

Isolierung und Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden aus Kalbsthymus

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Chemikerin Susann Arndt
geboren am 29.05.1970 in Borna

2001

Referent: PD Dr. Gerlinde Kretzmer
Korreferent: Prof. Dr. Dr. Karl Schügerl
Tag der Promotion: 12.07.2001

Meinen Eltern

Zusammenfassung: Die immer schnellere Entstehung von antibiotikaresistenten Bakterienstämmen bedingt eine verstärkte Suche nach neuen Wirkstoffen. Der Thymus, als lymphoides Organ, spielt eine große Rolle bei der Immunabwehr. Von besonderer Bedeutung sind antimikrobielle Peptide als Bestandteile der unspezifischen Immunantwort. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob antimikrobielle Peptide bereits im Thymus gebildet werden. Zu diesem Zweck wurde eine Peptidbank aus Kalbsthymus hergestellt und diese auf antimikrobielle Aktivität untersucht. Unter Anwendung verschiedener Chromatographietechniken konnten fünf antimikrobiell wirksame Peptide aus der Kalbsthymus-Peptidbank isoliert werden. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden und Edman-Sequenzierung wurde die Primärstruktur der Peptide aufgeklärt. Diese Peptide wurden als Fragmente von Proteinen identifiziert, die vermutlich durch proteolytische Spaltung im Thymus entstehen und somit zur Immunantwort beitragen. Es konnte gezeigt werden, daß der Thymus eine große Anzahl an Peptiden enthält, die das Wachstum von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie Hefen hemmen und dabei selektiv auf diese Mikroorganismen wirken.

Ausgehend von den erhaltenen Daten konnte gezeigt werden, daß bereits im Thymus antimikrobielle Peptide gebildet werden, die als unspezifische Immunantwort zur Bakterienabwehr zur Verfügung stehen.

Schlagworte: Thymuspeptide – antimikrobielle Peptide – Proteinfragmente

Abstract: The emergence of antibacterial drug resistance demands the development of novel antibiotic substances. The thymus as a lymphoid tissue plays an important role in the host defense mechanism. Naturally occurring antimicrobial peptides are a part of the nonspecific immune system and are potential new candidates for antibiotic drug development. With the aim to investigate the existence of antimicrobial peptides in thymus we established a peptide library from calf thymus. Purification procedures using chromatographic techniques combined with a sensitive radial diffusion assay monitoring antimicrobial activity in the resulting HPLC-fractions led to identification of five novel antimicrobial peptides. The primary structure of peptides was analysed by molecular biological methods and Edman degradation. The peptides were identified as protein fragments, which can be released by proteolytic processing in thymus, contributing to innate immunity. It has been shown that thymus contains various peptides, which inhibit the growth of Gram-negative and Gram-positive bacteria and yeasts which act specifically on these microorganisms.

From the data obtained, it can be concluded that antimicrobial peptides are generated in thymus as a part of the unspecific immune response for bacterial defense.

Keywords: thymic peptides – antimicrobial peptides – protein fragments

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Å	Angström-Einheit
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
A	Extinktionswert
AS	Aminosäure/n
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
b	bovin
bidest.	bidestilliert
Bp	Basenpaare/n
C-	Carboxyl-
Ca	Calcium
CAF	Cytosin-arabino-furanosid
cDNA	komplementäre DNA, die bei der reversen Transkription von RNA entsteht
CHC	α-Cyano-4-hydroxymizinsäure
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESI-MS	Elektronenspray - MS
Fr.	Fraktion
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GRP	Glycin-rich Protein
h	human
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEC	Ionenaustausch-Chromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid
kBp	Kilobasenpaare/n
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Lauria Bertani Vollmedium
LPS	Lipopolysaccharide
M	mol / Liter
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ ionisation - time of flight
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
N-	Amino-
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
Nucleo	Nucleolin
NuMA	Nuclear Mitotic Apparatus Protein
OD	optische Dichte
PBS	Physiologischer Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	pH-Wert
pI	isoelektrischer Punkt
pmol	picomolar
RNA	Ribonukleinsäure
RPC	Reversed-Phase-Chromatographie
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
SLE	Systemische Lupus Erythematoses
St.	Standard (Größenmarker)
TFA	Trifluoressigsäure
Tris-HCl	Trishydroxy-methyl-aminomethan-Hydrochlorid
TSB	Tryptic Soy Broth
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

Die Abkürzungen zur Bezeichnung der Aminosäuren und Nukleotide entsprechen der Drei- bzw. Einbuchstaben-Nomenklatur.

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau des Immunsystems	1
1.1.1	Rolle des Thymus im Immunsystem	3
1.1.2	Die unspezifische Abwehr des Immunsystems	4
1.1.3	Autoimmunerkrankungen	5
1.2	Antimikrobielle Peptide	6
1.2.1	Wirkungsweise antimikrobieller Peptide	7
1.2.2	Resistenzentwicklung von Bakterien	9
1.3	Zielsetzung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Herstellung einer Kalbsthymus-Peptidbank	12
2.1.1	Peptidextraktion	12
2.1.2	Präparative Kationenaustausch-Chromatographie	13
2.1.3	Präparative Reversed-Phase-Chromatographie	14
2.1.4	Gefriertrocknung von Peptiden	14
2.2	Chromatographische Methoden	15
2.2.1	Reversed-Phase-HPLC	15
2.2.2	Kationenaustausch-HPLC	17
2.2.3	Entsalzung von Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie	18
2.3	Analytische Methoden	19
2.3.1	Massenspektrometrie	19
2.3.1.1	Matrix-assisted laser desorption / ionisation-time of flight (MALDI-TOF)	19
2.3.1.2	Elektronenspray-Massenspektrometrie (ESI-MS)	19
2.3.2	Kapillaronenelektrophorese	20
2.3.3	Edman-Sequenzierung	21
2.3.4	Aminosäureanalytik (ASA)	21
2.3.5	Hydrolyse von Peptiden mit der Protease Subtilisin	22
2.4	Molekularbiologische Methoden	23
2.4.1	Kits und Oligonukleotide	23
2.4.2	RNA-Isolierung aus Rinder-Dünndarm	25
2.4.3	Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)	26
2.4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.4.5	Auftrennung der DNA durch Gelelektrophorese	28
2.4.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	29

2.4.6.1 T/A-Klonierung	29
2.4.6.2 Isolation von DNA aus Agarosegelen	30
2.4.6.3 Ligation	30
2.4.6.4 Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.4.6.5 „Blau-Weiß-Selektion“	32
2.4.7 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Kulturen	32
2.4.8 Restriktionsanalyse	33
2.4.9 Sequenzierung von DNA	33
2.5 Mikrobiologische Methoden	35
2.5.1 Lagerung und Anzucht von aeroben Bakterien	35
2.5.2 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von Peptiden	36
2.5.2.1 Radial-Diffusionshemmtest	36
2.5.2.2 Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC)	37
2.5.2.3 Qualitativer Nachweis von Lysozym	38
2.5.3 Bestimmung der hämolytischen Wirkung von Peptiden	39
2.5.4 Bestimmung der cytotoxischen Wirkung von Peptiden	40
2.5.4.1 Zellkultivierung	40
2.5.4.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	41
2.5.4.3 Cytotoxizitätstest	41
3 Ergebnisse und Diskussion	43
3.1 Herstellung einer Peptidbank aus Kalbsthymus	45
3.1.1 Gewebeextraktion	45
3.1.2 Peptidbankherstellung	46
3.1.2.1 Kationenaustausch-Chromatographie	46
3.1.2.2 Reversed-Phase-Chromatographie	48
3.2 Antimikrobielles Screening	50
3.2.1 Wirkung von Thymuspeptiden auf Bakterien	50
3.2.2 Bestätigung der Peptidstruktur ausgewählter Peptidbank-Fractionen durch Hydrolyse	54
3.2.3 Konzentrationsabhängigkeit der antimikrobiell aktiven Fraktion	56
3.3 Entwicklung eines Verfahrens zur Trennung von Thymuspeptiden	58
3.4 Reinigung von antimikrobiellen Peptiden aus Kalbsthymus	67
3.4.1 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (104-122)	68
3.4.2 Glycin-rich-Protein (95-133)	71

3.4.3	Nucleolin (40-141 / 142 / 143)	76
3.4.3.1	Isolierung von bNucleolin-Fragmenten aus der Kalbsthymus-Peptidbank	76
3.4.3.2	Ermittlung der genomischen Sequenz des bovinen Nucleolin-Fragmentes	79
3.4.3.3	Vergleich von bNucleolin (40-141 / 40-142 / 40-143)	83
3.4.4	Histon H1.2 (83-139)	86
3.4.5	Nuclear Mitotic Apparatus Protein (2052-2103)	89
3.4.6	Zusammenfassende Betrachtung	93
3.5	Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden aus Kalbsthymus	95
3.5.1	Wirkungsspektrum von antimikrobiellen Thymuspeptiden	96
3.5.2	Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC)	100
3.5.3	Untersuchungen zur Wirksamkeit der Peptide	104
3.5.3.1	Hämolytische Aktivität	104
3.5.3.2	Cytotoxische Aktivität von Thymuspeptiden	107
4	Zusammenfassung	111
5	Literaturverzeichnis	113
6	Anhang	127
6.1	Geräte und Chemikalien	127
6.2	Dokumentation der Reinigung der antimikrobiellen Peptide	132
6.2.1	Reinigung von bGAPDH (104-122)	134
6.2.2	Reinigung von bGRP (95-133) und bNucleolin (40-141 / 142 / 143)	136
6.2.3	Reinigung von bNuMA (2052-2103)	139
6.2.4	Reinigung von bHiston H1.2 (83-139)	141

1 Einleitung

Die Resistenzentwicklung von ständig größer werdenden Populationen an verschiedenen Bakterienstämmen gegen bisher wirksame Antibiotika stellt ein ernstzunehmendes globales Problem dar. Ein Lösungsansatz ist die Suche nach neuen antimikrobiellen Wirkstoffen. In den letzten Jahren rückten antimikrobielle Peptide als neue, vielversprechende Wirkstoffklasse in den Blickpunkt des Interesses.

Gegenstand dieser Dissertation ist die Reinigung, Identifizierung und Charakterisierung von neuen antimikrobiellen Peptiden aus Kalbsthymus, die potentiell einen wesentlichen Bestandteil der unspezifischen Abwehr des angeborenen Immunsystems darstellen.

1.1 Aufbau des Immunsystems

Täglich ist der Organismus einer Vielzahl von Keimen ausgesetzt, die ihn schädigen oder in seiner Funktion beeinträchtigen können. Im Verlauf der Evolution haben sich aufgrund der Vielzahl an potentiell pathogenen Keimen verschiedene Schutzmechanismen und Abwehreinrichtungen ausgebildet, die das Überleben der Spezies gewährleisten sollen. Das menschliche Abwehrsystem kann in vier Teilsysteme gegliedert werden. Zum einen ist der Körper in der Lage durch unspezifische Maßnahmen, bei denen die zelluläre und humorale Immunantwort unterschieden werden, auf Eindringlinge zu reagieren. Dieser Mechanismus ist angeboren. Zum anderen kann das Immunsystem die Fähigkeit erwerben, bestimmte Krankheitserreger spezifisch abzuwehren, wenn er mit ihnen in Kontakt kommt. Auch bei dieser gezielt gegen Antigene gerichteten Abwehrmaßnahme wird eine zelluläre und eine humorale Immunantwort unterschieden (Abbildung 1) (Hänsch, 1986).

Teilsysteme der Abwehr	zellulär	humoral
	spezifisch	T-Zellen T-Helferzellen T-Gedächtniszellen T-Suppressorzellen zytotoxische T-Zellen
unspezifisch	NK-Zellen Makrophagen neutropile Granulozyten	Komplement Zytokine Lysozym

Abbildung 1: Teilsysteme der Abwehr des Immunsystems (<http://www.medizininfo.de>).

Ziel der spezifischen humoralen Abwehr ist die Bildung großer Mengen von Antikörpern. Verantwortlich dafür sind die B-Lymphozyten, die in der fötalen Leber und der Milz gebildet und später im Knochenmark geprägt werden. Dabei kommt es zu einem ersten Antigenkontakt, bei welchem sich membrangebundene spezifische Antikörper auf der B-Zelle bilden. Anschließend gelangen die Zellen in das Blut und die Lymphbahnen. Der Kontakt der B-Zellen mit "ihrem" Antigen resultiert in einer vermehrten Proliferation und Differenzierung in antikörper-produzierende Plasmazellen. Nach einer Infektion bleibt ein Teil der B-Zellen als B-Gedächtniszellen erhalten.

Die wichtigsten Zellen der spezifischen zellulären Abwehr sind die T-Lymphozyten. Sie werden im Thymus geprägt. Anschließend zirkulieren die T-Lymphozyten im Blut und den Lymphbahnen. Wird eine antigenpräsentierende Zelle aktiviert, bildet diese das Cytokin Interleukin 1, welches die Proliferation von T-Lymphozyten anregt. Bei dem Zusammentreffen von T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen, das heißt Zellen, die ihr spezielles Antigen auf der Oberfläche gebildet haben, können T-Lymphozyten über Rezeptoren an diese Zellen binden. Infolgedessen wird die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen in spezifische T-Zell-Subklassen (T-Helferzellen, T-Suppressorzellen, T-Gedächtniszellen und Cytotoxische Zellen) eingeleitet (Picker und Butcher, 1992; Hänsch, 1986; Collins, 1979).

1.1.1 Rolle des Thymus im Immunsystem

Der Thymus gehört wie das Knochenmark, die Milz und die fötale Leber zu den primären lymphatischen Organen, die der Entstehung, Entwicklung und Reifung von Immunzellen dienen.

In der Ontogenese entsteht der Thymus aus der dritten Schlundtasche. Der normale menschliche Thymus bildet sich bereits während der fötalen Entwicklung in der 7. bis 8. Gestationswoche. Der Thymus ist aus zwei pyramidenförmigen Lappen aufgebaut, die sich im oberen Brustbereich, direkt über dem Herzen und den großen Blutgefäßen befinden.

Beim Neugeborenen ist der Thymus etwa so groß wie das Herz, wächst bis zum dritten Lebensjahr und behält dann sein Gewicht bis zur Pubertät. Mit zunehmendem Lebensalter atrophiert der Thymus und wandelt sich in Binde- und Fettgewebe um (Picker und Butcher, 1992).

