwesenheit von 25mM NaHCO_3 im Medium eine Abnahme der Bakterienmembrandicke und somit eine erhöhte Membranaktivität der kationischen Peptide. Hingegen wurde für das anionische DCD-1L keine erhöhte antimikrobielle Aktivität auf die Mikroorganismen in Anwesenheit von Carbonat-Anionen festgestellt (Dorschner, R. A. et al. 2006). Insofern wird die antimikrobielle Wirksamkeit von DCD-1L nicht von Carbonat-Anionen und auch nicht durch die dadurch hervorgerufene veränderte Genregulation des Bakteriums beeinflusst. Dieser Befund ist

insofern für die antimikrobielle Wirkung von DCD-1L wichtig, da Schweiß unter anderem aus den Elektrolyten Na^+ , K^+ , HCO_3^- und NH_4^+ besteht.

4.3. Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung

Struktur-Wirkungsuntersuchungen von AMPs stellen eine geeignete Vorgehensweise dar, um einen Beitrag zur Aufklärung zum Wirkmechanismus zu leisten. Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welche Peptidstruktur für die antimikrobielle Aktivität der DCD-Peptide notwendig ist. Die CD-Messungen zeigten, dass alle DCD-Peptide eine α -helikale Konformation in dem helixinduzierenden Lösungsmittel TFE einnehmen können. Unter Pufferbedingungen, in denen eine antimikrobielle Aktivität der DCD-Peptide nachgewiesen wurde, zeigten die Peptide vorwiegend eine ungeordnete Zufallsknäuel-Struktur (>50%) und keinen α -helikalen Charakter. Bei CD-Messungen von DCD-Peptiden mit artifiziellen Liposomen, welche als Modell für die Phospholipid-doppelschicht von Bakterien verwendet wurden, kam es zu keiner Induzierung von Strukturelementen bis über einen Zeitraum von 2 Stunden. Jedoch erhöhte sich der α -helikale Anteil von LL-37 in kurzer Zeit durch Zugabe der Liposomen (DOPG/DOPC), die eine erhöhte negative Ladung besitzen. Dagegen konnte eine Erhöhung des α -helikalen Anteils von LL-37 durch Liposomen mit neutraler Nettoladung (DOPC) nicht beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass das Maß der α -helikalen Strukturausbildung von LL-37 mit der beobachteten antimikrobiellen Aktivität korreliert (Oren, Z. et al. 1999). Die gleichen Effekte von negativ (POPG) und neutral (POPC) geladenen Liposomen auf die Permeabilisierung wurde auch für das bovine Cathelicidin Indolicidin beobachtet (Falla, T. J. et al. 1996; Jing, W. et al. 2003). Daher bestimmt die Zusammensetzung der Lipidmatrix die Wechselwirkung mit den kationischen Peptiden LL-37 und Indolicidin, was insbesondere auf den Einfluß der Oberflächenladung der Liposomen zurückzuführen ist. Die ladungsabhängige Interaktion spielt eine entscheidende Rolle für die Wechselwirkung mit den Liposomen und für die anschließende Induzierung der α -helikalen Struktur von LL-37 (Johansson, J. et al. 1998; Turner, J. et al. 1998).

Insgesamt zeigen diese Daten, dass für die DCD-Peptide im Gegensatz zu LL-37 keine Korrelation zwischen ihrer antimikrobiellen Aktivität und ihrer eingenommenen Struktur vorhanden ist. Jedoch spiegeln die verwendeten Liposomen nur eine beschränkte Phospholipidkomposition wider und waren frei von Lipopolysacchariden oder von Teichonsäuren. Dies könnte möglicherweise erklären, warum keine Wechselwirkungen in Form einer induzierten Strukturänderung von DCD-Peptiden nachgewiesen wurden.

Allgemein können AMPs neben einer α -helikalen Sekundärstruktur andere Strukturen einnehmen, die zu ihrer antimikrobiellen Aktivität beitragen (Brogden, K. A. 2005). Meist weisen die AMPs in Lösung eine ungeordnete Struktur auf und werden erst durch Bindung an die Bakterienmembran veranlaßt, eine geordnete Struktur anzunehmen (Falla, T. J. et al. 1996; Vogel, H. und Jahnig, F. 1986). So wurde für Indolicidin nachgewiesen, dass es eine ungeordnete Struktur in wäßriger Umgebung jedoch in Anwesenheit von SDS oder Lipiddoppelschichten eine geordnete, aber nicht α -helikale Struktur einnimmt (Ladokhin, A. S. et al. 1997). Weiterhin zeigt Tachyplesin keine amphipathische Struktur unter bestimmten Pufferbedingungen (20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8.0), wird jedoch durch Liposomen (Phosphatidylcholine) veranlaßt, eine amphipathische Struktur einzunehmen (Oishi, O. et al. 1997). Für LL-37 bewirken sowohl Anionen wie 15mM HCO_3^- , SO_4^{2-} oder CF_3CO_2^- als auch Lipid A einen Übergang von einer ungeordneten Struktur in eine α -helikale Struktur (Johansson, J. et al. 1998; Turner, J. et al. 1998). Diese Beispiele zeigen, dass die unmittelbare Umgebung der Peptide, sei es Komponenten der äußeren Bakterienmembran oder die umgebenen Ionen, entscheidend zur Konformation der Peptide und der Wechselwirkung mit der Bakterienmembran beitragen können.

Als strukturelle Voraussetzung zur Interaktion mit der Bakterienmembran wird für viele AMPs der **hydrophobe und amphipathische Charakter** als maßgeblich angesehen (Hancock, R. E. und Chapple, D. S. 1999). In dieser Arbeit zeigten eine Hydrophilizitätsanalyse der Aminosäuresequenz von DCD (nach Kyte Doolittle) und die Projektion der hydrophoben und hydrophilen Bereiche der DCD-1L-Sequenz in einem sog. Helixrad, dass die C-terminalen DCD-Peptide (AS-Positionen zw. 63-110) einen ausgeprägten amphipathische Charakter besitzen. Hingegen wiesen die N-terminal abgeleiteten Peptide wie YDP-42 (AS-Position: 20-61), Y-P30 (AS-Position: 20-49) und PIF (*proteolysis inducing factor*, AS-Position: 20-39) einen ausschließlich hydrophilen und keinen amphipathischen Charakter auf.

Ein wichtiger initialer Schritt zur Bindung an die Bakterienmembran ist generell die elektrostatische Wechselwirkung zwischen kationischen AMPs und anionischen Phospholipidmembranen. Da anscheinend für anionisch geladene Peptide die Voraussetzung für eine solche elektrostatische Wechselwirkung nicht vorhanden ist, wurde für die anionischen Peptide *Amblyomma* Defensin-1 und *Amblyomma* Defensin-2 angenommen, dass diese über den positiv geladenen und hydrophoben Bereich am C-Terminus mit der Bakterienmembran interagieren (Lai, R. et al. 2004). Ein vergleichbare Mechanismus könnte auch für die C-terminal abgeleiteten DCD-Peptide vorliegen. Im Gegensatz zum

DCD-1L zeigte das um drei N-terminale Aminosäuren (SSL) verkürzte Peptid LEK-45 keine antimikrobielle Aktivität auf verschiedenen Mikroorganismen. Möglicherweise sind diese drei N-terminalen kationischen Aminosäurereste als sog. polarer Anker (besitzen hydrophilen Charakter nach Kyte Doolittle) für eine elektrostatische Bindung an die negativ geladenen Kopfgruppen von Phospholipiden verantwortlich. Diese Bindung ermöglicht es den DCD-Peptiden, sich an der Membranoberfläche festzusetzen und sich auszurichten, was vorzugsweise zu einer Umorientierung der Phospholipid-Kopfgruppen führt. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem hydrophoben Bereich der amphipathischen DCD-Peptide und den Acylketten der Phospholipide würden eine Insertion der Peptide in die Lipiddoppelschicht vorantreiben, wobei eine Störung in der Anordnung der Acylketten hervorgerufen werden würde.

Die kationischen α -helikalen Peptide Magainin (Bechinger, B. et al. 1993), Ovispirin (Yamaguchi, S. et al. 2001) und LL-37 (Henzler Wildman, K. A. et al. 2003) zeigten an Lipiddoppelschichten eine parallel zur Membran ausgerichtete Anordnung. Für das Protegrin (16AS), welches eine β -Faltblattstruktur ausbildet, wurde eine Ausrichtung des Peptids um 55° zur Lipidmembran beobachtet (Yamaguchi, S. et al. 2002). Es kommt diesbezüglich zu einer Interaktion des hydrophoben Rückrads von Protegrin mit dem hydrophoben Kern der Lipiddoppelschicht, so daß der Arginin-reiche, d.h. positiv geladene Teil, der Aminosäuresequenz an die anionischen Phosphatgruppen binden kann.

Durch die **amphipathische Struktur** können sich AMPs in die Phospholipidschicht der Bakterien einlagern und in Komplexen mit mehreren Peptiden Kanäle durch die Membran bilden, sog Transmembranporen. So wurde für das Insekten-Defensin A aus *Phormia terramovae* nachgewiesen, dass es nach elektrostatischer Bindung an die Membran aus Peptid-Oligomeren einen Kanal in der Bakterienmembran ausbildet und damit einen Kalium-Verlust der Bakterienzelle verursacht (Cociancich, S. et al. 1993). Außerdem wurde für das AMP Sapecin aus *Sarcophaga peregrina* gezeigt, dass es über basische und hydrophobe Bereiche der Aminosäuresequenz mit der Membran interagiert, um anschließend über **Oligomerisierung** Membranporen auszubilden (Takeuchi, K. et al. 2004). Daher ist das Zusammenlagern zu Peptid-Komplexen (bzw. Oligomeren oder Aggregaten) ein wichtiger Schritt, auf die strukturelle Ordnung der Membran Einfluß zu nehmen (Oren, Z. et al. 1999; Johansson, J. et al. 1998). Im Rahmen der Untersuchungen zur Peptid-Aggregation wurde festgestellt, dass die synthetischen DCD-Peptide SSL-23 und DCD-1L nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden stabile Aggregate ausbilden können. Hingegen zeigte das Cathelicidin LL-37 ein spontanes bzw. zeitunabhängiges Aggregationsverhalten.