Der Thymus besteht aus zwei Kompartimenten, dem Cortex und der Medulla, die T-Vorläuferzellen (im weiteren Verlauf als Thymozyten bezeichnet), Makrophagen und Epithelzellen enthalten. Dicht gepackt halten sich ca. 85 % der Thymozyten im Cortex auf. Die Morphologie des Thymus ist schwammig, da die Thymozyten in die Maschen des aus Septen bestehenden Netzes eindringen und das Epithel auseinanderdrücken. Die Blutversorgung des Thymus wird durch mehrere Arterien gewährleistet, die das Organ durchziehen und von denen kleinere Kapillaren abzweigen. Die Wände der corticalen Kapillaren und postkapillären Venolen sind verstärkt und für Blutzellen undurchlässig (Blut-Thymus-Schranke). Jedoch sind die corticalen Blutgefäße für niedermolekulare, lösliche Substanzen permeabel, während durch die Wände der medullären Gefäße auch höhermolekulare Stoffe diffundieren können. Diese Durchlässigkeit nimmt allerdings im adulten Stadium ab (Haynes und Hale, 1998; Moll, 1997).

Der Thymus ist entscheidend an der Reifung und Entwicklung von T-Lymphozyten sowie der Rekrutierung von T-Vorläuferzellen beteiligt (Low *et al.*, 1979; Picker und Butcher, 1992). So konnte die Induktion der T-Zelldifferenzierung durch Thymuspeptide und ihre Wirkung als neuromuskuläre Transmitter nachgewiesen werden (Basch und Goldstein, 1974; Goldstein, 1974). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß der HIV-Virus in der Lage

ist, die Thymus-Blut-Schranke zu überwinden, und der Thymus somit ein Ziel für virale Infektionen darstellt (McCune *et al.*, 1998). Der adulte Thymus ist jedoch nach einer antiretroviralen Therapie in der Lage, zum Wiederaufbau des Immunsystems beizutragen (Douek *et al.*, 1998, Morozov und Khavinson, 1997).

1.1.2 Die unspezifische Abwehr des Immunsystems

Eine der ersten Barrieren des Körpers gegen fremde Eindringlinge, wie Bakterien, Pilze oder Viren stellt die unspezifische Immunantwort dar. Neben der unspezifischen zellulären Immunabwehr, zu denen natürliche Killerzellen (NK-Zellen), neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen gehören, ist der Körper in der Lage, sich durch Expression antimikrobiell wirkender Enzyme, Proteine und Peptide zu schützen. Das unspezifische Immunsystem verfügt über kein immunologisches Gedächtnis, kann aber innerhalb von wenigen Sekunden nach einer Infektion aktiviert werden, während das spezifische System, erst nach einer Woche große Mengen eines Antikörpers produzieren kann. Die unspezifische humorale Abwehr besteht aus dem Komplementsystem, Akutphaseproteinen und Interferonen. Das Komplementsystem ist gegen Bakterien gerichtet. Die verschiedenen löslichen Plasmaproteine des Komplementsystems können bakterielle Proteine erkennen, Freßzellen anlocken und die Zellwände von Bakterien auflösen. Die Aktivierung des Komplementsystems führt zu drei alternativen Ergebnissen: Markierung von Bakterien zwecks Beseitigung durch Makrophagen, Bekämpfung der Bakterien mittels einer induzierten Entzündungsreaktion oder Lyse der Bakterienzellwand durch Prozessierung von antimikrobiell wirkenden Enzymen, Proteinen und Peptiden (Picker und Butcher, 1992; Hänsch, 1986, Collins, 1979; Casey, 2000). Eine weitere Möglichkeit zur Freisetzung von intrazellulär gebildeten antimikrobiellen Substanzen ist die induzierte Apoptose von Zellen. So konnte *in vitro* nachgewiesen werden, daß bei einer limitierten Anzahl von Epithelzellen, die von pathogenen Erregern wie Salmonellen und Shigellen infiziert sind, Apoptose als ein unspezifischer Abwehrmechanismus induziert werden kann (Hecht, 1999).

1.1.3 Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen werden durch Antikörper verursacht, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind und dadurch einen Gewebs- oder Organschaden verursachen. Diese Art der Reaktion wird durch immunogene Toleranz vermieden, die den Körper unterscheiden läßt, was körpereigen ist und die Produktion von Antikörpern verhindert, die gegen diese Strukturen gerichtet sind.

Autoimmunreaktionen können durch verschiedene Mechanismen induziert werden. Genetische Determination, unvollständige Deletion von antikörperproduzierenden Lymphozyten, Tumorzellen, eine nicht funktionsfähige Toleranz, chemische, physikalische oder biologische Veränderungen eigener Proteine, wie Denaturierung, Proteolyse, Methylierung oder Glykosylierung, sowie verschiedene Umwelteinflüsse wie Toxin- und Medikamenteneinflüsse oder Infektionen können Autoimmunreaktionen auslösen.

Intrazelluläre Antigene, die bei der Apoptose von Zellen freigesetzt werden, die von Verletzungen, Vergiftungen oder Infektionen induziert wird, bewirken die Produktion von Antikörpern. Diese Antikörper, die gegen mitochondriale und nukleäre Proteine oder Proteinfragmente gerichtet sind, sind beim gesunden Menschen nur im geringeren Maße vorhanden. Bei Autoimmunerkrankten erfolgt eine verstärkte Produktion dieser Antikörper. Diese sind in hohen Konzentrationen im Serum der Patienten nachzuweisen und sprechen für verstärkte Apoptose der Zellen und Freisetzung der intrazellulären Bestandteile ins Serum (Haynes *et al.*, 2000).

Auch Bakterien oder Viren nutzen die immunologische Toleranz aus, indem sie im Verlauf der Evolution wirtsähnliche Oberflächenstrukturen entwickelt haben. Diese, den Autoantigenen ähnlichen Strukturen können bei Autoimmunerkrankten eine Immunreaktion auslösen, die zu Organerkrankungen führen kann (Hänsch, 1986).

1.2 Antimikrobielle Peptide

Bakterien können über verschiedene Wege in den Organismus gelangen und halten sich, entsprechend ihrer Bedürfnisse, präferentiell in bestimmten Regionen des Organismus auf. Daher kommt der lokalen Abwehr der Bakterien eine besondere Bedeutung zu. Die erste unspezifische und sehr schnelle Abwehr gegen das Eindringen von Bakterien ist die Bildung von antimikrobiellen Peptiden. Aufgrund der geringen Größe von antimikrobiellen Peptiden im Vergleich zu spezifisch gebildeten Antikörpern ist für ihre Synthese ein geringerer Energieaufwand notwendig (Rao, 1995). Weiterhin ist die Entstehung von Peptiden durch Proteolyse von großen Proteinen, wie Lactoferrin oder Hämoglobin (Bellamy *et al.*, 1992; Fogaca *et al.*, 1999) möglich. Sie stehen daher in relativ großen Mengen zur Verfügung. Da Amphibien und Insekten kein erworbenes Immunsystem wie Säugetiere besitzen, haben antibiotische Peptide bei diesen Spezies eine große Bedeutung für den Schutz vor eindringenden Mikroorganismen (Boman, 1991; Boman, 1995).

In Säugetieren und dem Menschen konnten in den letzten Jahren eine Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden nachgewiesen werden. Die meisten sind unmittelbar auf epithelialen Oberflächen des Darms und der Haut sowie in Körperflüssigkeiten, wie Blut und Tränenflüssigkeit lokalisiert und können während einer Infektion oder Entzündung exprimiert werden (Gallo *et al.*, 1994; Frohm *et al.*, 1997). Besonders Blutzellen sind reich an antimikrobiellen Peptiden. So konnten α -Defensine aus NK-Zellen (Agerberth *et al.*, 2000), Granulysin und NK-Lysin aus T- und NK-Zellen (Krensky, 2000; Andersson *et al.*, 1996), β -Defensin, Indolicidin, Bactenecin und Protegrine aus neutrophilen Granulozyten (Selsted *et al.*, 1992; Selsted *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2000; Sorensen *et al.*, 1999; Charp *et al.*, 1988), CAP18, und Rhesus theta Defensin-1 aus Leukozyten (Tang *et al.*, 1999; Nillson *et al.*, 1999) isoliert werden.

Auch im Thymus konnte die Genexpression von antimikrobiellen Peptiden, wie β -Defensinen (Zhang *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1996) und Cathelicidin (Wu *et al.*, 1999) nachgewiesen werden. Diese Peptide konnten allerdings bisher noch nicht aus diesem Gewebe isoliert werden. Die antimikrobielle Wirkung von Histonen aus Thymusextrakten ist schon seit längerer Zeit Gegenstand von Untersuchungen (Weissmann und Graf, 1947).

Verschiedene Studien zeigen, daß antimikrobielle Peptide durch enzymatische Hydrolyse von Proteinen wie Lactoferrin, Hämoglobin und Histonen entstehen. Diese Proteinfragmente zeigen eine größere antimikrobielle Aktivität als die Precursorproteine (Kim *et al.*, 2000; Fogaca *et al.*, 1999; Andreu und Rivas, 1998). Allerdings können auch antimikrobielle Peptide aus Proteinen entstehen, die ursprünglich keine Wachstumshemmung auf Mikroorganismen zeigen, wie das für mehrere antimikrobiell wirksame Fragmente von Casein gezeigt werden konnte, die nach Proteolyse aus Milch isoliert wurden (Liepke *et al.*, 2001; Zucht *et al.*, 1995).

Bisher werden zwei Gruppen von antibiotischen Peptiden als Medikamente eingesetzt. Dabei handelt es sich um Lipopeptide, wie Gramicidin und Polymyxin sowie Glycopeptidantibiotika, wie Vancomycin und Teicoplanin (Hancock, 1997). Verstärkte Bemühungen in Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika zeigen allerdings, daß kationische antimikrobielle Peptide immer mehr an Bedeutung gewinnen. So befinden sich mehrere Peptidantibiotika, wie IB-367 der Firma Intrabiotic und rBPI-21 (Xoma) oder Magainin-Derivate (Magainin Pharmaceuticals) in Phase II und III der klinischen Erprobung (Bush und Macielag, 2000; Garred, 2000; Hancock, 2000; Latham, 1999; Scannon, 1999).

1.2.1 Wirkungsweise antimikrobieller Peptide

Antimikrobielle Peptide gehören zu den Hauptkomponenten des humoralen unspezifischen Immunsystems. Sie bestehen aus 12-50 Aminosäuren und haben eine positive Gesamtnettoladung größer +2, daß heißt, die kationischen Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Histidin sind entsprechend häufiger vorhanden als saure Aminosäuren wie Asparagin- und Glutaminsäure. Generell wird davon ausgegangen, daß der Anteil an hydrophoben Aminosäuren größer 50 % ist, eine Eigenschaft, die eine wesentliche Voraussetzung für den Wirkmechanismus von kationischen Peptiden darstellt (Hancock und Diamond, 2000).

Die Wirkungsweise von kationischen antibiotischen Peptiden ist von ihrer Struktur abhängig. Die Peptide werden in vier strukturelle Hauptklassen eingeteilt. Lineare α -helikale Peptide besitzen keine Cysteinbrücken und haben einen amphipathischen Charakter, durch welchen sie mit der hydrophoben Membran von Bakterien interagieren können. Die meisten der bisher

isolierten, natürlichen Peptidantibiotika gehören dieser Gruppe an und zeigen ein breites Wirkungsspektrum.

Eine weitere Klasse stellen Peptide mit einer β -Faltblattstruktur dar, die durch zwei oder mehr Cysteinbrücken stabilisiert ist. Sie wirken ebenfalls als Breitbandantibiotika. Zu dieser Klasse gehören Peptide wie Defensine und Protegrine. Durch die Cysteinbrücken kommt es zu einer Fixierung der positiven Nettoladungen an der Außenseite der Peptide, wodurch eine Interaktion mit der negativ geladenen Bakterienmembran möglich ist.

Die dritte Klasse bilden die prolinreichen Peptide. Die ausgestreckte („extended“), freidrehbare Struktur der Peptide wird durch eine Vielzahl an Prolinresten bewirkt. Die Peptide sind durch zwei Regionen charakterisiert, eine basische und eine hydrophobe Region.

Die vierte Gruppe von antimikrobiellen Peptiden bilden die cyclischen Peptide. Es handelt sich um kleine Peptide mit bis zu 15 Aminosäuren, die wie z.B. das Bactenecin durch eine Cysteinbrücke charakterisiert sind. Im Gegensatz zu den Peptiden, die eine β -Faltblattstruktur besitzen, verlieren diese Peptide ihre antimikrobielle Wirksamkeit bei Verlust der Disulfidbindung nicht (Hancock, 1997; Hancock und Nair, 2000; Hancock und Diamond, 2000). Allerdings konnte gezeigt werden, daß Rhesus-Theta-Defensin-1, ein cyclisches Peptid, welches sich aus zwei trunkierten Defensinstrukturen zusammensetzt und aus primären humanen Leukozyten isoliert wurde, bei Verlust der cyclischen Struktur nicht antimikrobiell wirkt (Yang *et al.*, 1999).

Der Wirkmechanismus von antibiotischen Peptiden wurde durch elektronenmikroskopische, enzymatische und Membranbindungsstudien untersucht. Nach Auffassung der meisten Autoren agieren ein Großteil der antimikrobiellen Peptide zunächst mit negativ geladenen LPS-Molekülen bei Gram-negativen und Teichonsäure bei Gram-positiven Bakterien, die sich jeweils an der Außenseite der Bakterienmembran befinden. Nach Orientierung der Peptide parallel zur Membran kommt es durch den Überschuß an kationischer Ladung zu einer elektrostatischen Interaktion mit den Liposomen und Lipidschichten der Bakterienmembran. Bei genügend großer Konzentration bildet das Peptid kleine Poren in die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien. Die amphipathische Struktur der Peptide ermöglicht es ihnen anschließend, in die Cytoplasmamembran einzudringen und die thermodynamische Membranfluidität zu verändern. Dies bewirkt wiederum eine größere Permeabilität der

Bakterienmembran für extra- und intrazelluläre Stoffe (Vaara, 1992; Tossi *et al.*, 2000; Hancock und Nair, 2000). Dieser Vorgang stellt den eigentlichen tödlichen Schritt in der Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden dar, da es durch den unkontrollierten Stoffaustausch zum Zusammenbruch des Membranpotentials und damit zum Absterben der Bakterien kommt.

Einige Peptidantibiotika, wie Buforin II, ein antimikrobiell wirksames Histonfragment, penetrieren die Zelle, ohne die Zellmembran zu permeabilisieren. Buforin II wird im Cytoplasma akkumuliert und kann durch sekundäre Effekte, wie DNA- oder Proteinbindung bzw. Einbau der Moleküle in die Membran während des Wachstums, die Proliferation der Bakterien inhibieren (Park *et al.*, 2000; Edgerton *et al.*, 2000).

1.2.2 Resistenzentwicklung von Bakterien

Die in den letzten 50 Jahren entwickelten semisynthetischen und synthetischen Antibiotika wurden mit großem Erfolg gegen lebensbedrohliche Infektionserreger eingesetzt. Doch bereits seit den Anfängen der zunächst immens erfolgreichen Therapie gegen Ende der vierziger Jahre und im Laufe der Zeit bildeten immer mehr Keime gegen eines oder zunehmend verschiedene dieser Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen Resistenzen aus. Heute existieren Stämme von mindestens drei pathogenen Bakterienarten, die gegen sämtliche in der Klinik verwendeten Antibiotika resistent sind. Dabei handelt es sich um Varianten von *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Pseudomonas aeruginosa* (Hancock, 1997; Levy, 1998).

Die Ursachen für das Auftreten von Resistenzen sind vielfältig. Ein Grund liegt in dem überflüssigen und oftmals falschen Gebrauch von Antibiotika. So führt der unkontrollierte Gebrauch, die zu kurze oder zu niedrig dosierte Einnahme von Antibiotika zur Entstehung resistenter Bakterienstämme, die um so schwerer zu therapierende Infektionen auslösen können (Avorn und Salomon, 2000).

Nur ca. 40 % aller heute produzierten Antibiotika werden in der humanen Medizin eingesetzt. In der Tierhaltung und Landwirtschaft werden häufig die gleichen oder ähnlich wirkende Antibiotika wie in der Humanmedizin verwendet. Dies führt bei langzeitlicher Verfütterung

zu neuen antibiotikaresistenten Bakterienstämmen, die durch den Verzehr von landwirtschaftlichen Produkten auch auf den Menschen übertragen werden können (Johnston, 2000).

Resistenzen entstehen durch spontane oder durch Umwelteinflüsse induzierte Mutationen. Durch Resistenzgene sind Bakterien in der Lage, sich vor dem wachstumshemmenden Einfluß der Antibiotika zu schützen. Bakterien können Proteine exprimieren, die Antibiotika enzymatisch innerhalb und außerhalb der Zelle abbauen oder chemisch modifizieren, was zur Inaktivierung führt. Dieser Mechanismus ist besonders bei der Resistenzentwicklung gegen β -Lactam-Antibiotika, Aminoglycoside und Makrolide entscheidend. Bei andere Bakterien sind die Zielmoleküle, mit welchen der Wirkstoff eine erste Interaktion eingeht, verändert oder durch andere ersetzt. Dieser Resistenzmechanismus bildet sich insbesondere beim Einsatz von β -Lactam-Antibiotika aus. Einige Bakterienstämme schließen die Eintrittspforten für antibiotische Moleküle bzw. verfügen über eine „Efflux-Pumpe“, durch welche Antibiotika wieder aus der Bakterienzelle transportiert werden (Chopra *et al.*, 1997; Levy, 1998; Finch, 1998).

Die Resistenzentwicklung vieler Bakterien ist darauf zurückzuführen, daß es ihnen möglich ist, Resistenzgene innerhalb einer Generation auszutauschen. Die erforderliche Erbinformation befindet sich nicht nur im Bakterienchromosom, sondern auch auf Plasmiden. Plasmide sind extrachromosomale, sich autonom duplizierende doppelsträngige DNA-Moleküle und verfügen sowohl über Resistenz- als auch über Transferegene. Diese veranlassen die Wirtszellen, einen Konjugationsapparat auszubilden und mit Nachbarzellen in physischen Kontakt zu treten. Somit kann die Wirtszelle auch ihre DNA zu Zellen anderer Bakterienstämme übertragen. (Levy, 1998; Tossi *et al.*, 2000). Die Übertragung eines Resistenzgens kann jedoch auch durch Viren erfolgen. Viren sind wesentlich schneller als andere Mikroorganismen in der Lage, Erbsubstanz der Wirtszelle in die eigene DNA einzubauen und anschließend auf andere Zellen zu übertragen (Miller, 1998).

Obwohl Lysozym bereits 1922 von Fleming entdeckt wurde, konnte bisher keine unmittelbare Resistenzausbildung von Bakterien gegen das antimikrobielle Peptid festgestellt werden. Einige Bakterien wirken allerdings regulierend auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden. So konnte nachgewiesen werden, daß Shigellen in der Lage sind, durch Adhäsion der Bakterien an die Epithelzellen des Wirts eine Abregulation der Expression der

antimikrobiellen Peptide LL-37 und humanes β -Defensin 1 zu induzieren (Islam *et al.*, 2001). Dadurch ist der Wirt einer Invasion von pathogenen Keimen zunächst schutzlos ausgeliefert, da die Aktivierung des spezifischen Immunsystems mehrere Tage in Anspruch nimmt. Die Ausbildung weiterer Mechanismen zur Resistenzbildung gegen antimikrobielle Peptide ist bisher nicht bekannt.

1.3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bisher unbekannte, natürlich in Säugetieren vorkommende, antimikrobiell wirksame Peptide zu isolieren. Als Ausgangsmaterial für die Reinigung von antibiotischen Peptiden wurde Kalbsthymus gewählt, da bereits die antimikrobielle Wirkung von aus Thymus isolierten Histonen bekannt ist, und die Expression von wachstumshemmenden Peptiden im Thymus nachgewiesen werden konnte (Zhang *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1999; Weissmann und Graf, 1947). Peptide mit dieser Eigenschaft sollten gereinigt und ihre Primärstruktur aufgeklärt werden. Mit Hilfe der synthetisch hergestellten Peptide sollte ihre antimikrobielle Wirksamkeit sowie ihre Selektivität bei der Beeinflussung des Wachstums von Bakterien, Hefen und Zellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung einer Kalbsthymus-Peptidbank

2.1.1 Peptidextraktion

Zur Herstellung einer Peptidbank aus Kalbsthymus wurde den Kälbern unmittelbar nach der Schlachtung im Schlachthof Bocholt (Fa. Brüninghoff) der Thymus entnommen. 20 kg des Thymusgewebes wurden portionsweise mit 30 l 2-fach konzentriertem Extraktionspuffer und Eis versetzt und 5 min in einem Waring Blender homogenisiert. Das gesamte Homogenisat hatte ein Volumen von 60 l. Die Peptide wurden über Nacht bei 4 °C mit Hilfe eines IKA-Rührers aus dem Zellhomogenisat durch langsames Rühren extrahiert. Die Abtrennung des Zellsediments erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C und 15600 x g für 30 min. Das entstandene Sediment wurde verworfen. Der Überstand (40 l) wurde über Filterpapier unterschiedlicher Porengröße (7 - 12 µm und 12 - 25 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) zweimal bis zur Klarheit filtriert. Die nachfolgende Ultrafiltration des Filtrates wurde auf einer Sartocoon Mini Crossflow Anlage (3 x 0,1 m²) bei 4 °C durchgeführt. Bei einem Fluß von 60 - 100 l/h wurde die Proteinlösung über eine Polysulfon-Membran mit einer Ausschlußgrenze von 50 kDa auf 24,8 l (Permeat 1) aufkonzentriert. Im Anschluß wurde das Retentat (7,2 l) mit 30 l Extraktionspuffer diafiltriert. Das entstehende Permeat 2 (34,5 l) wurde mit Permeat 1 vereinigt, mit verdünnter Salzsäure auf einen pH von 2,5 eingestellt und durch Kationenaustausch-Chromatographie separiert (Seiler *et al.*, 1999).

Extraktionspuffer:

1 M Essigsäure
10 mM Ascorbinsäure
0,5 mM EDTA

2.1.2 Präparative Kationenaustausch-Chromatographie

Für die präparative Chromatographie wurde ein starker Kationenaustauscher (Fraktogel TSK SP 650 (M) 32 x 250mm, Merck, Darmstadt) verwendet. Als Chromatographiesystem diente ein Autopilot der Firma PerSeptive Biosystems (Framingham), der mit einer Flußrate von 1 l/min betrieben wurde. Der Autopilot wurde von einem Computer mit dem Datensystem 450 gesteuert.

Tabelle 1: Zusammensetzung der bei der Kationenaustauschchromatographie verwendeten Eluenten.

Eluent	Zusammensetzung	pH-Wert	pH-Pool
A	VE-Wasser mit HCl	2,50	0
B	0,1 M Citronensäure-1-hydrat	3,60	1
C	0,1 M Essigsäure + 0,1 M Natriumacetat	4,50	2
D	0,1 M Bernsteinsäure	5,60	3
E	0,5 M Ammoniumacetat	7,00	4
F	VE-Wasser	7,20	5
G	0,1 M Natronlauge	13,00	6

Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung der Lösungen, die als Eluenten für die pH-Stufenelution verwendet wurden. Die Peptide wurden im Batchverfahren (pH-Stufengradient) durch Lösungen mit aufsteigenden pH-Wert eluiert. Nach dem Absinken der UV-Absorption auf einen Minimalwert erfolgte der Wechsel der Eluenten. Dadurch war es möglich, die Thymuspeptide in 7 pH-Pools aufzutrennen. Auf Grund des geringen Peptidgehalts wurden die pH-Pools 5 und 6 vereinigt (im folgenden pH-Pool 5 genannt). Die Peptidlösungen der einzelnen pH-Pools, welche zur Vermeidung von Proteolyseaktivität nachfolgend auf pH-Werte von 2,5 - 3,5 eingestellt wurden, dienten als Ausgangsmaterial für eine weitere Auftrennung durch Reversed-Phase-Chromatographie (Seiler *et al.*, 1999; Schulz-Knappe *et al.*, 1997).

2.1.3 Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Zur Herstellung der Peptidbank wurde als nächster Trennschritt eine präparative Reversed-Phase-Chromatographie (RP) der erhaltenen pH-Pools durchgeführt. Der Peptidgehalt der einzelnen pH-Pools wurde durch Aminosäureanalyse (ASA) bestimmt (Kapitel 2.3.4). Anhand des Peptidgehalts wurden Reversed-Phase-Säulen unterschiedlicher Beladungskapazität für die weitere Trennung der Thymuspeptide gewählt. Die Peptidlösungen der pH-Pools 0 – 4 wurden auf eine Reversed-Phase-Säule (RP C-15 Source, 100 x 150 mm, 15 µm, Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Bei einem linearen Gradienten von 1 % B/min und einem Fluß von 130 ml/min wurden die Peptidgemische in 60 min eluiert. Als Fließmittel wurde 10 mM HCl in 80 % ACN verwendet. Die Fraktionsgröße betrug 200 ml. Als Chromatographiesystem wurde eine HPLC-Anlage der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Die Peptidlösung des pH-Pools 5 wurde mit Hilfe einer YMC-Kartusche (RP C-18, 47 x 300 mm, 15 – 30 µm, YMC, Schernbeck) bei einem Fluß von 40 ml/min getrennt. Die Elutionszeit betrug 50 min bei einem linearen Gradienten von 1,2 % B/min. Als Chromatographiesystem diente die BioCad 60 HPLC-Anlage der Firma PerSeptive Biosystems (Freiburg). Das Eluat wurde in einem Volumen von 50 ml fraktioniert. Die 46 Fraktionen jedes pH-Pools wurden bei –80 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Die Lagerung der Lyophilisate erfolgte bei –20 °C.

2.1.4 Gefriertrocknung von Peptiden

Zum Lyophilisieren wurden die Peptidlösungen zunächst bei –80 °C eingefroren. Die Fraktionen wurden unter Vakuum in einer "Speedvac"-Zentrifuge (RC 10.10, Jonan) oder einer Lyophille (Christ, Alpha 1-4, Sigma, Osterode) gefriergetrocknet. Dabei sollten die Probelösungen ständig gefroren bleiben.

2.2 Chromatographische Methoden

2.2.1 Reversed-Phase-HPLC

Die gefriergetrockneten Peptidbankfraktionen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst, und die unlöslichen Bestandteile durch Filtration (Minisart (17597) 0,2 µm, Sartorius, Göttingen) abgetrennt. Die Trennung des Peptidgemisches erfolgte durch einen linearen Anstieg von Solvent B im Elutionsmittel. Gradient, Fließgeschwindigkeit und Detektionswellenlänge sind bei den jeweiligen Chromatogrammen angegeben. Alle weiter verwendeten Fraktionen der einzelnen Chromatographieschritte wurden 1:5 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und auf die stationäre Phase aufgetragen.

Für die Trennung verwendete Säulen und Chromatographieranlagen sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: RP-Chromatographiesäulen und -anlagen, die für die Isolierung von antimikrobiellen Peptiden verwendet wurden.

	Säulenmaterial	Chromatographieranlage
A	Bakerbond, RP C-18, 47 x 300 mm, 300 Å, 15 - 30 µm, Waters (Milford)	BioCad 60, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
B	Pharmacia Source, RP C-15, 10 x 250 mm, 120 Å, 5 µm (Freiburg)	Kontron 422 S (Henningen)
C	Zorbax, RP C-3, 4,6 x 250 mm, 100 Å, 5 µm, MZ-Analysentechnik (Mainz)	Kontron 422 S (Henningen)
D	ReproSil-Pur, RP C-18-AQ, 4,6 x 250 mm, 120 Å, 5 µm, Dr. Maisch (Ammerbruch)	Kontron 422 S (Henningen)
E	Vydac, RP C-18, 4,6 x 250 mm, 100 Å, 5 µm (Hesperia)	Kontron 422 S (Henningen)

Die Säulen wurden in 20 % Methanol gelagert.

Zur Herstellung der organischen Lösungen wurden die verwendeten Fließmittel mit bidestilliertem Wasser aus der Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF}plus, Millipore, Eschborn) angesetzt. Die verwendeten Eluenten wurden mit einem Heliumstrom 10 min entgast. Die für die RP-Chromatographie verwendeten Fließmittel sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Fließmittel, die für die Reinigung von antimikrobiellen Peptiden verwendet wurden.