Bemerkenswert ist hierbei, dass die antimikrobielle Wirkung der DCD-Peptide SSL-23 und DCD-1L ebenfalls nach 2 Stunden eintritt. Hingegen tötete LL-37 die Bakterien schon in wenigen Minuten durch Membranpermeabilisierung. Es wurde für LL-37 beschrieben, dass es im Gegensatz zu anderen AMPs wie Cecropin, in sehr geringen Konzentrationen (0,1µM) in Lösung oligomerisiert und mit Phospholipiden assoziiert (Oren, Z. et al. 1999). Weiterhin wurde für β -Defensin-3 angenommen, dass die erhöhte Aktivität auf *Staphylococci* im Vergleich zu den β -Defensinen 1 und 2 im Zusammenhang mit der Ausbildung von Dimeren mit amphipathischen Struktur und der höheren positiven Nettoladung steht (Schibli, D. J. et al. 2002).

Die Bildung von stabilen Peptid-Oligomeren oder Aggregaten könnte *in vivo* (im Schweiß) eine Voraussetzung bzw. ein wichtiger Schritt für eine antimikrobielle Wirkung von DCD-Peptiden sein. In Western Blot Analysen wurden nicht nur SDS-stabile synthetische Peptid-Oligomere sondern auch verschiedene Proteinbanden im menschlichen Schweiß detektiert, welche auf eine mögliche Oligomerisierung oder Aggregation von DCD-Peptiden oder auf eine Assoziation von DCD-Peptiden mit anderen im Schweiß vorkommenden Proteinen deuten. So wurde ein Protein namens PIP (*prolactin inducible protein*) im Schweiß über RP-HPLC isoliert, welches das gleiche hydrophobe Verhalten (gleiche Retentionszeit) wie DCD-1L zeigte. Nachfolgende Immunpräzipitationen ergaben eine mögliche **Assoziation** mit diesem 15kDa großen Protein. PIP, auch als GCDFP-15 (*gross cystic disease fluid protein*) bezeichnet, wird in benignen und malignen Brustkrebs, sowie in Brustkrebs-Metastasenzellen auf RNA-Ebene überexprimiert (Ciullo, M. et al. 2002). Weiterhin kommt PIP als 15kDa großes Glykoprotein in humanen exokrinen Organen wie Schweiß, Speichel und Tränenflüssigkeit vor (Myal, Y. et al. 1991). Die Expression von PIP wird durch die Hormone Prolaktin, welches für die Muttermilchproduktion verantwortlich ist, und Androgen induziert und durch Estrogen inhibiert. Das Gen ist auf Chromosom 7q32-q36 lokalisiert und wurde auch in *Rattus norvegicus* sowie in *Mus musculus* nachgewiesen. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass in invasiven Mammakarzinomzellen auch DCD- RNA überexprimiert wird (Porter, D. et al. 2003). Desweiteren konnte Landgraf (2005) das Transkript des N-terminal abgeleiteten DCD-Peptids Y-P30 in schwangeren Ratten der Gattung *Rattus norvegicus* nachweisen, welches Einfluß auf die Differenzierung von Nervenzellen besitzt. Welche Rolle das über Hormone gesteuerte PIP für die Funktion von DCD-Peptiden spielen könnte, ist bislang unbekannt.

4.4. Expressionsanalyse von DCD

DCD gehört zu einer neuen Klasse antimikrobieller Peptide und hat keine **Homologie** zu bekannten antimikrobiell wirksamen Proteinen wie die Defensine oder Cathelizidine. Die Defensine zeichnen sich durch eine Vielzahl von homologen, aber doch in ihrer Wirkung und Expression unterschiedlichen Mitglieder in anderen Spezies aus. Um nach homologen DCD-Genen beim Menschen, aber auch in anderen Spezies wie Maus, Ratte, Kaninchen und Schwein zu suchen, wurden genomische Southern Blot Analysen dieser Spezies unter nicht-stringenten Bedingungen durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten keine weiteren Gene, welche homolog zu der humanen *DCD*-cDNA wären. Nach Landgraf (Landgraf, P. et al. 2005) wurde in *Rattus norvegicus* ein homologes *DCD*-Gen identifiziert, das zu 100% homolog zum humanem *DCD* sein soll (*genbank accession number*: NM 173108). Über die Genom-Sequenzierungsdatenbank konnte in der Maus und in der Ratte kein *DCD*-Gen identifiziert werden. Im gemeinen Schimpanzen *Pan troglodytes* scheint ein verkürztes homologes *DCD*-Gen vorhanden zu sein (*genbank accession number*: XM 509116.1). Allerdings besteht diese Homologie (>98%) zu einer kodierenden Gensequenz, die sich aus mehreren Teilsequenzen der beim Menschen homologen Gene einer Proteinphosphatase PP1, Lacritin und Dermcidin zusammensetzt. Aus dieser kodierenden Gensequenz wird beim Schimpanzen ein Protein, hingegen beim Menschen drei verschiedene Proteine gebildet. Bei der Maus und der Ratte liegt das Gen für die Proteinphosphatase PP1 am Ende der jeweiligen chromosomalen Bereiche. Da weder Dermcidin noch Lacritin über die Genom-Sequenzierungsdatenbank in der Maus und der Ratte identifiziert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass Dermcidin von den Chromosomenenden deletiert wurde. Weitere Untersuchungen werden bestätigen müssen, inwieweit es homologe *DCD*-Gene in anderen Spezies gibt.

Im Rahmen der **Expressionsanalyse** wurde auf RNA- als auch auf Proteinebene keine Expression von C-terminal abgeleiteten *DCD*-Peptiden in der humanen Schweißdrüsenzelllinie NCL-SG3 festgestellt. Über inflammatorische Stimuli wie TNF α , LPS oder über oxidativen Streß (H₂O₂) konnte die Expression von *DCD*-mRNA in Melanomzelllinien induziert werden (Rieg, S. et al. 2004). Diesbezüglich konnte gezeigt werden, daß etwa 10% von invasiven Mammakarzinomzellen *DCD*- RNA exprimieren (Porter, D. et al. 2003). Die erhöhte *DCD*-RNA-Expression in diesen Zellen förderte das Zellwachstum und das Überleben nach Behandlung mit Menadion, ein Induktor für die Produktion von

mitochondrialer reaktiver Sauerstoff-Spezies ROS (*reactive oxygen species*). Es wurde spekuliert, daß DCD seine Wirkung über eine Bindung an Oberflächenrezeptoren auf den Tumorzellen ausübt, wobei mögliche Rezeptoren bislang noch nicht beschrieben wurden. Weiterhin wurde beschrieben, daß nach oxidativem Stress Tumorzellen proteolytisch prozessierte DCD-Peptide produzieren können, die sich von den C-terminal abgeleiteten DCD-Peptiden sowohl strukturell als auch funktionell unterscheiden. Die im folgenden beschriebenen Peptide stammen vom N-Terminus des volle-Länge DCD-Peptids (110AS) ab, während die antimikrobiell wirksamen DCD-Peptide vom C-Terminus (AS-Positionen zw. 63-110) abstammen. Das Überlebens-fördernde Peptid Y-P30 (AS-Position: 20-49) und das Kachexie-assoziierte Protein PIF (*proteolysis inducing factor*, AS-Position: 20-39). Y-P30 wird von oxidativ gestressten neuronalen Zellen und Retinoblastom-Zelllinien nach Induktion produziert und liefert einen Überlebensvorteil gegenüber den Zellen, die Y-P30 nicht produzieren (Cunningham, T. J. et al. 1998; Cunningham, T. J. et al. 2000). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Y-P30 von mononukleären Zellen von schwangeren Ratten produziert wird, dieses zum Embryo transportiert wird und dort das Überleben und die Differenzierung der Nervenzellen beeinflusst (Landgraf, P. et al. 2005). PIF ist ein sulfiertes Proteoglykan und wurde als ein kachektischer Faktor identifiziert, der von Tumorzellen der Prostata (Wang, Z. et al. 2003), des gastrointestinalen Trakts (Caball-Manzano, R. et al. 2001) und von Melanomzellen (Todorov, P. T. et al. 1999) produziert wird und den Muskelabbau nach Applikation in Mäusen hervorruft (Todorov, P. et al. 1996; Wyke, S. M. und Tisdale, M. J. 2005). Diese Befunde zeigen, dass in verschiedenen Tumorgeweben *DCD*-mRNA exprimiert und das DCD-Peptid weiter prozessiert wird. Anscheinend besitzen die verkürzten N-terminalen DCD-Peptide PIF und Y-P30 funktionelle Bedeutungen in eukaryontischen Zellen. Die Tatsache, dass in Tumorzellen unterschiedlichster Herkunft verschiedene DCD-Peptide wie PIF oder Y-P30 gefunden wurden und diese sich von denen unterscheiden, die von ekkrinen Schweißdrüsen prozessiert werden, deutet darauf hin, dass jeder Zelltyp unterschiedliche Proteasen besitzt, die für die Prozessierung von Dermcidin verantwortlich sind. Ob invasive Mammakarzinomzellen, welche zu 10% die *DCD*- RNA exprimieren (Porter, D. et al. 2003), auch die C-terminal abgeleiteten DCD-Peptide prozessieren können und welche Funktionen diese ausüben, ist weiterhin zu untersuchen.