	Eluent A	Eluent B
1	10 mM HCl	80 % ACN / 10 mM HCl
2	20 % MeOH / 10 mM HCl	100 % MeOH / 10 mM HCl
3	0,1 % TFA	80 % ACN / 0,1 % TFA
4	0,1 % TFA	80 % ACN / 0,085 % TFA

Die Fraktionierung des Eluats erfolgte im Abstand von einer Minute mit einem Fraktionssammler der Firma BioRad (München).

Das Trennverhalten der analytischen Säulen wurden vor ihrer Verwendung mit Hilfe eines Peptidstandards getestet. Es wurden jeweils 4 µg der Peptide auf die Säulen aufgetragen. Alle Peptide wurden im IPF PharmaCeuticals, Abteilung Peptidsynthese hergestellt.

Peptidstandard: Brain natriuretic peptide (hBNP)
Neuropeptid Y (hNPY)
Parathyroidhormon (hPTH)
Atrial natriuretic peptide (hANP)
Growth hormone-releasing hormone (hGHRH)

2.2.2 Kationenaustausch-HPLC

Für die Kationenaustauschchromatographie (CEC) wurden folgende Säulen und Chromatographieranlagen verwendet:

Tabelle 4: Chromatographiesäulen und -anlagen, die für die Isolierung der antimikrobiellen Peptide verwendet wurden.

	Säulenmaterial	Chromatographieranlage
A	PrepPak, 10 x 125 mm, 1000 Å, 7 µm, Biotek (Östringen)	BioCad Sprint, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
B	Parcosil PepKat, 4 x 50 mm, 300 Å, 5 µm, Biotek (Östringen)	Kontron 422 S (Henningen)

Als Fließmittel dienten folgende Elutionspuffer, die vor der Verwendung 10 min mit einem Heliumstrom entgast wurden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Elutionspuffer, die für die Isolierung der antimikrobiellen Peptide verwendet wurden.

	Puffer A	Puffer B
1	50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3,0	1,5 M KCl / 50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3,0
2	10 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 4,5	1 M NaCl / 10 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 4,5

2.2.3 Entsalzung von Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie

Die Entsalzung der Proben erfolgte nach dem Prinzip der RP-Chromatographie. Die Kavitäten der 96-Loch-Extraktionsplatte (3M Empore™ 96 Well Extraction Disks, 3M Filtration Products, St. Paul) enthielten zwischen zwei Fritten RP C-18-Material. Zum Entsalzen der Probelösung wurde ein Aliquot der einzelnen Fraktionen in eine der Kavitäten pipettiert. Die Peptide binden an das Reversed-Phase-Material. Durch Spülen des RP-Materials mit 600 µl Eluent A (0,1 % TFA) wurde das gelöste Salz, welches nicht an das RP-Material bindet, abgetrennt. Die Peptide wurden anschließend mit 600 µl Fließmittel B (0,1 % TFA in 80 % ACN) eluiert. Die entsalzten Proben wurden lyophilisiert und für die Anwendung im Radial-Diffusionshemmtest in 10 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert.

Die Extraktionsplatten wurden nach ihrer Verwendung mit 100 % ACN regeneriert und in 30 % Methanol gelagert.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Bestimmungen erfolgten entweder mit dem Elektrospray-Massenspektrometer (LCQ, ThermoQuest, Egelsbach) oder mit einem Matrix-assisted laser desorption / ionisation-time of flight (MALDI-TOF) Massenspektrometer (LaserTec RBT II, PerSeptive/Vestec, Houston).

2.3.1.1 Matrix-assisted laser desorption / ionisation-time of flight (MALDI-TOF)

Die Bestimmung des Molekulargewichts mit dem Laser Tec RBT-II-Massenspektrometer (PerSeptive Biosystems, Vestec, Houston) erfolgte im linearen Modus mit einem Stickstofflaser (337 nm). Jeweils 1 µl Matrix und 1 µl salzfreie Probe wurden auf den Probenträger pipettiert, gemischt und an der Luft getrocknet. Als Matrixsubstanz wurde eine gesättigte Lösung von α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CHC) und Fucose (1:1) verwendet (Schulz-Knappe *et al.*, 1997). Die Steuerung des Spektrometers und die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm Voyager Biospectrometry Workstation Version 3.07.1 (PerSeptive Biosystems, Vestec, Houston). Bei der MALDI-Massenbestimmung treten überwiegend einfach geladene Ionen auf. Dies macht es möglich, komplexe Peptidmischungen mit dem MALDI-TOF auf ihre Massenzusammensetzung zu analysieren. Die Genauigkeit der Massenbestimmung beträgt 0,5 %.

2.3.1.2 Elektronenspray-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Für die Aufnahme der ESI-Massenspektren mit dem Massenspektrometer (LCQ, ThermoQuest, Egelsbach) wurden die salzfreien Proben lyophilisiert und in Eluent A (0,06 % TFA) resuspendiert. Dem Massenspektrometer wurde die Flüssigkeitschromatographie (LC) vorgeschaltet. Die Flußrate betrug 20 µl/min. 0,05 % TFA in 80 % ACN wurden als Elutionsmittel B verwendet. Bei einem linearen Gradienten von 1 % B/min erfolgte die

Trennung der Peptide. Diese LC / MS-Kopplung ermöglicht die Detektion von Molekülmassen unmittelbar nach der chromatographischen Auftrennung. Das Eluat wurde unmittelbar nach der Trennung durch eine RP-Chromatographiesäule (YMC ODS-AQ, 1 x 100 mm, 3 µm, Dr. Maisch, Ammerbruch, Deutschland) in ein Elektrospray-MS geleitet, in dem die Peptide nacheinander die Ionenfalle erreichen, ionisiert und detektiert werden. Die zu analysierenden Peptide verteilten sich mit Hilfe eines Stickstoffstroms in kleinste Tröpfchen (Elektro-Spray) und wurden durch eine angelegte Spannung von 4 kV zwischen Nadel und beheizbarer Kapillare ionisiert. Die Anzahl der im MS-Modus detektierten Ionen betrug $5 \cdot 10^7$ pro Messung. Das LCQ wurde mit automatischer Verstärkung während der Messung betrieben. Um die Anzahl der Ionen in der Ionenfalle konstant zu halten, werden in diesem Modus die Parameter der Ionenfalle automatisch durch das System gewählt. Die Spannung des Photomultiplier betrug -850 V. Im MS-Modus wurde die Ionenfalle mit drei Mikroskans detektiert, 10 Messungen wurden gemittelt.

2.3.2 Kapillarzonenelektrophorese

Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) diente als eine hochauflösende Analysenmethode zur Reinheitsüberprüfung von Peptiden. Dabei erfolgt die Trennung der Analytione aufgrund von Mobilitätsunterschieden, die durch Grössen- und Ladungsunterschiede der Ionen entstehen.

Als Elektrophoresesystem wurde ein Gerät der Firma Beckman (P/ACETM MDQ, Beckman, München) verwendet. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit der Software "P/ACE System MDQ" (Beckman). Die Detektionswellenlänge betrug 214 nm. Zur Trennung der Peptide wurde eine 57 cm lange unbeschichtete "fused silica" Kapillare (Typ TSP 075375, Composite Metal Services Ltd. UK) verwendet.

Durch Anlegen eines geringen Überdruckes für 10 s wurde in die Kapillare ein Injektionsvolumen von 6 nl der Probe injiziert. Die Peptidkonzentration betrug 0,2 mg/ml. Bei geringer konzentrierten Lösungen wurde proportional länger injiziert. Die Messung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 120 µA, die aus einer angelegten Hochspannung von 22- 27 kV resultierte. Die Kapillartemperatur wurde mit einer Flüssigkühlung bei 25 °C konstant gehalten. Als Puffer wurde 100 mM NaH₂PO₄ mit 0,02 %

Hydroxypropylmethylcellulose verwendet, der auf einen pH-Wert von 2,5 mit Phosphorsäure eingestellt wurde.

2.3.3 Edman-Sequenzierung

Die Peptidsequenzierung erfolgte durch die klassische Aminosäuresequenzanalyse auf der Basis des Edman-Abbaus. Als Sequenziergerät diente ein automatischer Edman-Sequenzierer (Applied Biosystems Modell 473A, ABI, Weiterstadt). Die Aufnahme der Daten und deren Auswertung erfolgte mittels der „Model 610A Data Analysis Software“ (Version 1.2.1, ABI, Weiterstadt).

Zwischen zwei Filterplättchen aus BioPrenTM wurden zwischen 10 pmol und 100 pmol Peptid appliziert. Das eigentliche Reaktionsvolumen bildete sich zwischen den Filterplättchen aus. Dort wurden die Reagenzien (Phenylisothiocyanat, TFA, Chlorbutan) appliziert. Die Analyse und Detektion der Aminosäuren erfolgte mittels Reversed-Phase-Chromatographie bei einer Wellenlänge von 256 nm.

2.3.4 Aminosäureanalytik (ASA)

Die quantitative Proteingehaltsbestimmung erfolgte durch eine automatisierte Aminosäureanalyse mit dem Aminosäuren-Analysensystem 1090 II Aminoquant (Hewlett Packard) mit integrierter HPLC.

Zunächst wurden die Peptide einer sauren Totalhydrolyse mit 6 M HCl für 1 h bei 160 °C unterzogen. Anschließend wurden die Aminosäuren vor der Auftrennung über die RP-Säule spezifisch derivatisiert. Aminosäuren mit primären Aminogruppen wurden mit ortho-Phthalaldehyd in Gegenwart von 3-Mercaptopropionsäure bei einem pH-Wert von 10 umgesetzt. Das bei dieser Reaktion entstandene fluoreszierende Isoindolderivat wurde bei einer Anregungswelle von 340 nm und einer Emissionswelle von 450 nm fluorimetrisch detektiert. Sekundäre Aminogruppen wurden mit 9-Fluormethylchlorformiat (FMOC) derivatisiert. Dabei bildet sich ein sekundäres Amid. Die Anregungswellenlänge für FMOC -

Aminosäuren beträgt 266 nm bei einer Emissionswellenlänge von 305 nm. Die Aminosäuren Glutamin, Glutaminsäure sowie Asparagin und Asparaginsäure lassen sich methodisch bedingt nicht unterscheiden. Cystein und Methionin können bei diesem Verfahren nur teilweise oder gar nicht erfaßt werden, da Cystein bei der Hydrolyse vollständig, Methionin zu etwa 40 % zerstört wird. Die Aminosäuren Norvalin und Sarcosin sind im ASA-Puffer als interne Standards enthalten.

2.3.5 Hydrolyse von Peptiden mit der Protease Subtilisin

Zur enzymatische Hydrolyse von Peptiden wurden Aliquots von zu untersuchenden Fraktionen der Kalbsthymus-Peptidbank entnommen, lyophilisiert und in Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7,4) resuspendiert. Subtilisin (Boehringer, Mannheim), eine Protease aus *Bacillus subtilis*, wurde der Lösung im Enzym / Peptid-Verhältnis 1:10 zugesetzt. Die Protease spaltet Peptidbindungen unspezifisch.

Die Proben wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 70 °C für 2 min gestoppt (Zucht *et al.*, 1995).

2.4 Molekularbiologische Methoden

Bei allen Arbeitsvorgängen mit RNA wurden zur Vermeidung von Kontaminationen durch RNAsen Handschuhe getragen und sterile gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Alle RNA-Proben wurden in sterilem RNase-freiem bidest. Wasser (Sigma) gelöst und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser aus der Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF} plus, Millipore) hergestellt. Die Sterilisation der Puffer, Medien, Labormaterialien und des Mörser erfolgte im Autoklaven (Schütt) bei $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 2,5 bar für 20 min.

2.4.1 Kits und Oligonukleotide

Wenn nicht explizit erwähnt, wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten kommerziell erhältlichen Kits benutzt.

Tabelle 6: Verwendete kommerziell erhältliche Kits.

- RNA-Isolierung	- NucleoSpin RNA II Kit der Firma Macherey & Nagel
- Plasmid-Isolierung	- Plasmid Midi-Kit der Firma Qiagen - NucleoSpin System der Firma Macherey & Nagel
- DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	- NucleoSpin Extract der Firma Macherey & Nagel
- Reinigung von DNA-Fragmenten	- NucleoSpin Extract der Firma Macherey & Nagel
- Klonierung von PCR-DNA-Fragmenten	- pGEM [®] -T Vector System I der Firma Promega
- DNA-Sequenzierung	- ABI PRISM [™] BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Perkin Elmer

Alle zur PCR und DNA-Sequenzierung eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Perkin Elmer oder MWG-Biotech hergestellt und sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Übersicht der eingesetzten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'--->3'	Bemerkungen
β -Tub1 ¹⁾	TTCCCTGGCCAGCTSAANGCNGACCTNCGC AAG	degenerierter sense Primer für β -Tubulin (Überprüfung der cDNA)
β -Tub2	CATGCCCTCGCCNGTGTACCAGTGNANGAA GGC	degenerierter antisense Primer für β -Tubulin (Überprüfung der cDNA)
FPN 1	AGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	sense-Primer für pGEM [®] -T
RPN 1	CAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCAT G	antisense-Primer für pGEM [®] -T
Nucleo 1 ¹⁾	AATCARGGNGAYCCCAAGAARATG	sense-Primer für bNucleolin
Nucleo 2	CCGTTTTCAATTCAGGAGCAGATT	antisense-Primer für bNucleolin
Nucleo 3	TCTGCATCAGCTTCTGTCTTAAATT	antisense-Primer für bNucleolin
Nucleo 4	ACCTCTATGGTCTTGACTTTGA	antisense-Primer für bNucleolin
SP 6	ATTTAGGTGACACTATAG	SP6 Promotor Primer (MWG-Biotech)

¹⁾ - Redundanzen: R = G / A; Y = T / C; S = G / C; N = R / Y

2.4.2 RNA-Isolierung aus Rinder-Dünndarm

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde das verwendete Gewebe unmittelbar nach der Entnahme im Schlachthof Gleidingen von Kotrückständen gesäubert und portionsweise in 50-ml-Zentrifugenröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden 0,4 g des tiefgefrorenen Gewebes in einen Mörser überführt und unter Stickstoff fein gemahlen. Nach Verdampfen des Stickstoffs wurde das Gewebepulver bei 0 °C zur Denaturierung in 3 ml RNA-Lysispuffer, der zur Verhinderung der Degradation der RNA mit 30 µl Mercaptoethanol versetzt wurde, überführt und gut geschüttelt. Zur Zerstörung der Zellen wurde ein Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Janke & Kunkel, Staufen) verwendet. Die Zellen wurde bei Eiskühlung mit steigender Drehzahl (von 8000 Upm bis 24000 Upm) 7 min lang zerkleinert.

Die Reinigung der RNA erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Macherey & Nagel, Düren) entsprechend der Angaben des Herstellers. Die genaue Bestimmung der RNA-Konzentrationen in wäßriger Lösung erfolgte, indem die Probe entsprechend mit bidest. Wasser verdünnt (z.B. 1:50) und die optische Dichte bei 260 nm in einer Quartzküvette mit 1 cm Schichtdicke gemessen wurde. Zur Berechnung der Konzentration wurde folgende Gleichung verwendet:

$$c \text{ [ng / ml]} = OD_{260} \cdot e \cdot V$$

V = Verdünnungsfaktor

c = Nukleinsäurekonzentration in ng/µl

OD₂₆₀ = Wert der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm

ε = Extinktionskoeffizient

Der Extinktionskoeffizient für einzelsträngige RNA beträgt 40.

RNA-Lysispuffer: - erst kurz vor Gebrauch des Puffers β -Mercaptoethanol zugeben (7 μ l/ml).

4 M Guanidinthiocyanat
25 mM Natriumcitrat
0,5% N-Lauroylsarcosin
0,1 M β -Mercaptoethanol

2.4.3 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

Die Amplifikation der RNA-Fragmente erfolgte mittels PCR. Dazu mußte die RNA in cDNA revers transkribiert werden.

Zunächst wurde die kontaminante genomische DNA hydrolysiert. Dazu wurden 1,5 μ g RNA lyophilisiert und für einen 10 μ l Reaktionsansatz verwendet.

Reaktionsansatz für DNA-Hydrolyse:

1,5 μ g RNA
1 μ l RNAsin (Promega)
1 μ l 10 x DNase buffer
1 μ l DNase I

- auffüllen auf 10 μ l mit bidest. Wasser

Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNase mit 1 μ l einer 25 mM EDTA-Lösung (pH 8,0) (GibcoBRL) versetzt und bei 10 minütiger Inkubation bei 65 °C inaktiviert und auf Eis abgekühlt.

Für die Erststrangsynthese wurde die RNA mit 1 μ l H₂O und 250 ng Random-Hexamer-Primer (Life Technologies™) versetzt und 10 min bei 70 °C denaturiert. Nach dem sofortigen Abkühlen des Reaktionsansatzes auf Eis wurden 4 μ l 5 x First Strand Buffer, 2 μ l 0,1 M Dithiothreitol (DTT) und 1 μ l 10 mM dNTP-Mix mit einer Pipettenspitze zugefügt und für 2 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Reversen Transkriptase (1 μ l SUPERSCRIPT™ II, GibcoBRL) und eine Inkubation bei 42 °C für 50 min. Die Reaktion wurde durch 15 minütiges Erhitzen auf 70 °C abgebrochen.

2.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1985) dient zur selektiven Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Diese Methode wurde zur Überprüfung der Erststrangsynthese und zur Gewinnung einer ausreichenden Menge an DNA für die Klonierungen eingesetzt. Zur Überprüfung der Erststrangsynthese wurde das Taq-Polymerase-Kit der Firma GibcoBRL bzw. das Takara-Taq-Kit der Firma Takara verwendet.

Allgemeiner PCR-Reaktionsansatz

- 2,5 µl PCR-Reaktionspuffer (0,5-2,0 mM Magnesiumchlorid)
- 2 µl dNTP-Mix (Endkonzentration: 0,2 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 1 µl je Primer (Endkonzentration: ca. 0,2 µM je Primer)
- 1 µl Template (50-400 ng DNA)
- 1 U DNA-Polymerase

- auffüllen auf 25 µl mit bidest. Wasser

Die Durchführung der PCR erfolgte im 'GeneAmp PCR System 2400' der Firma Perkin Elmer:

<u>1. Erst-Denaturierung der DNA</u>	<u>94-97 °C</u>	<u>3 min</u>
2. Denaturierung	98 °C	1 - 30 sek
3. Primeranlagerung	45-58 °C	15 - 60 sek
<u>4. Elongation (Verlängerung)</u>	<u>72 °C</u>	<u>30 sek - 5 min</u>
5. End-Elongation	72 °C	5 - 7 min
6. Kühlen	4 °C	∞ min

Um spezifische Amplifikate zu erhalten, wurde die Temperatur zur Primeranlagerung entsprechend der Schmelztemperatur des jeweiligen Primerpaars entsprechend gewählt. Die Dauer der Elongationsphase bei 72°C richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes (1000 bp/min). Die Anzahl der Reaktionszyklen vom Denaturierungsschritt bis zur Elongation (2. - 4. Schritt) wurden zwischen 35 bzw. 40 gewählt.

2.4.5 Auftrennung der DNA durch Gelelektrophorese

Der Nachweis der DNA erfolgte durch Gelelektrophorese, wobei man eine Auftrennung in 0,8-1 %igen (w/v) horizontalen Agarose/1 x TAE Gelen erhält. Vor der Gelatinierung wurde dem Gel zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) zugesetzt. Es wurden Mini-Gele (90 x 78 x 6 mm, 50 ml, bei 80 Volt) und Midi-Gele (143 x 138 x 5 mm, 100 ml, bei 120 Volt) verwendet. Vor dem Auftragen der DNA in die Geltaschen wurde diese 1:5 mit 5 x DNA-Blaumarker vermischt. Als Gel- bzw. Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die relative Größe von DNA-Fragmenten wurde anhand eines im Gel aufgetrennten DNA-Größenstandards (1kbp-Leiter bzw. 100bp-Leiter, GibcoBRL) bestimmt.

50 x TAE-Puffer: - vor der Benutzung wird der Puffer 1:50 mit bidest. Wasser verdünnt

2 M Tris
100 mM EDTA
1 M Essigsäure

5 x DNA-Blaumarker:

70% Glycerin
10 mM Tris-HCl, pH 8.0
1 mM EDTA
0,05% (w/v) Bromphenolblau

2.4.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.4.6.1 T/A-Klonierung

Die mittels PCR hergestellte DNA wurde zur Sequenzierung und Vervielfältigung vorerst über T/A-Klonierung (Marchuk *et al.*, 1991) in das Plasmid pGEM-T inseriert. Hierzu wurde das pGEM[®]-T Vector System I-Kit der Firma Promega verwendet. Zunächst wurde das zu klonierende PCR-Fragment mit einer DNA-Polymerase (z.B. *Taq*-DNA-Polymerase) versetzt, um die für die Ligation benötigten Adenosin(A)-Überhänge am 3'-Ende zu erzeugen. Der pGEM-T Vektor ermöglicht aufgrund seiner Thymidin(T)-Überhänge am 5'-Ende eine effiziente Insertion von DNA-Fragmenten. Da der Klonierungsvektor pGEM-T ein Resistenzgen für β -Lactamantibiotika (Ampicillin, Penicillin, Carbenicillin) besitzt, werden nicht transformierte Zellen am Wachstum gehindert.

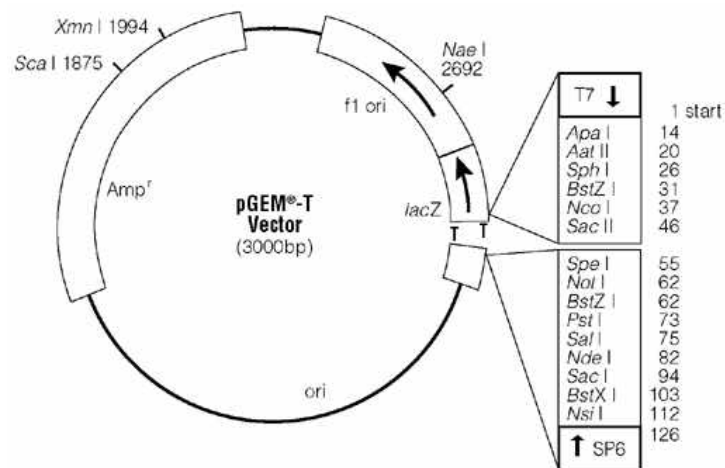


Abbildung 2: Schematische Darstellung des verwendeten Vektors pGEM-T.

2.4.6.2 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Die Isolation der DNA aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin Extrakt Kits der Firma Macherey-Nagel. Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden die entsprechend elektrophoretisch aufgetrennten Banden mit einem sterilen Skalpell aus den Agarosegelen ausgeschnitten und eingewogen. Pro 100 mg Agarosegel wurden 300 µl Puffer NT1 zugegeben und die DNA bei 50°C für 10 min durch viermaliges Vortexen herausgelöst. Anschließend wurde die Suspension auf die NucleoSpin-Säule gegeben und für 1 min bei ca. 6000 x g abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer NT3 wurde die Säule durch 3-minütige Zentrifugation vollständig getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl ddH₂O.

2.4.6.3 Ligation

Für die Ligation wurde ein 3-10 facher molarer Überschuß des DNA-Fragmentes im Verhältnis zum Vektor eingesetzt.

Allgemeiner Ligationsansatz:

1 µl T4-DNA-Ligase 10 x Puffer

1 µl pGEM-T Vektor (50 ng/ml)

1 µl T4-DNA-Ligase (3 U/µl)

x ng DNA-Insert

- auffüllen auf 10 µl mit bidest. Wasser

Der Ligationsansatz wurde mit der Pipette gemischt, kurz zentrifugiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde anschließend in kompetente *E. coli*-Stämme transformiert.

2.4.6.4 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurde ein Aliquot (17 µl) superkompetenter *E. coli* XL2-Zellen (Invitrogen) auf Eis aufgetaut, mit dem aus Kapitel 2.4.6.3 erhaltenen Ligationsansatz versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Danach fand ein Hitzeschock (1 min im Wasserbad bei 42 °C und sofortige Abkühlung auf Eis für 2 min) statt. Es erfolgte die Zugabe von 350 µl SOC-Medium zu jedem Transformationsansatz mit anschließender Inkubation bei 37 °C und ca. 300 U/min für 45 min im Thermomixer (Eppendorf). Zur phänotypischen Selektion rekombinanter Plasmide („Blau-Weiß-Selektion“) wurde der Selektionsnähragar (LB-Agar + 100 µg/ml Ampicillin) mit je 40 µl IPTG- und 40 µl X-Gal-Lösung behandelt und die Bakterienzellen ausplattiert. Die Transformationsplatten wurden abschließend über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag analysiert.

SOC-Medium: - Medium vor Zugabe der Glukose autoklavieren

2% Caseinhydrolysat

1% Hefeextrakt

10 mM Natriumchlorid

10 mM Magnesiumchlorid

10 mM Magnesiumsulfat

2,5 mM Kaliumchlorid

20 mM Glukose

IPTG-Lösung (steril filtriert): 100 mM Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid in
bidestilliertem Wasser

X-Gal-Lösung (steril filtriert): 2% (w/v) 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid in
Dimethylformamid

2.4.6.5 „Blau-Weiß-Selektion“

Die „Blau-Weiß-Selektion“ ermöglicht nach der Transformation zwischen Kolonien mit rekombinanter Plasmid-DNA und Kolonien ohne rekombinanter Plasmid-DNA farblich zu unterscheiden. Dies geschieht dadurch, daß nur durch Komplementation mit dem durch das Plasmid kodierte Fragment ein enzymatisch aktives Protein rekonstituiert werden kann. Solche Zellen sind nach Induktion des *lac*-Promotors durch das Laktose-Analogon IPTG in der Lage, das farblose Galaktosid X-Gal zu hydrolysieren. Im Verlauf der Hydrolyse entsteht durch oxidative Dimerisierung 5-Brom-3-Chlor-Indigo, welches die entsprechende Kolonie blau färbt. Wird jedoch das plasmidkodierte *lacZ*-Gen durch eine Insertion von DNA in den Polylinker des Plasmids verändert, kann die Farbreaktion nicht ablaufen, da in den entsprechenden *E. coli*-Kolonien kein funktionsfähiges Fragment gebildet wird. Diese Kolonien enthalten somit ein Insert und erscheinen auf den Transformationsplatten weiß. Durch den Zusatz von Antibiotika zu den Nähragarplatten konnten *E. coli*-Klone aufgrund ihres Wachstums als plasmid-enthaltend identifiziert werden.

Positive (weiße) Kolonien wurden anschließend mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung weiter überprüft.

2.4.7 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Kulturen

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Stämmen erfolgte mit Hilfe kommerziell erhältlichen Kits der Firma Qiagen und Macherey & Nagel (Tabelle 6) nach Angaben der Hersteller.

2.4.8 Restriktionsanalyse

Bakterielle Restriktionsendonucleasen hydrolysieren spezifische Nukleotidsequenzen innerhalb doppelsträngiger DNA. Die Modifikation der DNA (Spaltung, Dephosphorylierung, Ligation) erfolgte dabei stets nach den Instruktionen des Herstellers (GibcoBRL). Die enzymatische Spaltung mit Restriktionsendonucleasen wurde in den entsprechenden Puffern bei 37°C in einem Volumen von mindestens 20 µl durchgeführt, um Nebeneffekte durch hohe Konzentration an Glycerin, in dem die Enzyme gelagert werden, zu vermeiden.

2.4.9 Sequenzierung von DNA

Zur Bestimmung der Nukleinsäuresequenz von DNA wurde das von Sanger *et al.* (1977) beschriebene enzymatische Kettenabbruchverfahren in modifizierter Form verwendet. Dabei wird eine DNA-Sequenz in einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer linear amplifiziert. Wie auch bei der PCR setzt sich eine Reaktionsfolge aus Denaturierung, Anlagerung des jeweiligen Primers und Elongation (vgl. Kapitel 2.4.4) zusammen. Da außer dNTPs auch die *Taq*-Polymerase Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) als Substrat angeboten werden, kann es beim Einbau der ddNTPs während der Extension zur basenspezifischen Termination der Synthese kommen. Da es sich hier um ein „Cycle-Sequencing“-Verfahren handelt, werden Abbruchprodukte angereichert. Diese Methode gibt dadurch die Möglichkeit, geringe Mengen von Ausgangs-DNA zu sequenzieren. Die Detektion der spezifischen Produkte erfolgt automatisch durch Kapillarelektrophorese mit Hilfe von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten ddNTPs (ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Tabelle 6). Zur Markierung der Abbruchprodukte werden vier verschiedene Farbstoffe mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren eingesetzt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden aus Agarosegelen aufgereinigte PCR-Fragmente als auch Plasmide nach folgendem Reaktionsansatz und Temperaturprotokoll sequenziert.