4.5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die C-terminal abgeleiteten DCD-Peptide unabhängig von ihrer Nettoladung nicht über die Permeabilisierung der Bakterienmembran wirken. Der Wirkmechanismus, der schließlich zum Tode der Bakterien führt, sollte daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Es wäre möglich, dass die C-terminalen DCD-Peptide an bestimmte Membranbestandteile oder/und an Zielstrukturen im Zellinneren binden können, so dass essentielle Funktionen in den Mikroorganismen inhibiert werden. Desweiteren wäre es für die DCD-Expression wichtig zu verstehen, welche Proteasen für die Generierung der sowohl N-terminalen als auch C-terminalen DCD-Peptide verantwortlich sind. Daraus läßt sich unter anderem ableiten, wie die antimikrobiell aktiven C-terminalen Peptide im Schweiß generiert werden. Weiterhin ist die Regulation der DCD-Expression in den ekkrinen Schweißdrüsen und in den neuronalen Zellen sowie Tumorzellen zu untersuchen. Es gibt Hinweise darauf, welche Effekte die N-terminalen Peptide PIF und Y-P30 auf eukaryontische Zellen haben. Unklar ist, welche Funktion Dermcidin und daraus prozessierte Peptide, einschließlich C-terminal abgeleitete DCD-Peptide, auf eukaryontische Zellen im Hinblick auf Zellproliferation, Invasion, Toxizität und Überleben ausüben.

5. Zusammenfassung

Im menschlichem Schweiß werden insgesamt 13 C-terminal abgeleitete Dermcidin (DCD)-Peptide generiert, die sich voneinander sowohl in der Peptidlänge (24 bis 48AS) als auch in ihrer Nettoladung (-2 bis +2) unterscheiden. Das **Ziel dieser Arbeit** war es zu untersuchen, ob sich das antimikrobielle Wirkspektrum der DCD-Peptide voneinander unterscheidet und worin der Wirkmechanismus dieser Peptide gegenüber Bakterien besteht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die DCD-abgeleiteten Peptide unabhängig von ihrer **Nettoladung** konzentrations- und zeitabhängig auf Gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus epidermidis*, methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-sensitiver *Staphylococcus aureus* (MSSA) und auf Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* antimikrobiell wirken. Dagegen wurde für die DCD-Peptide eine stark verminderte antimikrobielle Wirkung gegen *Pseudomonas aeruginosa* festgestellt. Der **minimale Peptidbereich**, der für die antimikrobielle Aktivität notwendig ist, liegt innerhalb der ersten 23 N-terminalen Aminosäuren (mit positiver Nettoladung), wobei die ersten drei Aminosäuren für die antimikrobielle Aktivität essentiell zu sein scheinen. Untersuchungen zur **Peptidstruktur** ergaben, dass alle untersuchten DCD-Peptide einen ausgeprägten amphipatischen Charakter aufweisen und durch TFE eine α -helikale Struktur einnehmen können. In Natriumphosphatpuffer liegen die DCD-Peptide ungeordnet vor. Es konnte keine Korrelation zwischen der eingenommenen Peptidstruktur und der antimikrobiellen Aktivität festgestellt werden.

Untersuchungen zur **Permeabilisierung** der inneren und äußeren Membran von *E. coli* ML-35p sowie von Liposomen und der Membran von Erythrozyten zeigten, dass die DCD-abgeleiteten Peptide keine permeabilisierende Wirkung auf Bakterienmembranen, Liposomen sowie auf Erythrozyten im getesteten Konzentrationsbereich haben. Ebenso lassen elektronenmikroskopische Aufnahmen keine erkennbaren Membranschädigungen der Bakterien erkennen, die mit DCD-Peptiden behandelt wurden. Interessanterweise zeigten immunoelektronenmikroskopische Analysen, dass DCD-1 in Clustern an der Bakterienmembran bindet. Im Gegensatz zu den DCD-Peptiden interagierte das Cathelicidin LL-37 ladungsabhängig mit negativ geladenen Liposomen und tötete die Bakterien in kurzer Zeit über Membranpermeabilisierung.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die antimikrobiell aktiven DCD-abgeleiteten Peptide unabhängig von ihrer Nettoladung und ohne Schädigung der Bakterienmembran die Bakterien abtöten.

6. Anhang

6.1 Danksagung

„Ohne Schweiß kein Preis“



An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn **Prof. Dr. med. Claus Garbe** möchte ich für die Möglichkeit danken, dass ich meine wissenschaftliche Arbeit in seiner Abteilung, Dermatologische Onkologie, an der Universitäts-Hautklinik-Tübingen (UKT) durchführen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Frau **PD Dr. Birgit Schittek**, Leiterin der Laborgruppe, für die Vergabe des interessanten Themas, ihr großes Interesse an dieser Arbeit, für die konstruktive Kritikbereitschaft sowie die Unterstützung beim Verfassen der Publikationen.

Herrn **Prof. Dr. Friedrich Götz** gilt mein ganz spezieller Dank für die freundliche und entspannte Betreuung während der Erstellung meiner Arbeit sowie für die Übernahme meiner Doktorarbeit als Doktorvater bzw. als Erstprüfer.

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn **Dr. Hubert Kalbacher** und seinen Mitarbeitern für die Bereitstellung der untersuchten Peptide bedanken. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit in diesem Rahmen nicht zustande gekommen. Zudem danke ich Herrn Dr. Siegbert Rieg aus der Hautklinik für die gute Kooperationsbereitschaft.

Weiterhin gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. h.c. mult. Wolfgang Voelter, der mir die Nutzung des CD-Spektrometers ermöglichte. Außerdem danke ich Herrn PD Dr. Stefan Stefanovic für die Aufnahme der Massenspektren und Herrn Dr. Martin Deeg für die bereitwillige Übernahme der Peptidaufreinigung und der qualitativen Analyse der Peptide über ESI-MS.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg. Sahl, Leiter des Instituts für med. Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn, danke ich sehr für die erfolgreiche Unterstützung bei der Durchführung der CF-Efflux-Experimente. In seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich besonders bei Imke Wiedemann und Raquel Regina Bonelli für die besonders freundliche Betreuung bedanken.

Vor allem möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Arbeitskollegen/-innen bedanken, die stets für eine angenehme und fördernde Arbeitsatmosphäre sorgten und bei allen fachlichen und außerfachlichen Belangen hilfreich zur Seite standen. Besonders die Kaffeepausen mit Tobias haben mich in so mancher ausweglosen Situation wieder ermutigen und inspirieren können. Auch Bibo und Evi möchte ich für ihre bereitwillige Unterstützung in methodischen Fragen und in der Durchführung der Zellkultur bedanken.

Besonders durch so manchen Plausch wurde das manchmal dunkle Laborleben mit einem kurzlebigen Licht erhellt.

Für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung der gezeigten Untersuchungen danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 510/3-1 und 3-2). Besonders herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, weil sie mir jede Unterstützung gegeben haben, die man sich von seiner Familie nur wünschen kann.

6.2 Publikationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht und teilweise auf Kongressen als Poster vorgestellt:

- 1. Naturally processed Dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge**
Steffen H, Rieg S, Wiedemann I, Kalbacher H, Deeg M, Sahl H-G, Peschel A, Götz F, Garbe C and Schitteck B. *Antimicrob. Agents Chemother* 2006. in press
- 2. Generation of multiple stable Dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of different body sites**
Rieg S, Seeber S, Steffen H, Humeny A, Kalbacher H, Stevanovic S, Kimura A, Garbe C, Schitteck B. *J Invest Dermatol.* 2005 Dec 22
- 3. Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of DCD-1L**
Baechle D, Flad T, Cansier A, Steffen H, Schitteck B, Tolson J, Herrmann T, Dihazi H, Beck A, Mueller GA, Mueller M, Stevanovic S, Garbe C, Mueller CA, Kalbacher H. *J Biol Chem.* 2005 Dec 14
- 4. Deficiency of Dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo**
Rieg S, Steffen H, Seeber S, Humeny A, Kalbacher H, Dietz K, Garbe C, Schitteck B. *J Immunol.* 2005 Jun 15

Poster:

Naturally processed Dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge
Steffen H, Rieg S, Wiedemann I, Kalbacher H, Deeg M, Sahl H-G, Peschel A, Götz F, Garbe C, Schitteck B. Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung (ADF), Aachen (Poster). *Arch. Dermatol. Res.* (2006) 294:485 (Abstract: P054)

Structural requirements and mechanism of antimicrobial activity of Dermcidin-derived peptides
Steffen H, Rieg S, Kalbacher H, Wiedemann I, Sahl H-G, Peschel A, Garbe C, Schitteck B. Kongress **ESDR** (*european society for dermatological research*), Tübingen (Poster), *JID* (2005) 125:3 (Abstract: P181)

7. Literaturverzeichnis

1. **Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jornvall, H., Wigzell, H., and Gudmundsson, G. H.** (2000) The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* **96**:3086-3093.
2. **Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G., and Gudmundsson, G. H.** (1995) FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**:195-199.
3. **Ahmed, A. A., Nordlind, K., Schultzberg, M., and Liden, S.** (1994) Interleukin-1 alpha- and beta-, interleukin-6- and tumour necrosis factor-alpha-like immunoreactivities in chronic granulomatous skin conditions. *Acta Derm.Venereol.* **74**:435-440.
4. **Ahmed, A. A., Nordlind, K., Schultzberg, M., and Liden, S.** (1996) Proinflammatory cytokines and their corresponding receptor proteins in eccrine sweat glands in normal and cutaneous leishmaniasis human skin. An immunohistochemical study. *Exp.Dermatol.* **5**:230-235.
5. **Ali, R. S., Falconer, A., Ikram, M., Bissett, C. E., Cerio, R., and Quinn, A. G.** (2001) Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J.Invest.Dermatol.* **117**:106-111.
6. **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
7. **Andreu, D. and Rivas, L.** (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* **47**:415-433.
8. **Aumelas, A., Mangoni, M., Roumestand, C., Chiche, L., Despaux, E., Grassy, G., Calas, B., and Chavanieu, A.** (1996) Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur.J.Biochem.* **237**:575-583.
9. **Baechle, D., Flad, T., Cansier, A., Steffen, H., Schitteck, B., Tolson, J., Herrmann, T., Dihazi, H., Beck, A., Mueller, G. A., Mueller, M., Stevanovic, S., Garbe, C., Mueller, C. A., and Kalbacher, H.** (2006) Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L. *J.Biol.Chem.* **281**:5406-5415.
10. **Bals, R.** (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir.Res.* **1**:141-150.
11. **Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., and Wilson, J. M.** (1998a) Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J.Clin.Invest.* **102**:874-880.
12. **Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., and Wilson, J. M.** (4-8-1998b) The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**:9541-9546.
13. **Bals, R. and Wilson, J. M.** (2003) Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol.Life Sci.* **60**:711-720.
14. **Barbault, F., Landon, C., Guenneugues, M., Meyer, J. P., Schott, V., Dimarcq, J. L., and Vovelle, F.** (2003) Solution structure of Alo-3: a new knottin-type antifungal peptide from the insect *Acrocinus longimanus*. *Biochemistry* **42**:14434-14442.
15. **Bauer, F., Schweimer, K., Kluver, E., Conejo-Garcia, J. R., Forssmann, W. G., Rosch, P., Adermann, K., and Sticht, H.** (2001) Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci.* **10**:2470-2479.

16. **Bayer, A. S., Prasad, R., Chandra, J., Koul, A., Smriti, M., Varma, A., Skurray, R. A., Firth, N., Brown, M. H., Koo, S. P., and Yeaman, M. R.** (2000) In vitro resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity. *Infect.Immun.* **68**:3548-3553.
17. **Bechinger, B.** (1999) The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim.Biophys.Acta* **1462**:157-183.
18. **Bechinger, B., Zasloff, M., and Opella, S. J.** (1993) Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.* **2**:2077-2084.
19. **Beisswenger, C. and Bals, R.** (2005) Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. *Curr.Protein Pept.Sci.* **6**:255-264.
20. **Belden, W. J. and Miller, S. I.** (1994) Further characterization of the PhoP regulon: identification of new PhoP-activated virulence loci. *Infect.Immun.* **62**:5095-5101.
21. **Bensch, K. W., Raida, M., Magert, H. J., Schulz-Knappe, P., and Forssmann, W. G.** (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* **368**:331-335.
22. **Bierbaum, G. and Sahl, H. G.** (1987) Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J.Bacteriol.* **169**:5452-5458.
23. **Bohlmann, H., Clausen, S., Behnke, S., Giese, H., Hiller, C., Reimann-Philipp, U., Schrader, G., Barkholt, V., and Apel, K.** (1988) Leaf-specific thionins of barley-a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. *EMBO J.* **7**:1559-1565.
24. **Boman, H. G.** (1991) Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* **65**:205-207.
25. **Boman, H. G.** (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu.Rev.Immunol.* **13**:61-92.
26. **Boman, H. G., Agerberth, B., and Boman, A.** (1993) Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect.Immun.* **61**:2978-2984.
27. **Boulanger, N., Munks, R. J., Hamilton, J. V., Vovelle, F., Brun, R., Lehane, M. J., and Bulet, P.** (2002) Epithelial innate immunity. A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *J.Biol.Chem.* **277**:49921-49926.
28. **Brint, J. M. and Ohman, D. E.** (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J.Bacteriol.* **177**:7155-7163.
29. **Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P., and Osborn, R. W.** (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol* **108**:1353-1358.
30. **Brogden, K. A.** (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat.Rev.Microbiol.* **3**:238-250.
31. **Brogden, K. A., De Lucca, A. J., Bland, J., and Elliott, S.** (1996) Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:412-416.
32. **Brotz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P. E., and Sahl, H. G.** (1998) The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**:154-160.
33. **Bulet, P. and Stocklin, R.** (2005) Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept.Lett.* **12**:3-11.
34. **Bulet, P., Stocklin, R., and Menin, L.** (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol.Rev.* **198**:169-184.

35. **Cabal-Manzano, R., Bhargava, P., Torres-Duarte, A., Marshall, J., Bhargava, P., and Wainer, I. W.** (2001) Proteolysis-inducing factor is expressed in tumours of patients with gastrointestinal cancers and correlates with weight loss. *Br.J.Cancer* **84**:1599-1601.
36. **Castle, M., Nazarian, A., Yi, S. S., and Tempst, P.** (1999) Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *J.Biol.Chem.* **274**:32555-32564.
37. **Castro, M. S. and Fontes, W.** (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept.Lett.* **12**:13-18.
38. **Chapon-Herve, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A., and Bally, M.** (1997) Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol.Microbiol.* **24**:1169-1178.
39. **Chen, V. L., France, D. S., and Martinelli, G. P.** (1986) De novo synthesis of lysozyme by human epidermal cells. *J.Invest Dermatol.* **87**:585-587.
40. **Chen, X., Niyonsaba, F., Ushio, H., Okuda, D., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H.** (2005) Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J.Dermatol.Sci.* **40**:123-132.
41. **Cipakova, I., Gasperik, J., and Hostinova, E.** (2005) Expression and purification of human antimicrobial peptide, dermcidin, in *Escherichia coli*. *Protein Expr.Purif.*
42. **Ciullo, M., Debily, M. A., Rozier, L., Autiero, M., Billault, A., Mayau, V., El Marhomy, S., Guardiola, J., Bernheim, A., Coullin, P., Piatier-Tonneau, D., and Debatisse, M.** (2002) Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA7I. *Hum.Mol.Genet.* **11**:2887-2894.
43. **Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J. A., and Letellier, L.** (1993) Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J.Biol.Chem.* **268**:19239-19245.
44. **Corzo, G., Villegas, E., Gomez-Lagunas, F., Possani, L. D., Belokoneva, O. S., and Nakajima, T.** (2002) Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *J.Biol.Chem.* **277**:23627-23637.
45. **Cowland, J. B., Johnsen, A. H., and Borregaard, N.** (1995) hCAP-18, a cathelin/probactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.* **368**:173-176.
46. **Cunningham, T. J., Hodge, L., Speicher, D., Reim, D., Tyler-Polsz, C., Levitt, P., Eagleson, K., Kennedy, S., and Wang, Y.** (1998) Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin. *J.Neurosci.* **18**:7047-7060.
47. **Cunningham, T. J., Jing, H., Wang, Y., and Hodge, L.** (2000) Calreticulin binding and other biological activities of survival peptide Y-P30 including effects of systemic treatment of rats. *Exp.Neurol.* **163**:457-468.
48. **De Lucca, A. J., Jacks, T. J., and Brogden, K. A.** (18-10-1995) Binding between lipopolysaccharide and cecropin A. *Mol.Cell Biochem.* **151**:141-148.
49. **Diamond, G. and Bevins, C. L.** (1998) beta-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **88**:221-225.
50. **Diamond, G., Kaiser, V., Rhodes, J., Russell, J. P., and Bevins, C. L.** (2000) Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells. *Infect.Immun.* **68**:113-119.
51. **Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Bresseur, M., Maloy, W. L., and Bevins, C. L.** (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:3952-3956.
52. **Didierjean, L., Gruaz, D., Frobert, Y., Grassi, J., Dayer, J. M., and Saurat, J. H.** (1990) Biologically active interleukin 1 in human eccrine sweat: site-dependent variations in alpha/beta ratios and stress-induced increased excretion. *Cytokine* **2**:438-446.

53. **Dimarcq, J. L., Bulet, P., Hetru, C., and Hoffmann, J.** (1998) Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* **47**:465-477.
54. **Domachowske, J. B., Bonville, C. A., Dyer, K. D., and Rosenberg, H. F.** (1998a) Evolution of antiviral activity in the ribonuclease A gene superfamily: evidence for a specific interaction between eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and respiratory syncytial virus. *Nucleic Acids Res.* **26**:5327-5332.
55. **Domachowske, J. B., Dyer, K. D., Adams, A. G., Leto, T. L., and Rosenberg, H. F.** (1998b) Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Res.* **26**:3358-3363.
56. **Dorschner, R. A., Lopez-Garcia, B., Peschel, A., Kraus, D., Morikawa, K., Nizet, V., and Gallo, R. L.** (2006) The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. *FASEB J.* **20**:35-42.
57. **Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H.** (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* **9**:509-520.
58. **Ernst, R. K., Guina, T., and Miller, S. I.** (1999) How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *J.Infect.Dis.* **179 Suppl 2**:S326-S330.
59. **Fahrner, R. L., Dieckmann, T., Harwig, S. S., Lehrer, R. I., Eisenberg, D., and Feigon, J.** (1996) Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem.Biol.* **3**:543-550.
60. **Falla, T. J., Karunaratne, D. N., and Hancock, R. E.** (1996) Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J.Biol.Chem.* **271**:19298-19303.
61. **Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C., and Hoffmann, J. A.** (1994) Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J.Biol.Chem.* **269**:33159-33163.
62. **Fehlbaum, P., Rao, M., Zasloff, M., and Anderson, G. M.** (7-11-2000) An essential amino acid induces epithelial beta -defensin expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**:12723-12728.
63. **Fernandez, de Caley, Gonzalez-Pascual, B., Garcia-Olmedo, F., and Carbonero, P.** (1972) Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro. *Appl.Microbiol.* **23**:998-1000.
64. **Ferrandon, D., Jung, A. C., Criqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J., and Hoffmann, J. A.** (1998) A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J.* **17**:1217-1227.
65. **Flad, T., Bogumil, R., Tolson, J., Schitteck, B., Garbe, C., Deeg, M., Mueller, C. A., and Kalbacher, H.** (2002) Detection of dermcidin-derived peptides in sweat by ProteinChip technology. *J.Immunol.Methods* **270**:53-62.
66. **Florack, D. E. and Stiekema, W. J.** (1994) Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol.Biol.* **26**:25-37.
67. **Fraki, J. E.** (1976) Human skin proteases. Separation and characterization of two acid proteases resembling cathepsin B1 and cathepsin D and of an inhibitor of cathepsin B1. *Arch.Dermatol.Res.* **255**:317-330.
68. **Fraki, J. E., Jansen, C. T., and Hopsu-Havu, V. K.** (1970) Human sweat kallikrein. Biochemical demonstration and chromatographic separation from several other esteropeptidases in the sweat. *Acta Derm.Venereol.* **50**:321-326.
69. **Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stahle-Backdahl, M., Liden, S., Wigzell, H., and Gudmundsson, G. H.** (1997) The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J.Biol.Chem.* **272**:15258-15263.
70. **Futaki, S., Goto, S., Suzuki, T., Nakase, I., and Sugiura, Y.** (2003) Structural variety of membrane permeable peptides. *Curr.Protein Pept.Sci.* **4**:87-96.