Reaktionsansatz im PCR-Gefäß (20 µl):

3 µl BigDye Terminator Ready Reaction Mix

1 µl Primer-Oligonukleotid (10 pmol/µl)

3 µl Template-DNA (500 ng)

- auffüllen des Reaktionsansatzes auf 20 µl mit bidest. Wasser

Temperaturprotokoll für 25 Reaktionszyklen:

Denaturierung der DNA 96 °C 10 sek

Primeranlagerung 45-60 °C 5 sek

Elongation 60 °C 4 min

Kühlen nach Reaktionsende 4 °C ∞ min

Die Anlagerungstemperatur entspricht der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Zum Reinigen der Proben wurden im Anschluß an die Sequenzierungsreaktion die Ansätze jeweils 1:5 mit Wasser verdünnt und zur Fällung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, in welchem 250 µl Ethanol und 15 µl einer 2M NaAc-Lösung (pH 4,5) vorgelegt wurden. Danach wurden die Proben 15 min bei 13500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl 70%iger Ethanollösung resuspendiert und erneut 10 min bei 13500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und verworfen. Anschließend erfolgte die vollständige Trocknung für ca. 10 min in der Vakuumzentrifuge. Für die Sequenzierung auf einem Kapillarelektrophorese-Sequenzier (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer) wurde das Präzipitat in 25 µl Wasser gelöst. Die Datenregistrierung und Gerätesteuerung erfolgte automatisch mit der Data Collection Software (ABI) auf einem Macintosh-Computer. Für die Auswertung der Daten fand die Data Analysis Software (ABI) Verwendung.

2.5 Mikrobiologische Methoden

Der Umgang mit Bakterien sowie eukaryotischen Zellen erfolgte unter sterilen Arbeitsbedingungen.

2.5.1 Lagerung und Anzucht von aeroben Bakterien

Die Bakterienstämme wurden in Form von Dauerkulturen und Arbeitskulturen gelagert. Übernachtkulturen wurden 16 h bei 37 °C (*Escherichia coli* BL21, *Staphylococcus carnosus* TM 300) oder bei 30 °C (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*) im Kulturschüttler bei einer Drehzahl von 200 Upm inkubiert. Die Vermehrung von Bakterien erfolgte in Kulturröhrchen, die 5 ml LB-Medium enthielten und mittels einer Impföse mit Bakterienzellen aus einer Arbeitskultur beimpft wurden.

LB-Medium: 5 g Hefeextrakt
 10 g Caseinhydrolysat
 5 g NaCl
 ad 1 l bidest. Wasser, auf einen pH-Wert von 7,4 einstellen.

Zur Herstellung einer Dauerkultur wurde 1 ml einer dicht bewachsenen Übernachtkultur mit 1 ml sterilem Glycerin versetzt und gut gemischt. Die Kultur wurde bei - 80 °C gelagert. Bakterienarbeitskulturen wurden in Petrischalen, die LB-Medium mit 1,5 % Agar enthielten, angelegt. Auf diesen Agar-Platten wurde ein Aliquot einer Bakteriensuspension mit Hilfe einer Impföse ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C bzw. 30 °C über Nacht. Die bewachsenen Platten konnten für 2 - 3 Monate bei 4 °C gelagert werden.

2.5.2 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von Peptiden

2.5.2.1 Radial-Diffusionshemmtest

Mit Hilfe des Radial-Diffusionshemmtests kann die antimikrobielle Wirkung von Probelösungen auf Bakterien untersucht werden, die in Agar suspendiert sind.

<u>TSB-Medium:</u>	30 mg	Tryptic Soy Broth (TSB)
	0,8 % (w/v)	GTG-Agarose
	0,02 % (v/v)	Tween 20
	in 100 ml	10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2

Das Medium wurde aufgekocht und anschließend auf 40 °C im Wasserbad abgekühlt. Danach wurden dem Medium 0,5 ml einer Bakteriensuspension (in LB-Medium) mit einer optischen Dichte von 1,0 bei einer Wellenlänge von 600 nm hinzugefügt. Diese Agaroselösung wurde in Petrischalen gegossen. Die Aushärtung erfolgte bei 4 °C. Eine Lagerung der Platten ist für 3 - 4 Tage möglich.

Mit einem abgeflamten Stahlrohr wurden Löcher von 3 mm Durchmesser in die Agaroseplatten gestanzt. Die entstandenen Mediumzylinder wurden mittels Wasserstrahlvakuums mit einer abgeflamten Pasteurpipette abgesaugt. In die Kavitäten wurden 10 µl der zu testenden Probelösung (HPLC-Fraktionen wurden lyophilisiert und in bidestilliertem Wasser aufgenommen) pipettiert. Anschließend wurden die Agaroseplatten bei 37 °C oder 30 °C für 16 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Die Auswertung des Tests erfolgte durch Vermessen der entstandenen Hemmhöfe. Die Größe der Hemmhöfe wird durch die antimikrobielle Aktivität der Substanzen und die Konzentration der Probelösungen bestimmt. Da eine lineare Korrelation zwischen dem Logarithmus der Antibiotikakonzentration und der Größe der Hemmhofradien besteht, konnte die antimikrobielle Aktivität nach Lehrer (Lehrer *et al.*, 1991) in Einheiten ausgedrückt werden:

$$\text{antimikrobielle Aktivität } [U] = \frac{d \text{ [mm]} - 3 \text{ [mm]}}{2} \cdot 10$$

- U Einheiten nach Lehrer
d Hemmhofdurchmesser

2.5.2.2 Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC)

Die minimale Hemmstoffkonzentration (MIC) stellt die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes dar, die benötigt wird, um das Wachstum von Bakterien innerhalb von 18 ± 2 h zu verhindern.

Die Bestimmung der MIC wird in Mikrotiterplatten (MTP) durchgeführt. In die obere Reihe der 96-Loch-MTP wurden unterschiedliche Mengen von Peptiden vorgelegt und pro Spalte eine Verdünnungsreihe erstellt. In die oberen Kavitäten wurden 100 µl einer definierten Peptidkonzentration in Testmedium vorgelegt. In die Vertiefungen der zugehörigen Spalten wurden 50 µl Testmedium pipettiert. Durch Überführen von je 50 µl Peptidlösung aus den Vertiefungen der ersten in die zweite, der zweiten in die dritte Reihe usw. konnte eine Verdünnungsreihe der Potenz 2 hergestellt werden. 50 µl einer Bakteriensuspension, die $2 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^5$ Keime pro ml betrug, wurde in jede Vertiefung zupipettiert. Der Versuchsansatz wurde für 18 h bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert.

Testmedium: 3 g TSB
in 1 l 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2

Das Testmedium wurde steril filtriert (Porengröße: 0,2 µm).

Zur Bestimmung der Keimzahl wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf eine Agarplatte gegeben und mittels eines Drigalski-Spatels ausgestrichen. Ziel des Experimentes war es, die Verdünnungen der Bakteriensuspension zu bestimmen, die im MIC eingesetzt werden mußte. Dazu wurde einer Übernachtskultur 100 µl der Bakteriensuspension entnommen und diese

1:1000 verdünnt. Die Bakterien befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase. Dies ist entscheidend für den Versuch, da nur die Bakterien, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, in der Lage sind, auf der Agarplatte Kolonien auszubilden.

Die Agarplatte wurde bei Temperaturen von 30 °C bzw. 37 °C (je nach Bakterienkultur) 16-18 Stunden im Brutschrank inkubiert und ausgezählt. Zur Keimzahl – Bestimmung wurde ein Doppeltest durchgeführt und der erhaltene Zahlenwert gemittelt. Die zur Herstellung einer 2×10^5 Keimzahl / ml enthaltenden Bakteriensuspension verwendeten, experimentell ermittelten Verdünnungen betragen:

<i>Escherichia coli</i>	100000-fach (Breithaupt, 2001)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10000-fach (Breithaupt, 2001)
<i>Staphylococcus carnosus</i>	10000-fach (Breithaupt, 2001)
<i>Bacillus subtilis</i>	4000-fach
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3000-fach
<i>Micrococcus luteus</i>	4000-fach

Diese Verdünnungen wurden zur experimentellen Bestimmung der MIC verwendet.

2.5.2.3 Qualitativer Nachweis von Lysozym

Lysozym wurde turbidimetrisch über die Abnahme der Absorption einer Zellwandsuspension von *Micrococcus luteus* (Sigma) nachgewiesen (Jolles, *et al.*, 1965).

2.5.3 Bestimmung der hämolytischen Wirkung von Peptiden

Um die Spezifität von antimikrobiellen Peptiden zu bestimmen, wurde ihre hämolytische Aktivität untersucht. Die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten gilt als Nachweis für die membranlyisierende Aktivität von Substanzen. Hämoglobin wurde photometrisch im Zellüberstand quantifiziert (Helmerhorst *et al.*, 1999).

Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität von antimikrobiellen Peptiden wurde einem gesunden Probanden ca. 10 ml Blut entnommen, welches mit 3 ml Citrat-Monovetten (Sarstedt) als Antikoagulanzen versetzt wurde. Das Blut wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und für 10 min bei 20 °C und 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die im Sediment angereicherten Erythrozyten wurden zweimal in Testmedium (Kapitel 2.5.2.2), welches 287 mM Glucose als Osmoprotektant enthielt, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Erythrozyten im Testmedium 200-fach verdünnt. Die zu testenden Peptide wurden in Konzentrationen von 1 µg/ml bis 500 µg/ml in 96-Loch-MTP mit spitz zulaufendem Boden vorgelegt und lyophilisiert. Anschließend wurden 200 µl der Erythrozytensuspension in die einzelnen Kavitäten gegeben. Um eine vollständige Lyse der Erythrozyten zu erreichen, wurde eine 1 % Tweenlösung (Tween 20) appliziert. Die Zellen wurden 1 h bei 37 °C im Brutschrank (B5060EK, Heraeus) inkubiert und anschließend 5 min bei 1500 x g zentrifugiert. 150 µl des Überstandes wurden jeder Kavität entnommen und in eine MTP mit flachem Boden überführt. Anschließend konnte der Hämoglobingehalt des Überstandes mit Hilfe des Microplate Autoreaders (Biotek Instruments) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Die hämolytische Aktivität wurde prozentual angegeben:

$$\text{Hämolyse [\%]} = \frac{\text{Extinktionswert (Peptid)} - \text{Extinktionswert (Medium)}}{\text{Extinktionswert (1 \% Tween - Lösung)} - \text{Extinktionswert (Medium)}} \cdot 100$$

2.5.4 Bestimmung der cytotoxischen Wirkung von Peptiden

2.5.4.1 Zellkultivierung

Zur Überprüfung der cytotoxischen Wirkung der Peptide auf Säugerzellen wurde die murine Astrozytenzelllinie (CLTT-1, BioMetrica) verwendet. Die Zellen wurden adhärent in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (DMEM) (Sigma) mit 10 % Fetalem Kälberserum (FCS), 1 % L-Glutamin, 1 % L-Glutamax und 2 % Penicillin / Streptomycin (GibcoBRL) kultiviert.

Zur Lagerung wurden die Zellen in DMEM, 10 % DMSO und 20 % FCS in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen erfolgte die Stammkulturhaltung der Zellen in Monolayer-Flaschen (Costar Technomara, 75 cm²) mit einer Animpfdichte von 10⁵ Zellen/ml. Nach einer ca. 5 - 7 tägigen Wachstumsphase konnten diese Zellen zur cytotoxischen Bestimmung eingesetzt werden. Alle Kultivierungsgefäße wurden bei 37 °C im Brutschrank (B5060EK, Heraeus) mit 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Die Zellen wurden nach 3 - 4 tägiger Wachstumsphase passagiert. Zu diesem Zweck wurde das Medium mit einer Pipette abgezogen. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin / EDTA-Lösung (Sigma) 5 min im Brutschrank inkubiert. Nach Ablösung der Zellen von der Gefäßwand wurden sie in 10 ml FCS-haltiges Medium überführt und 5 min bei 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die abgetrennten Zellen in 10 ml Kultivierungsmedium aufgenommen. 0,5 ml der Zellsuspension wurden zum Inokulieren eingesetzt und die Monolayer-Flaschen mit Medium auf 15 ml aufgefüllt. Die für den Cytotoxizitätstest verwendeten Zellen wurden derselben Vorkultur entnommen und ihre Vitalität sowie Zellzahl durch die Trypan-Blau-Methode bestimmt (Kapitel 2.5.4.2).

2.5.4.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Trypan-Blau-Methode gilt als etablierte Methode zur Ermittlung der Zellvitalität und Zellzahl (Lin *et al.*, 1991). Dabei können durch Anfärben mit dem Ausschlußfarbstoff Trypan Blau (0,4% in wäßriger Kochsalzlösung, Sigma) tote bzw. Zellen mit einer defekten Zellmembran von lebenden Zellen unterschieden werden.

$$\text{Zellvitalität} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Lebendzellzahl} + \text{Totzellzahl}}$$

Je 50 µl der Zellsuspension und der Trypanblaulösung wurden mit einer Pipette homogen durchmischt und in eine Thoma-Zählkammer (Hemocytometer) pipettiert. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops mit Phasenkontrasteinrichtung (Zeiss, Jena) und 200-facher Vergrößerung werden tote und lebende Zellen getrennt ausgezählt. Es wurden jeweils 4 Einzelbestimmungen vorgenommen und der Mittelwert der Tot-Lebend-Verteilung gebildet. Durch die cytotoxische Wirkung von Trypan Blau sollte die Inkubationszeit maximal 3 min betragen, da sonst das Ergebnis verfälscht würde. Das Volumen der Flüssigkeit über den beiden Zählfeldern der Thoma-Zählkammer entspricht 0,1 µl, so daß die Anzahl der Zellen pro Milliliter durch Multiplikation des Zählergebnisses mit dem Faktor 10⁴ erhalten wird.