71. **Gallo, R. L. and Huttner, K. M.** (1998) Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J.Invest.Dermatol.* **111**:739-743.
72. **Gallo, R. L., Murakami, M., Ohtake, T., and Zaiou, M.** (2002) Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J.Allergy Clin.Immunol.* **110**:823-831.
73. **Gallo, R. L., Ono, M., Povsic, T., Page, C., Eriksson, E., Klagsbrun, M., and Bernfield, M.** (1994) Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**:11035-11039.
74. **Gambello, M. J., Kaye, S., and Iglewski, B. H.** (1993) LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect.Immun.* **61**:1180-1184.
75. **Ganz, T.** (1987) Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect.Immun.* **55**:568-571.
76. **Ganz, T.** (1999) Defensins and host defense. *Science* **286**:420-421.
77. **Ganz, T. and Lehrer, R. I.** (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr.Opin.Immunol.* **10**:41-44.
78. **Ganz, T., Selsted, M. E., and Lehrer, R. I.** (1990) Defensins. *Eur.J.Haematol.* **44**:1-8.
79. **Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., and Lehrer, R. I.** (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J.Clin.Invest* **76**:1427-1435.
80. **Garcia, J. R., Jaumann, F., Schulz, S., Krause, A., Rodriguez-Jimenez, J., Forssmann, U., Adermann, K., Kluver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W. G., and Bals, R.** (2001a) Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* **306**:257-264.
81. **Garcia, J. R., Krause, A., Schulz, S., Rodriguez-Jimenez, F. J., Kluver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R., and Forssmann, W. G.** (2001b) Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **15**:1819-1821.
82. **Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., and Rodriguez-Palenzuela, P.** (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**:479-491.
83. **Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., and Moreno, M.** (1995) The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* **3**:72-74.
84. **Gazit, E., Boman, A., Boman, H. G., and Shai, Y.** (1995) Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* **34**:11479-11488.
85. **Ge, X., Chen, J., Li, N., Lin, Y., Sun, C., and Cao, K.** (2003) Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. *J.Biochem.Mol.Biol.* **36**:603-607.
86. **Gennaro, R. and Zanetti, M.** (2000) Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**:31-49.
87. **Ginsburg, I.** (2004) Bactericidal cationic peptides can also function as bacteriolysis-inducing agents mimicking beta-lactam antibiotics?; it is enigmatic why this concept is consistently disregarded. *Med.Hypotheses* **62**:367-374.
88. **Glaser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J. M.** (2005) Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat.Immunol.* **6**:57-64.
89. **Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M., and Wilson, J. M.** (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**:553-560.
90. **Gotz, F.** (2002) Staphylococcus and biofilms. *Mol.Microbiol.* **43**:1367-1378.

91. **Groisman, E. A.** (1994) How bacteria resist killing by host-defense peptides. *Trends Microbiol.* **2**:444-449.
92. **Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., and Salcedo, R.** (1996) The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur.J.Biochem.* **238**:325-332.
93. **Guina, T., Yi, E. C., Wang, H., Hackett, M., and Miller, S. I.** (2000) A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J.Bacteriol.* **182**:4077-4086.
94. **Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., and Miller, S. I.** (1998) PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol.Microbiol.* **27**:1171-1182.
95. **Guo, L., Lim, K. B., Poduje, C. M., Daniel, M., Gunn, J. S., Hackett, M., and Miller, S. I.** (1998) Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**:189-198.
96. **Habermann, E. and Zeuner, G.** (1971) Comparative studies of native and synthetic melittins. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmakol.* **270**:1-9.
97. **Hadjeb, N. and Berkowitz, G. A.** (1996) Preparation of T-over-hang vectors with high PCR product cloning efficiency. *Biotechniques* **20**:20-22.
98. **Hancock, R. E. and Chapple, D. S.** (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:1317-1323.
99. **Hancock, R. E. and Diamond, G.** (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **8**:402-410.
100. **Hancock, R. E. and Lehrer, R.** (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* **16**:82-88.
101. **Hancock, R. E. and Rozek, A.** (2002) Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol.Lett.* **206**:143-149.
102. **Hancock, R. E. and Scott, M. G.** (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:8856-8861.
103. **Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J. M.** (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**:861.
104. **Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J. M.** (2001) Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J.Biol.Chem.* **276**:5707-5713.
105. **Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S., and Schroder, J. M.** (2000) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **22**:714-721.
106. **Harder, J. and Schroder, J. M.** (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J.Biol.Chem.* **277**:46779-46784.
107. **Harder, J. and Schroder, J. M.** (2005) Antimicrobial peptides in human skin. *Chem.Immunol.Allergy* **86**:22-41.
108. **Harrison, S. C. and Aggarwal, A. K.** (1990) DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu.Rev.Biochem.* **59**:933-969.
109. **Haukland, H. H., Ulvatne, H., Sandvik, K., and Vorland, L. H.** (2001) The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. *FEBS Lett.* **508**:389-393.
110. **Helander, I. M. and Mattila-Sandholm, T.** (2000) Fluorometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization. *J.Appl.Microbiol.* **88**:213-219.
111. **Helmerhorst, E. J., Reijnders, I. M., van 't, Hof W., Veerman, E. C., and Nieuw Amerongen, A. V.** (1999) A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Lett.* **449**:105-110.

112. **Henzler Wildman, K. A., Lee, D. K., and Ramamoorthy, A.** (2003) Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* **42**:6545-6558.
113. **Hernandez-Lucas, C., Fernandez, de Caleyra, and Carbonero, P.** (1974) Inhibition of brewer's yeasts by wheat purothionins. *Appl.Microbiol.* **28**:165-168.
114. **Hibino, T., Takemura, T., and Sato, K.** (1994) Human eccrine sweat contains tissue kallikrein and kininase II. *J.Invest Dermatol.* **102**:214-220.
115. **Hipfel, R., Schittek, B., Bodingbauer, Y., and Garbe, C.** (2000) Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. *Br.J.Cancer* **82**:1149-1157.
116. **Hoffmann, J. A.** (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature* **426**:33-38.
117. **Hope, M. J., Wong, K. F., and Cullis, P. R.** (1989) Freeze-fracture of lipids and model membrane systems. *J.Electron Microsc.Tech.* **13**:277-287.
118. **Huang, H. J., Ross, C. R., and Blecha, F.** (1997) Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. *J.Leukoc.Biol.* **61**:624-629.
119. **Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., and Boman, H. G.** (1980) Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur.J.Biochem.* **106**:7-16.
120. **Imler, J. L. and Hoffmann, J. A.** (2000a) Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr.Opin.Microbiol.* **3**:16-22.
121. **Imler, J. L. and Hoffmann, J. A.** (2000b) Toll and Toll-like proteins: an ancient family of receptors signaling infection. *Rev.Immunogenet.* **2**:294-304.
122. **Jarosz, J.** (1997) Identification of immune inhibitor from *Pseudomonas aeruginosa* of inducible cell-free antibacterial activity in insects. *Cytobios* **89**:73-80.
123. **Jarosz, J. and Glinski, Z.** (1990) Selective inhibition of cecropin-like activity of insect immune blood by protease from American foulbrood scales. *J.Invertebr.Pathol.* **56**:143-149.
124. **Jia, H. P., Schutte, B. C., Schudy, A., Linzmeier, R., Guthmiller, J. M., Johnson, G. K., Tack, B. F., Mitros, J. P., Rosenthal, A., Ganz, T., and McCray, P. B., Jr.** (2001) Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* **263**:211-218.
125. **Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., and Tarkowski, A.** (15-1-2004) *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J.Immunol.* **172**:1169-1176.
126. **Jing, W., Demcoe, A. R., and Vogel, H. J.** (2003) Conformation of a bactericidal domain of puroindoline a: structure and mechanism of action of a 13-residue antimicrobial peptide. *J.Bacteriol.* **185**:4938-4947.
127. **Johansson, J., Gudmundsson, G. H., Rottenberg, M. E., Berndt, K. D., and Agerberth, B.** (1998) Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J.Biol.Chem.* **273**:3718-3724.
128. **Kaiser, V. and Diamond, G.** (2000) Expression of mammalian defensin genes. *J.Leukoc.Biol.* **68**:779-784.
129. **Kalfa, V. C., Jia, H. P., Kunkle, R. A., McCray, P. B., Jr., Tack, B. F., and Brogden, K. A.** (2001) Congeners of SMAP29 kill ovine pathogens and induce ultrastructural damage in bacterial cells. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:3256-3261.
130. **Kang, J. H., Shin, S. Y., Jang, S. Y., Lee, M. K., and Hahm, K. S.** (1998) Release of aqueous contents from phospholipid vesicles induced by cecropin A (1-8)-magainin 2 (1-12) hybrid and its analogues. *J.Pept.Res.* **52**:45-50.
131. **Kavanagh, K. and Dowd, S.** (2004) Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J.Pharm.Pharmacol.* **56**:285-289.
132. **Kobayashi, S.** (2002) [Bacteria-selective synergism between the antimicrobial peptides magainin 2 and tachyplesin I: toward cocktail therapy]. *Yakugaku Zasshi* **122**:967-973.

133. **Koo, S. P., Bayer, A. S., and Yeaman, M. R.** (2001) Diversity in antistaphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides. *Infect.Immun.* **69**:4916-4922.
134. **Kragol, G., Lovas, S., Varadi, G., Condie, B. A., Hoffmann, R., and Otvos, L., Jr.** (2001) The antibacterial peptide pyrrolicocorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* **40**:3016-3026.
135. **Krishnakumari, V. and Nagaraj, R.** (1997) Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs. *J.Pept.Res.* **50**:88-93.
136. **Kristian, S. A., Datta, V., Weidenmaier, C., Kansal, R., Fedtke, I., Peschel, A., Gallo, R. L., and Nizet, V.** (2005) D-alanylation of teichoic acids promotes group A streptococcus antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J.Bacteriol.* **187**:6719-6725.
137. **Kuhn-Nentwig, L., Muller, J., Schaller, J., Walz, A., Dathe, M., and Nentwig, W.** (2002) Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *J.Biol.Chem.* **277**:11208-11216.
138. **Kupferwasser, L. I., Skurray, R. A., Brown, M. H., Firth, N., Yeaman, M. R., and Bayer, A. S.** (1999) Plasmid-mediated resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in staphylococci: role of the *qacA* locus. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:2395-2399.
139. **Ladokhin, A. S., Selsted, M. E., and White, S. H.** (1997) Bilayer interactions of indolicidin, a small antimicrobial peptide rich in tryptophan, proline, and basic amino acids. *Biophys.J.* **72**:794-805.
140. **Lai, R., Liu, H., Hui, Lee W., and Zhang, Y.** (2002) An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **295**:796-799.
141. **Lai, R., Lomas, L. O., Jonczy, J., Turner, P. C., and Rees, H. H.** (2004) Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochem.J.* **379**:681-685.
142. **Lai, Y. P., Peng, Y. F., Zuo, Y., Li, J., Huang, J., Wang, L. F., and Wu, Z. R.** (2005) Functional and structural characterization of recombinant dermcidin-1L, a human antimicrobial peptide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **328**:243-250.
143. **Landgraf, P., Sieg, F., Wahle, P., Meyer, G., Kreutz, M. R., and Pape, H. C.** (2005) A maternal blood-borne factor promotes survival of the developing thalamus. *FASEB J.* **19**:225-227.
144. **Landon, C., Meudal, H., Boulanger, N., Bulet, P., and Vovelle, F.** (2006) Solution structures of stomoxyn and spinigerin, two insect antimicrobial peptides with an alpha-helical conformation. *Biopolymers* **81**:92-103.
145. **Larrick, J. W., Hirata, M., Balint, R. F., Lee, J., Zhong, J., and Wright, S. C.** (1995) Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect.Immun.* **63**:1291-1297.
146. **Larrick, J. W., Lee, J., Ma, S., Li, X., Francke, U., Wright, S. C., and Balint, R. F.** (1996) Structural, functional analysis and localization of the human CAP18 gene. *FEBS Lett.* **398**:74-80.
147. **Lee, C. M. and Dessi, J.** (1989) NCL-SG3: a human eccrine sweat gland cell line that retains the capacity for transepithelial ion transport. *J.Cell Sci.* **92 (Pt 2)**:241-249.
148. **Lehrer, R. I., Barton, A., Daher, K. A., Harwig, S. S., Ganz, T., and Selsted, M. E.** (1989) Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J.Clin.Invest* **84**:553-561.
149. **Lehrer, R. I., Barton, A., and Ganz, T.** (1988) Concurrent assessment of inner and outer membrane permeabilization and bacteriolysis in *E. coli* by multiple-wavelength spectrophotometry. *J.Immunol.Methods* **108**:153-158.
150. **Lehrer, R. I. and Ganz, T.** (2002) Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr.Opin.Hematol.* **9**:18-22.

151. **Lehrer, R. I., Ganz, T., and Selsted, M. E.** (1991) Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* **64**:229-230.
152. **Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K., and Ganz, T.** (1993) Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu.Rev.Immunol.* **11**:105-128.
153. **Lemaitre, B., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A.** (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:14614-14619.
154. **Li, J., Post, M., Volk, R., Gao, Y., Li, M., Metais, C., Sato, K., Tsai, J., Aird, W., Rosenberg, R. D., Hampton, T. G., Sellke, F., Carmeliet, P., and Simons, M.** (2000) PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat.Med.* **6**:49-55.
155. **Li, P., Chan, H. C., He, B., So, S. C., Chung, Y. W., Shang, Q., Zhang, Y. D., and Zhang, Y. L.** (2001) An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science* **291**:1783-1785.
156. **Lillard, J. W., Jr., Boyaka, P. N., Chertov, O., Oppenheim, J. J., and McGhee, J. R.** (1999) Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:651-656.
157. **Liu, L., Wang, L., Jia, H. P., Zhao, C., Heng, H. H., Schutte, B. C., McCray, P. B., Jr., and Ganz, T.** (1998) Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* **222**:237-244.
158. **Macias, E. A., Rana, F., Blazyk, J., and Modrzakowski, M. C.** (1990) Bactericidal activity of magainin 2: use of lipopolysaccharide mutants. *Can.J.Microbiol.* **36**:582-584.
159. **Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., and Laufs, R.** (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J.Bacteriol.* **178**:175-183.
160. **Manning, M. C. and Woody, R. W.** (1987) Theoretical determination of the CD of proteins containing closely packed antiparallel beta-sheets. *Biopolymers* **26**:1731-1752.
161. **Marchini, D., Marri, L., Rosetto, M., Manetti, A. G., and Dallai, R.** (1997) Presence of antibacterial peptides on the laid egg chorion of the medfly *Ceratitis capitata*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **240**:657-663.
162. **Matsuzaki, K.** (1999) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim.Biophys.Acta* **1462**:1-10.
163. **McPhee, J. B., Lewenza, S., and Hancock, R. E.** (2003) Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol.Microbiol.* **50**:205-217.
164. **Medzhitov, R. and Janeway, C. Jr** (2000) Innate immunity. *N.Engl.J.Med.* **343**:338-344.
165. **Merrifield, R. B.** (1969) Solid-phase peptide synthesis. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* **32**:221-296.
166. **Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen, K., Tytgat, J., Van Eldere, J., Van Der, Walt J., and Verdonck, F.** (2002) Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur.J.Biochem.* **269**:4799-4810.
167. **Molina, A. and Garcia-Olmedo, F.** (1993) Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *Plant J.* **4**:983-991.
168. **Mor, A., Hani, K., and Nicolas, P.** (1994) The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *J.Biol.Chem.* **269**:31635-31641.
169. **Murakami, M., Lopez-Garcia, B., Braff, M., Dorschner, R. A., and Gallo, R. L.** (2004) Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J.Immunol.* **172**:3070-3077.

170. **Murakami, M., Ohtake, T., Dorschner, R. A., and Gallo, R. L.** (2002a) Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J.Dent.Res.* **81**:845-850.
171. **Murakami, M., Ohtake, T., Dorschner, R. A., Schitteck, B., Garbe, C., and Gallo, R. L.** (2002b) Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J.Invest.Dermatol.* **119**:1090-1095.
172. **Murphy, C. J., Foster, B. A., Mannis, M. J., Selsted, M. E., and Reid, T. W.** (1993) Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J.Cell Physiol.* **155**:408-413.
173. **Myal, Y., Robinson, D. B., Iwasiew, B., Tsuyuki, D., Wong, P., and Shiu, R. P.** (1991) The prolactin-inducible protein (PIP/GCDFP-15) gene: cloning, structure and regulation. *Mol.Cell Endocrinol.* **80**:165-175.
174. **Naito, A., Nagao, T., Norisada, K., Mizuno, T., Tuzi, S., and Saito, H.** (2000) Conformation and dynamics of melittin bound to magnetically oriented lipid bilayers by solid-state (31)P and (13)C NMR spectroscopy. *Biophys.J.* **78**:2405-2417.
175. **Nakayashiki, N.** (1990) Sweat protein components tested by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by immunoblotting. *Tohoku J.Exp.Med.* **161**:25-31.
176. **Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W.** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**:255-262.
177. **Nikaido, H. and Vaara, M.** (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol.Rev.* **49**:1-32.
178. **Nizet, V. and Gallo, R. L.** (2002) Surviving innate immunity. *Trends.Microbiol.* **10**:358-359.
179. **Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R. A., Pestonjamas, V., Piraino, J., Huttner, K., and Gallo, R. L.** (2001) Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**:454-457.
180. **O'Neil, D. A.** (2003) Regulation of expression of beta-defensins: endogenous enteric peptide antibiotics. *Mol.Immunol.* **40**:445-450.
181. **Ochsner, U. A. and Reiser, J.** (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:6424-6428.
182. **Oishi, O., Yamashita, S., Nishimoto, E., Lee, S., Sugihara, G., and Ohno, M.** (1997) Conformations and orientations of aromatic amino acid residues of tachyplesin I in phospholipid membranes. *Biochemistry* **36**:4352-4359.
183. **Okada, T., Konishi, H., Ito, M., Nagura, H., and Asai, J.** (1988) Identification of secretory immunoglobulin A in human sweat and sweat glands. *J.Invest Dermatol.* **90**:648-651.
184. **Oppenheim, F. G., Xu, T., McMillian, F. M., Levitz, S. M., Diamond, R. D., Offner, G. D., and Troxler, R. F.** (1988) Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J.Biol.Chem.* **263**:7472-7477.
185. **Oren, Z., Lerman, J. C., Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., and Shai, Y.** (1999) Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem.J.* **341 (Pt 3)**:501-513.
186. **Osborn, R. W., De Samblanx, G. W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S. B., and Broekaert, W. F.** (1995) Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett.* **368**:257-262.
187. **Otvos, L., Jr.** (2005) Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *J.Pept.Sci.* **11**:697-706.