2.5.4.3 Cytotoxizitätstest

Die cytotoxische Wirkung der Peptide wurde anhand der Beeinflussung der Stoffwechselaktivität der Zellen gemessen. Zu diesem Zweck wurde der WST-1-Test eingesetzt (Seiler *et al.*, 1999).

Zur Durchführung des Tests wurden in MTP 1000 Zellen / Kavität in 100 µl Medium inokuliert und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Zellvitalität wurde mit der Trypan-Blau-Methode überprüft und sollte beim Animpfen nicht unter 90 % betragen. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel, wobei dem frischen Medium keine Antibiotika zugesetzt wurden. Die zu testenden Peptide wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (1 µg/ml – 500 µg/ml) in Medium gelöst und zupipettiert. Danach wurden

die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Als Positivkontrolle wurde das Cytotoxin Cytosinarabinofuranosid (CAF, Sigma) in einer Konzentration von 10 µM mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden 10 µl einer WST-1-Lösung (Boehringer Mannheim) zugegeben und erneut zwei Stunden inkubiert (37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre).

WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat) ist ein hellrotes Tetrazoliumsalz und reagiert mit NADH durch Einwirkung mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem dunkelroten Formazansalz, dessen Farbintensität mit Hilfe des Microplate Readers MRX II (Dynex Technologies) bei einer Wellenlänge von 630 nm gemessen werden kann. Der WST-1-Test detektiert dabei spektrophotometrisch die mitochondriale Stoffwechselaktivität der Zellen, die sich aus der Anzahl der lebenden Zellen ergibt. Die Auswertung erfolgt nach folgender Berechnung:

$$\text{Vitalität [\%]} = 100 - \frac{\text{Extinktionswert (Peptid)} - \text{Extinktionswert (Positivkontrolle)}}{\text{Extinktionswert (10 mM CAF)} - \text{Extinktionswert (Positivkontrolle)}} \cdot 100$$

Als Positivkontrolle wurde die Absorbtion von Zellen in reinem Medium bestimmt.

Die Vitalität der Zellen entspricht dabei umgekehrt proportional der toxischen Aktivität der Substanzen (Baker *et al.*, 1993).

3 Ergebnisse und Diskussion

Das Wachstum von Mikroorganismen kann durch Peptide mit antimikrobieller Wirkung inhibiert werden. Die antimikrobielle Aktivität von Thymusextrakten ist hinreichend bekannt. Besonders die in den Extrakten in großer Menge vorhandenen Histone wurden auf ihre antibakterielle Wirkung untersucht (Davison und Butler, 1954; Davison *et al.*, 1954). Die antimikrobielle Wirkung von Protaminen und Histonen, die aus Kalbsthymus isoliert wurden, konnte bereits 1946 erstmals nachgewiesen werden (Ahlström und Euler, 1946; Hirsch, 1958).

Weiterhin werden antimikrobiell wirksame Peptide, wie Lysozym, β -Defensine und Cathelicidine im Thymus exprimiert (Zhang *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1999). Diese Peptide konnten bislang jedoch nicht auf Proteinebene im Thymus nachgewiesen werden.

Ziel der vorgelegten Dissertation war es, unbekannte Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften aus Kalbsthymus zu reinigen, ihre Primärstruktur zu klären und nach erfolgter chemischer Synthese ihre Spezifität gegen eukaryotische und prokaryotische Zellen zu untersuchen.

Der Thymus gehört zu den endokrinen, lymphatischen Organen, und spielt eine entscheidende Rolle innerhalb des Immunsystems. Im Thymus werden eine Reihe von Peptiden produziert, die insbesondere Einfluß auf die Entwicklung und Differenzierung von T-Zellen und deren Reifung haben (Goldstein *et al.*, 1977). Damit ist der Thymus unmittelbar an der zellulären Immunität beteiligt. Von besonderer Bedeutung sind antimikrobielle Peptide als Bestandteile der unspezifischen Immunantwort. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob antimikrobielle Peptide bereits im Thymus gebildet werden.

Die Vorgehensweise, um neue antimikrobiell wirksame Peptide im Thymus zu identifizieren, beschreibt Abbildung 3.

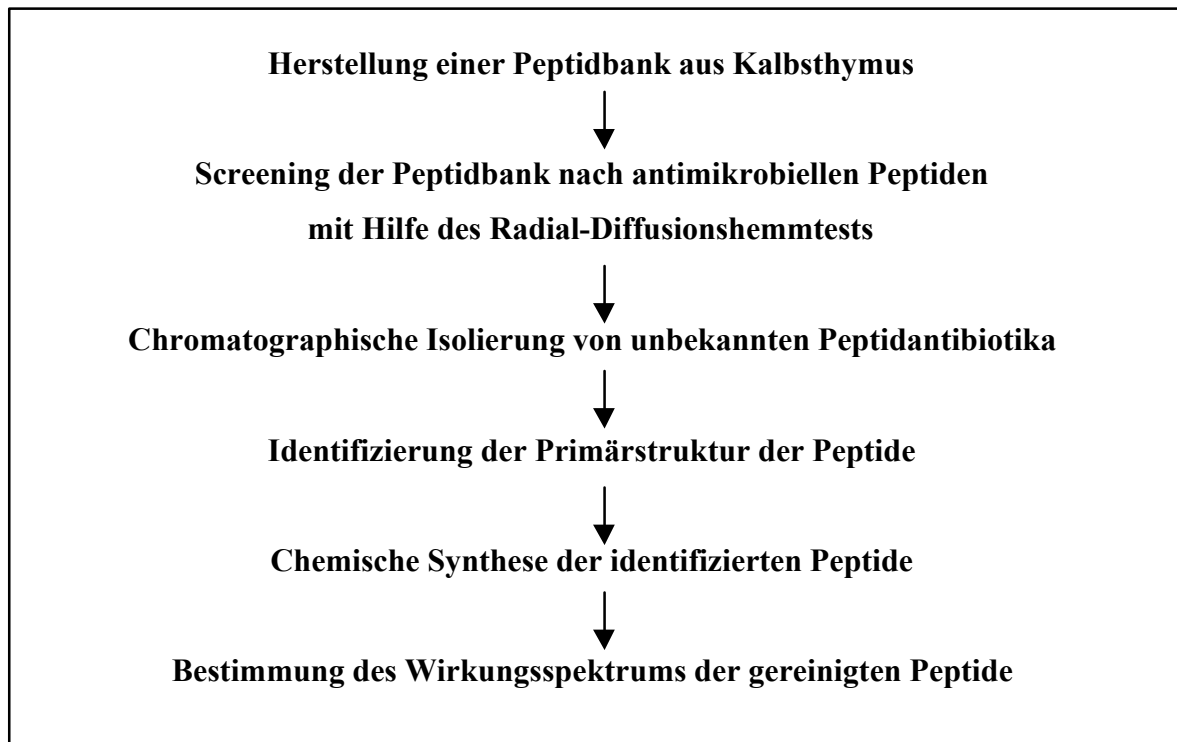


Abbildung 3: Schematische Übersicht der in dieser Dissertation geplanten Arbeiten.

3.1 Herstellung einer Peptidbank aus Kalbsthymus

3.1.1 Gewebeextraktion

Als Ausgangspunkt für die Entdeckung neuer Peptidantibiotika diente der Thymus von Kälbern. Zu diesem Zweck wurden 20 kg Kalbsthymus unmittelbar nach der Entnahme homogenisiert und die Peptide mit einem eiskalten Essigsäurepuffer extrahiert. Durch Zentrifugation wurde das Zellsediment abgetrennt. Die entstandene Fettschicht auf dem Überstand wurde abgeschöpft und verworfen. Da der gewonnene Überstand durch mitgerissene Fettteilchen noch leicht getrübt war, wurde dieser über Filterpapier mit unterschiedlicher Korngröße bis zur Klarheit filtriert. Um große Proteine von den Peptiden zu trennen, wurde anschließend eine Ultrafiltration über eine 50 kDa Polysulfon-Membran durchgeführt. Das entstandene Retentat wurde zur Vermeidung von Ausbeuteverlusten diafiltriert. Die Permeate beider Filtrationen wurden auf einen pH-Wert von 2,8 eingestellt und vereinigt. Durch Aminosäureanalyse wurde der Gesamtprotein / Peptidgehalt des Permeats bestimmt. Aus 20 kg Kalbsthymus wurden insgesamt 404 g Peptid / Protein extrahiert. Das Gewicht eines Kalbsthymus beträgt zwischen 400 - 500 g. Damit ergibt sich, daß aus einem Thymus ca. 10 g Peptid bzw. Protein extrahiert wurden.

Diese Methode der Extraktion zeigte sich wesentlich effizienter als die Methode von Burstein *et al.* (1988). Nach saurer Extraktion, Zentrifugation und anschließender Dialyse über eine 10 kDa - Membran war diese Arbeitsgruppe in der Lage, aus einer Tonne Kalbsthymus 2 kg der löslichen Zellbestandteile zu extrahieren. Eine basische bzw. neutrale Extraktion des Gewebes zeigt keine Erhöhung des Peptid / Proteingehalts (Mabuchi *et al.*, 1979; Turk *et al.*, 1996; Kook *et al.*, 1975). Allerdings eignen sich basische Extraktionen von Geweben besser zur Gewinnung von Zellbestandteilen, wie Oligonukleotiden, Oligosacchariden und Glykosaminoglycanen (Manzi *et al.*, 2000; Straus *et al.*, 1981; Werneck *et al.*, 1999) sowie zur Proteingewinnung. Da in dieser Arbeit die Extraktion von Peptiden von hauptsächlichem Interesse war, wurde eine saure Extraktion durchgeführt.

3.1.2 Peptidbankherstellung

3.1.2.1 Kationenaustausch-Chromatographie

Eine erste Auftrennung der bei der Extraktion erhaltenen Peptide konnte durch die Kationenaustausch-Chromatographie erreicht werden. Durch Benutzung eines starken Kationentauschers und die batchweise Elution der gebundenen Peptide mit verschiedenen Lösungen mit ansteigendem pH-Wert (2,5-13) (Kapitel 2.1.2) war es möglich, basische und saure Peptide zu trennen. Die chromatographische Trennung ist in Abbildung 4 wiedergegeben.

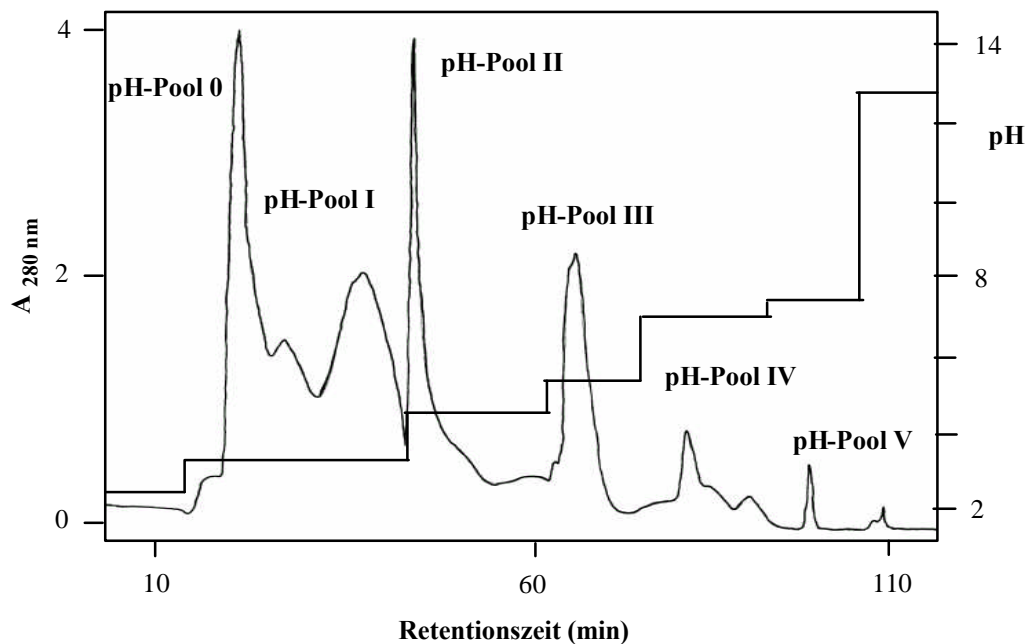


Abbildung 4: Kationenaustausch-Chromatographie des Thymusextrakts. Die einzelnen pH-Pools repräsentieren die Peptide einer 20 kg Thymusextraktion nach Elution von einem starken Kationentauscher mit verschiedenen Lösungen mit ansteigendem pH-Wert (Tabelle 1) bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm.

Anionische Peptide und andere Zellbestandteile wie z.B. Kohlenhydrate, die nicht auf dem Ionentauscher binden (Kook *et al.*, 1975), wurden ebenfalls separiert und im weiteren Verlauf pH-Pool 0 genannt. Nach Absinken der Absorption bei 280 nm unter einen Minimalwert von 0,3 wurde jeweils das Elutionsmittel gewechselt. Die resultierenden Peptidlösungen wurden separiert und durch Aminosäureanalyse ihr Peptidgehalt festgestellt (Tabelle 7). Peak 5 und 6 wurden auf Grund ihres geringen Peptidgehalts zu pH-Pool 5 vereinigt.

Tabelle 7: Peptidgehalt der einzelnen pH-Pools, der durch ASA bestimmt wurde.

Peak	pH-Pool	Protein/Peptidgehalt	Prozentualer Anteil
Durchlauf	0	315 g	77,9%
1	1	52 g	12,9%
2	2	19 g	4,7%
3	3	12 g	3,0%
4	4	5 g	1,2%
5	5	0,8 g	0,2%
6	5	0,4 g	0,1%

Ca. 80% der extrahierten Zellbestandteile, wie z.B. Oligosaccharide und Phospholipide (Manzi *et al.*, 2000), nicht ionische und anionische Peptide haben nicht auf dem Kationentauscher gebunden. Da antimikrobielle Peptide in den meisten Fällen kationisch sind (Hancock und Lehrer, 1998), konnte ein Großteil nichtaktiver Substanzen bereits im ersten Schritt abgetrennt werden.

3.1.2.2 Reversed-Phase-Chromatographie

Um Peptide, die nur in geringen Mengen im Thymus vorhanden sind, im biologischen Test zu detektieren, mußte eine weitere Trennung der Peptide angestrebt werden. Zu diesem Zweck wurden die pH-Pools unter Anwendung der RP-Chromatographie ein zweites mal separiert. Dabei wurde eine Trennung der Peptide und Proteine von Salzen und weiteren an RP-Material nicht bindenden Bestandteilen des Thymus erreicht.