188. **Otvos, L., Jr., O I, Rogers, M. E., Consolvo, P. J., Condie, B. A., Lovas, S., Bulet, P., and Blaszczyk-Thurin, M.** (2000) Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **39**:14150-14159.
189. **Park, C. B., Kim, H. S., and Kim, S. C.** (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **244**:253-257.
190. **Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S., and Kim, S. C.** (2000) Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:8245-8250.
191. **Park, J. M., Jung, J. E., and Lee, B. J.** (1994) Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog, *Rana rugosa*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **205**:948-954.
192. **Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., and Iglewski, B. H.** (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**:1127-1130.
193. **Patrzykat, A., Friedrich, C. L., Zhang, L., Mendoza, V., and Hancock, R. E.** (2002) Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:605-614.
194. **Pearson, J. P., Pesci, E. C., and Iglewski, B. H.** (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J.Bacteriol.* **179**:5756-5767.
195. **Peschel, A.** (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* **10**:179-186.
196. **Peschel, A. and Collins, L. V.** (2001) Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides* **22**:1651-1659.
197. **Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M., Collins, L. V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W. F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K. P., and van Strijp, J. A.** (2001) Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J.Exp.Med.* **193**:1067-1076.
198. **Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., and Gotz, F.** (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J.Biol.Chem.* **274**:8405-8410.
199. **Peschel, A., Vuong, C., Otto, M., and Gotz, F.** (2000) The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**:2845-2847.
200. **Pessi, G. and Haas, D.** (2000) Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhIR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* **182**:6940-6949.
201. **Porter, D., Weremowicz, S., Chin, K., Seth, P., Keshaviah, A., Lahti-Domenici, J., Bae, Y. K., Monitto, C. L., Merlos-Suarez, A., Chan, J., Hulette, C. M., Richardson, A., Morton, C. C., Marks, J., Duyao, M., Hruban, R., Gabrielson, E., Gelman, R., and Polyak, K.** (2003) A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:10931-10936.
202. **Qu, X. D. and Lehrer, R. I.** (1998) Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect.Immun.* **66**:2791-2797.
203. **Radhakrishnan, Y., Hamil, K. G., Yenugu, S., Young, S. L., French, F. S., and Hall, S. H.** (2005) Identification, characterization, and evolution of a primate beta-defensin gene cluster. *Genes Immun.* **6**:203-210.
204. **Raj, P. A. and Dentino, A. R.** (2002) Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol.Lett.* **206**:9-18.

-
205. **Ramanathan, B., Davis, E. G., Ross, C. R., and Blecha, F.** (2002) Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes.Infect.* **4**:361-372.
206. **Rieg, S., Garbe, C., Sauer, B., Kalbacher, H., and Schitteck, B.** (2004) Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions. *Br.J.Dermatol.* **151**:534-539.
207. **Rieg, S., Seeber, S., Steffen, H., Humeny, A., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Kimura, A., Garbe, C., and Schitteck, B.** (2006) Generation of multiple stable dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of different body sites. *J.Invest Dermatol.* **126**:354-365.
208. **Rieg, S., Steffen, H., Seeber, S., Humeny, A., Kalbacher, H., Dietz, K., Garbe, C., and Schitteck, B.** (2005) Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. *J.Immunol.* **174**:8003-8010.
209. **Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., and .** (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**:217-225.
210. **Risso, A.** (2000) Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J.Leukoc.Biol.* **68**:785-792.
211. **Rodriguez-Jimenez, F. J., Krause, A., Schulz, S., Forssmann, W. G., Conejo-Garcia, J. R., Schreeb, R., and Motzkus, D.** (2003) Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics* **81**:175-183.
212. **Rosenberg, H. F. and Domachowske, J. B.** (2001) Assays for detection of RNase A superfamily ribonucleases. *Methods Mol.Biol.* **160**:355-362.
213. **Rosetto, M., Manetti, A. G., Giordano, P. C., Marri, L., Amons, R., Baldari, C. T., Marchini, D., and Dallai, R.** (1996) Molecular characterization of ceratotoxin C, a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitis capitata*. *Eur.J.Biochem.* **241**:330-337.
214. **Rouser, G., Fkeischer, S., and Yamamoto, A.** (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**:494-496.
215. **Royet, J. and Reichhart, J. M.** (2003) Detection of peptidoglycans by NOD proteins. *Trends Cell Biol.* **13**:610-614.
216. **Rozek, A., Friedrich, C. L., and Hancock, R. E.** (2000) Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* **39**:15765-15774.
217. **Sadowski, T., Dietrich, S., Koschinsky, F., and Sedlacek, R.** (2003) Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. *Mol.Biol.Cell* **14**:4569-4580.
218. **Sahl, H. G., Kordel, M., and Benz, R.** (1987) Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Arch.Microbiol.* **149**:120-124.
219. **Sai, K. P., Jagannadham, M. V., Vairamani, M., Raju, N. P., Devi, A. S., Nagaraj, R., and Sitaram, N.** (2001) Tigerinins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina*. *J.Biol.Chem.* **276**:2701-2707.
220. **Sanger, F. and Coulson, A. R.** (25-5-1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J.Mol.Biol.* **94**:441-448.
221. **Sato, K., Kang, W. H., Saga, K., and Sato, K. T.** (1989) Biology of sweat glands and their disorders. II. Disorders of sweat gland function. *J.Am.Acad.Dermatol.* **20**:713-726.
222. **Sato, K. and Sato, F.** (1994) Interleukin-1 alpha in human sweat is functionally active and derived from the eccrine sweat gland. *Am.J.Physiol* **266**:R950-R959.

223. **Schadow, A., Scholz-Pedretti, K., Lambeau, G., Gelb, M. H., Furstenberger, G., Pfeilschifter, J., and Kaszkin, M.** (2001) Characterization of group X phospholipase A(2) as the major enzyme secreted by human keratinocytes and its regulation by the phorbol ester TPA. *J.Invest Dermatol.* **116**:31-39.
224. **Schibli, D. J., Hunter, H. N., Aseyev, V., Starner, T. D., Wiencek, J. M., McCray, P. B., Jr., Tack, B. F., and Vogel, H. J.** (2002) The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* **277**:8279-8289.
225. **Schittek, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., and Garbe, C.** (2001) Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat.Immunol.* **2**:1133-1137.
226. **Schmidtchen, A., Frick, I. M., Andersson, E., Tapper, H., and Bjorck, L.** (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol.Microbiol.* **46**:157-168.
227. **Schon, M., Benwood, J., O'Connell-Willstaedt, T., and Rheinwald, J. G.** (1999) Human sweat gland myoepithelial cells express a unique set of cytokeratins and reveal the potential for alternative epithelial and mesenchymal differentiation states in culture. *J.Cell Sci.* **112 (Pt 12)**:1925-1936.
228. **Schonwetter, B. S., Stolzenberg, E. D., and Zasloff, M. A.** (1995) Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* **267**:1645-1648.
229. **Schroder, J. M.** (1999a) Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol.Life Sci.* **56**:32-46.
230. **Schroder, J. M.** (1999b) Epithelial peptide antibiotics. *Biochem.Pharmacol.* **57**:121-134.
231. **Schroder, J. M.** (2002) [Antimicrobial peptides: effector molecules of the skin as immune organ]. *Hautarzt* **53**:424-434.
232. **Schroder, J. M. and Harder, J.** (1999) Human beta-defensin-2. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **31**:645-651.
233. **Schuhmann, B., Seitz, V., Vilcinskis, A., and Podsiadlowski, L.** (2003) Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Arch.Insect Biochem.Physiol* **53**:125-133.
234. **Schutte, B. C., Mitros, J. P., Bartlett, J. A., Walters, J. D., Jia, H. P., Welsh, M. J., Casavant, T. L., and McCray, P. B., Jr.** (2002) Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:2129-2133.
235. **Scott, M. G., Davidson, D. J., Gold, M. R., Bowdish, D., and Hancock, R. E.** (2002) The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J.Immunol.* **169**:3883-3891.
236. **Scott, M. G. and Hancock, R. E.** (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev.Immunol.* **20**:407-431.
237. **Selsted, M. E., Harwig, S. S., Ganz, T., Schilling, J. W., and Lehrer, R. I.** (1985) Primary structures of three human neutrophil defensins. *J.Clin.Invest* **76**:1436-1439.
238. **Selsted, M. E. and Ouellette, A. J.** (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat.Immunol.* **6**:551-557.
239. **Shafer, W. M., Qu, X., Waring, A. J., and Lehrer, R. I.** (1998) Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:1829-1833.
240. **Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wojcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J., and Potempa, J.** (2004) Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:4673-4679.

241. **Simmaco, M., Barra, D., Chiarini, F., Noviello, L., Melchiorri, P., Kreil, G., and Richter, K.** (1991) A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata*. *Eur.J.Biochem.* **199**:217-222.
242. **Simmaco, M., Mignogna, G., and Barra, D.** (1998) Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* **47**:435-450.
243. **Sitaram, N., Sai, K. P., Singh, S., Sankaran, K., and Nagaraj, R.** (2002) Structure-function relationship studies on the frog skin antimicrobial peptide tigerinin 1: design of analogs with improved activity and their action on clinical bacterial isolates. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:2279-2283.
244. **Skerlavaj, B., Gennaro, R., Bagella, L., Merluzzi, L., Risso, A., and Zanetti, M.** (1996) Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities. *J.Biol.Chem.* **271**:28375-28381.
245. **Sorensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S., and Borregaard, N.** (2001) Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**:3951-3959.
246. **Southern, E. M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98**:503-517.
247. **Srimal, S., Surolia, N., Balasubramanian, S., and Surolia, A.** (1996) Titration calorimetric studies to elucidate the specificity of the interactions of polymyxin B with lipopolysaccharides and lipid A. *Biochem.J.* **315 (Pt 2)**:679-686.
248. **Stolzenberg, E. D., Anderson, G. M., Ackermann, M. R., Whitlock, R. H., and Zasloff, M.** (1997) Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**:8686-8690.
249. **Subbalakshmi, C. and Sitaram, N.** (1998) Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol.Lett.* **160**:91-96.
250. **Tada, T., Ohkubo, I., Niwa, M., Sasaki, M., Tateyama, H., and Eimoto, T.** (1991) Immunohistochemical localization of Zn-alpha 2-glycoprotein in normal human tissues. *J.Histochem.Cytochem.* **39**:1221-1226.
251. **Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S.** (2003) Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* **21**:335-376.
252. **Takeuchi, K., Takahashi, H., Sugai, M., Iwai, H., Kohno, T., Sekimizu, K., Natori, S., and Shimada, I.** (2004) Channel-forming membrane permeabilization by an antibacterial protein, sapecin: determination of membrane-buried and oligomerization surfaces by NMR. *J.Biol.Chem.* **279**:4981-4987.
253. **Terras, F. R., Schoofs, H. M., De Bolle, M. F., Van Leuven, F., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P., and Broekaert, W. F.** (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J.Biol.Chem.* **267**:15301-15309.
254. **Thevissen, K., Terras, F. R., and Broekaert, W. F.** (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl.Enviro.Microbiol.* **65**:5451-5458.
255. **Thomas, C. J., Surolia, N., and Surolia, A.** (1999) Surface plasmon resonance studies resolve the enigmatic endotoxin neutralizing activity of polymyxin B. *J.Biol.Chem.* **274**:29624-29627.
256. **Toder, D. S., Gambello, M. J., and Iglewski, B. H.** (1991) *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol.Microbiol.* **5**:2003-2010.
257. **Todorov, P., Cariuk, P., McDevitt, T., Coles, B., Fearon, K., and Tisdale, M.** (1996) Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature* **379**:739-742.

258. **Todorov, P. T., Field, W. N., and Tisdale, M. J.** (1999) Role of a proteolysis-inducing factor (PIF) in cachexia induced by a human melanoma (G361). *Br.J.Cancer* **80**:1734-1737.
259. **Torres-Larios, A., Gurrola, G. B., Zamudio, F. Z., and Possani, L. D.** (2000) Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur.J.Biochem.* **267**:5023-5031.
260. **Tossi, A. and Sandri, L.** (2002) Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Curr.Pharm.Des* **8**:743-761.
261. **Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A.** (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**:4-30.
262. **Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**:4350-4354.
263. **Tran, M. H., Yamada, K., and Nabeshima, T.** (2002) Amyloid beta-peptide induces cholinergic dysfunction and cognitive deficits: a minireview. *Peptides* **23**:1271-1283.
264. **Turner, J., Cho, Y., Dinh, N. N., Waring, A. J., and Lehrer, R. I.** (1998) Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**:2206-2214.
265. **Vaara, M. and Vaara, T.** (1994) Ability of cecropin B to penetrate the enterobacterial outer membrane. *Antimicrob.Agents Chemother.* **38**:2498-2501.
266. **Valore, E. V., Park, C. H., Quayle, A. J., Wiles, K. R., McCray, P. B. Jr, and Ganz, T.** (1998) Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J.Clin.Invest.* **101**:1633-1642.
267. **van 't, Hof W., Veerman, E. C., Helmerhorst, E. J., and Amerongen, A. V.** (2001) Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol.Chem.* **382**:597-619.
268. **Vogel, H. and Jahnig, F.** (1986) The structure of melittin in membranes. *Biophys.J.* **50**:573-582.
269. **Vuong, C., Saenz, H. L., Gotz, F., and Otto, M.** (2000) Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J.Infect.Dis.* **182**:1688-1693.
270. **Vuong, C., Voyich, J. M., Fischer, E. R., Braughton, K. R., Whitney, A. R., DeLeo, F. R., and Otto, M.** (2004) Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* **6**:269-275.
271. **Wade, D., Andreu, D., Mitchell, S. A., Silveira, A. M., Boman, A., Boman, H. G., and Merrifield, R. B.** (1992) Antibacterial peptides designed as analogs or hybrids of cecropins and melittin. *Int.J.Pept.Protein Res.* **40**:429-436.
272. **Wang, Z., Corey, E., Hass, G. M., Higano, C. S., True, L. D., Wallace, D., Jr., Tisdale, M. J., and Vessella, R. L.** (2003) Expression of the human cachexia-associated protein (HCAP) in prostate cancer and in a prostate cancer animal model of cachexia. *Int.J.Cancer* **105**:123-129.
273. **Weinberg, J. M., Moss, T., Gupta, S. M., White, S. M., and Don, P. C.** (1998) Reticulate hyperpigmentation of the skin after topical application of benzoyl peroxide. *Acta Derm.Venereol.* **78**:301-302.
274. **Wiedow, O., Harder, J., Bartels, J., Streit, V., and Christophers, E.** (1998) Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **248**:904-909.
275. **Wiedow, O., Schroder, J. M., Gregory, H., Young, J. A., and Christophers, E.** (1990) Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J.Biol.Chem.* **265**:14791-14795.

-
276. **Wilde, C. G., Griffith, J. E., Marra, M. N., Snable, J. L., and Scott, R. W.** (1989) Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J.Biol.Chem.* **264**:11200-11203.
277. **Wingens, M., van Bergen, B. H., Hiemstra, P. S., Meis, J. F., Vlijmen-Willems, I. M., Zeeuwen, P. L., Mulder, J., Kramps, H. A., van Ruissen, F., and Schalkwijk, J.** (1998) Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. *J.Invest Dermatol.* **111**:996-1002.
278. **Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmund, G. P., Bycroft, B. W.** (1995) Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:9427-9431.
279. **Winzer, K., Falconer, C., Garber, N. C., Diggle, S. P., Camara, M., and Williams, P.** (2000) The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J.Bacteriol.* **182**:6401-6411.
280. **Wollina, U., Lange, D., Ten Dijke, P., Heldin, C. H., and Funa, K.** (1999) Eccrine sweat glands: expression of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein type I receptors and their intracellular signalling Smad proteins. *Acta Derm.Venereol.* **79**:183-186.
281. **Woody, R. W.** (1995) Circular dichroism. *Methods Enzymol.* **246**:34-71.
282. **Wu, M., Maier, E., Benz, R., and Hancock, R. E.** (1999) Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**:7235-7242.
283. **Wyke, S. M. and Tisdale, M. J.** (-2005) NF-kappaB mediates proteolysis-inducing factor induced protein degradation and expression of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. *Br.J.Cancer* **92**:711-721.
284. **Xiong, Y. Q., Yeaman, M. R., and Bayer, A. S.** (1999) In vitro antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:1111-1117.
285. **Yamaguchi, S., Hong, T., Waring, A., Lehrer, R. I., and Hong, M.** (6-8-2002) Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a beta-sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry* **41**:9852-9862.
286. **Yamaguchi, S., Huster, D., Waring, A., Lehrer, R. I., Kearney, W., Tack, B. F., and Hong, M.** (2001) Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys.J.* **81**:2203-2214.
287. **Yan, H. and Hancock, R. E.** (2001) Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**:1558-1560.
288. **Yanagi, S., Ashitani, J., Ishimoto, H., Date, Y., Mukae, H., Chino, N., and Nakazato, M.** (2005) Isolation of human beta-defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection. *Respir.Res.* **6**:130.
289. **Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W., and Oppenheim, J. J.** (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**:291-296.
290. **Yang, D., Chen, Q., Chertov, O., and Oppenheim, J. J.** (2000) Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.* **68**:9-14.
291. **Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M., and Oppenheim, J. J.** (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**:525-528.
292. **Yang, D., Chertov, O., and Oppenheim, J. J.** (2001) The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol.Life Sci.* **58**:978-989.

293. **Yao, Y., Vuong, C., Kocianova, S., Villaruz, A. E., Lai, Y., Sturdevant, D. E., and Otto, M.** (2006) Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* Accessory-Gene Regulator Response: Quorum-Sensing Regulation of Resistance to Human Innate Host Defense. *J.Infect.Dis.* **193**:841-848.
294. **Yeaman, M. R. and Yount, N. Y.** (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol.Rev.* **55**:27-55.
295. **Zaiou, M., Nizet, V., and Gallo, R. L.** (2003) Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J.Invest Dermatol.* **120**:810-816.
296. **Zanetti, M.** (2004) Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J.Leukoc.Biol.* **75**:39-48.
297. **Zanetti, M., Gennaro, R., and Romeo, D.** (1995) Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* **374**:1-5.
298. **Zasloff, M.** (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**:5449-5453.
299. **Zeeuwen, P. L., Vlijmen-Willems, I. M., Egami, H., and Schalkwijk, J.** (2002) Cystatin M / E expression in inflammatory and neoplastic skin disorders. *Br.J.Dermatol.* **147**:87-94.
300. **Zeeuwen, P. L., Vlijmen-Willems, I. M., Jansen, B. J., Sotiropoulou, G., Curfs, J. H., Meis, J. F., Janssen, J. J., van Ruissen, F., and Schalkwijk, J.** (2001) Cystatin M/E expression is restricted to differentiated epidermal keratinocytes and sweat glands: a new skin-specific proteinase inhibitor that is a target for cross-linking by transglutaminase. *J.Invest Dermatol.* **116**:693-701.
301. **Zhang, G., Ross, C. R., and Blecha, F.** (2000) Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Vet.Res.* **31**:277-296.
302. **Zhao, C., Wang, I., and Lehrer, R. I.** (1996) Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett.* **396**:319-322.

Curriculum Vitae

Heiko Steffen

Diplom-Biotechnologe

* 24.06.1974 in Troisdorf-Sieglar

Konfession:

evangelisch

Familienstand:

ledig

Schule

1981 - 1985

Grundschule Hanftalstraße in Hennef, Rhein-Sieg-Kreis

1986 - 1995

Gymnasium Hennef, mit Abschluss (allgemeine Hochschulreife)

Zivildienst

08/1995 - 08/1996

Staatliches Umweltamt (STUA) Köln (Außenstelle Bonn) im
Wasserlabor

Hochschulstudium

10/1996 - 10/2002

Abschluss des Diplom-Studiengangs Biotechnologie, Technische
Universität Braunschweig

Diplom-Arbeit an der Firma *RELIA*Tech GmbH (Rezeptor Ligand
Technologie), Biotechnologiepark Braunschweig

Promotion

11/2002 – 06/2006

Eberhard Karls Universität Tübingen, angefertigt am Universitäts-
Klinikum Tübingen (UKT)