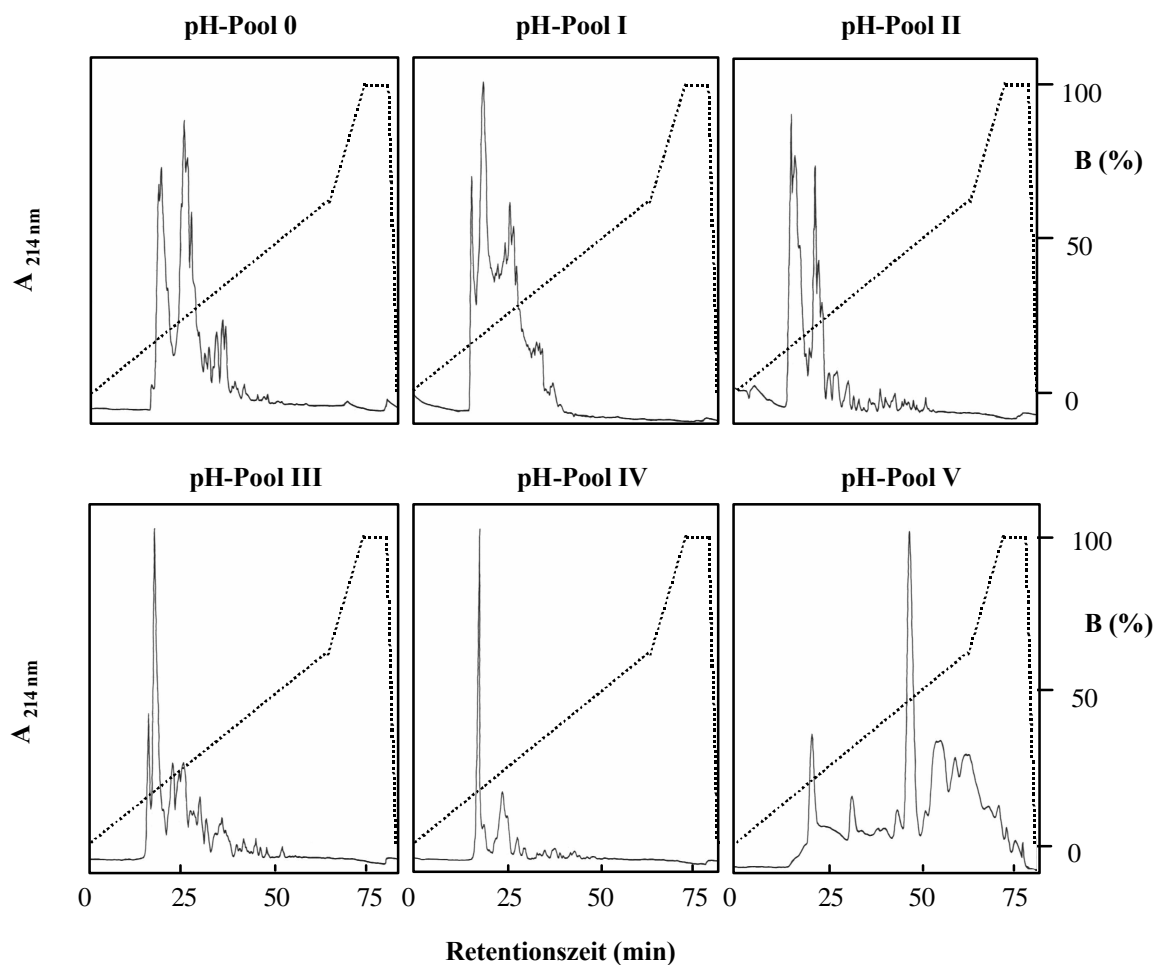


Abbildung 5: Reversed-Phase-Chromatographie der unterschiedlichen pH-Pools. In den Chromatogrammen 0–5 sind die Elutionsprofile der einzelnen pH-Pools bei einer Absorbtiwellenlänge von 214 nm und die zur Elution verwendeten Gradienten zu sehen.

Auf Grund des unterschiedlichen Peptidgehalts der pH-Pools wurden zwei Reversed-Phase Chromatographiesäulen verwendet, die sich in ihrer Beladungskapazität unterscheiden. Das Eluat von pH-Pool 5 wurde mit Hilfe einer RP-C18-Säule chromatographiert, während die Peptide von pH-Pool 0 - 4 durch RP-C15-Material getrennt wurden (Kapitel 2.1.3).

Jede Chromatographie resultierte in 46 salzfreien Fraktionen, die über einen Zeitraum von 70 min separiert wurden. Die Fraktionsgröße betrug 200 ml bzw. 50 ml (pH-Pool 5). Den Fraktionen wurden Aliquots von 80 g Gewebeäquivalenten entnommen, die lyophilisiert und in Wasser gelöst in verschiedenen biologischen Tests eingesetzt werden können.

Die Herstellung einer Peptidbank diene als Grundlage der Reinigung antimikrobieller Peptide. Die 276 Fraktionen repräsentieren die Kalbsthymus-Peptidbank und enthalten alle aus diesem Gewebe extrahierten Peptide. Durch eine saure Extraktion konnte gewährleistet werden, daß ein Großteil der Thymuspeptide in der Peptidbank enthalten war. Aufgrund des meist kationischen Charakters von antimikrobiellen Peptiden wurde bei der Herstellung der Peptidbank ein starker Kationenaustauscher verwendet und dadurch ca. 85 % der inaktiven Peptide von den biologisch aktiven getrennt. Zur Detektion der antimikrobiellen Peptide im sensitiven Radial-Diffusionshemmtest sowie zur Verringerung der Peptidkonzentration in den zu testenden Fraktionen wurden die entstandenen pH-Pools ein weiteres mal durch RP separiert.

3.2 Antimikrobielles Screening

3.2.1 Wirkung von Thymuspeptiden auf Bakterien

Im folgenden wurde geprüft, ob im Thymus Substanzen vorhanden sind, die das Wachstum von Bakterien inhibieren bzw. diese töten. Zur Detektion dieser Substanzen wurden die Fraktionen der Kalbthymus-Peptidbank unter Anwendung des Radial-Diffusionshemmtests auf ihre antimikrobielle Wirkung untersucht. Dieser Test stellt eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung antimikrobieller Aktivität von Substanzen dar (Lehrer *et al.*, 1991). Als Testorganismen dienten der Gram-positive Bakterienstamm *Bacillus subtilis* DSM 10^T sowie der Gram-negative Bakterienstamm *Escherichia coli* BL21. Der Test wurde mit 4 g Gewebeäquivalent der Thymus-Peptidbank durchgeführt und zum Validieren der Ergebnisse reproduziert. Abbildung 6 zeigt das Ergebnis des initialen Screenings der Peptidbank nach antibakteriellen Substanzen im Thymus. In den Fraktionen der pH-Pools 0 - 2 wurde keine antimikrobielle Aktivität festgestellt. In pH-Pool 3 und 4 konnten wachstumsinhibierende Aktivitäten unterschiedlicher Intensität gegen beide Bakterienstämme detektiert werden. Dies deutet darauf hin, daß die detektierten Substanzen einen stark kationischen Charakter besitzen, was auch bei den meisten bekannten antimikrobiellen Peptiden festgestellt wurde (Hancock und Lehrer, 1998). Die Fraktionen des pH-Pools 5 zeigten nur eine sehr geringe Wachstumsinhibierung von *B. subtilis*. Allerdings ist der Peptidgehalt der einzelnen Fraktionen in diesem Pool sehr gering (vgl. Tabelle 7), so daß die geringe Aktivität auf eine nicht ausreichende Konzentration der Peptide im Hemmtest zurückzuführen sein könnte.

Offensichtlich gibt es im Thymus mehrere Substanzen, die das Wachstum von Bakterien hemmen. Diese wirken auf verschiedene Bakterienspezies unterschiedlich. Sowohl Gram-positive wie auch Gram-negative Bakterien können durch die im Thymus befindlichen Substanzen am Wachstum gehindert werden. Die in pH-Pool 3 eluierten Substanzen inhibieren das Wachstum von Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* in stärkerem Ausmaß als das von *B. subtilis*. Einige Fraktionen des pH-Pools 4 zeigten dagegen nur geringe Intensitätsunterschiede in ihrer antimikrobiellen Aktivität gegen beide Bakterienstämme (vgl. Fraktion 8 und 17-21). Im hinteren Bereich des Chromatogramms scheinen wiederum Substanzen zu eluieren, die nur das Wachstum von *E. coli* hemmen können.

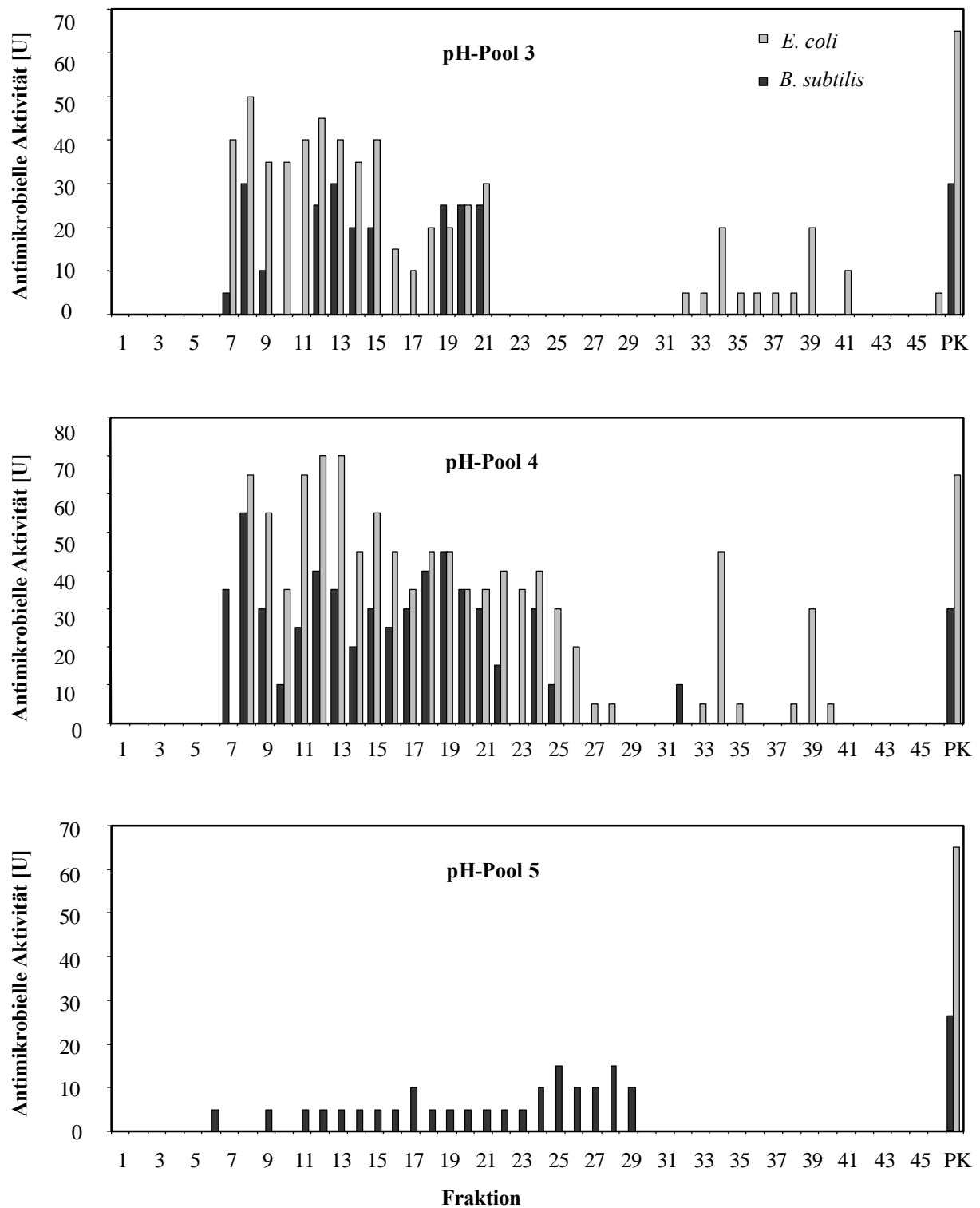


Abbildung 6: Initiales Screening der Kalbsthymus-Peptidbank auf antimikrobielle Substanzen. 4 g Gewebeäquivalent der 46 Fraktionen der einzelnen pH-Pools wurden im Radial-Diffusionshemmtest auf antimikrobielle Aktivität untersucht. Die Höhe der Balken spiegelt das Maß der Aktivität wieder. Die grauen Balken entsprechen der antibakteriellen Aktivität der Fraktionen gegen *E. coli*, die schwarzen Balken geben die Aktivität gegen *B. subtilis* wieder. Als Positivkontrolle (PK) wurde humanes Lysozym in einer Konzentration von 20 µg/ml getestet.

Die im pH-Pool 5 eluierten Peptide waren nur in der Lage, die Gram-positiven Stäbchen am Wachstum zu hindern. *E. coli* zeigte keine Reaktion auf die Substanzen.

Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurden Fraktionen, die im antimikrobiellen Screening ein Maximum an Aktivität aufwiesen, in einer Dreifach-Bestimmung getestet und die Größe der Hemmhöfe gemessen. Bei einem Vergleich der mit beiden Bakterienstämmen im Radial-Diffusionshemmtest erhaltenen Hemmhöfe wurde ein unterschiedlicher Charakter der Hemmung der Substanzen gegen die unterschiedlichen Keime festgestellt. Bei *B. subtilis* zeichneten sich die Hemmhöfe durch eine vollständige Wachstumsinhibition um die Kavitäten aus. Allerdings scheint die Substanz bei weiterer Diffusion in den Agar nicht mehr in der Lage zu sein, diesen Bakterienstamm vollständig am Wachstum zu hindern, der Hemmhof ist diffus getrübt. Dadurch ist keine eindeutige Abgrenzung des Hemmhofs vom bewachsenen Agar ersichtlich, und die Ausmessung gestaltet sich schwierig. In Folge dessen wurde die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung der antimikrobiellen Aktivität in diesem Test stark beeinträchtigt.

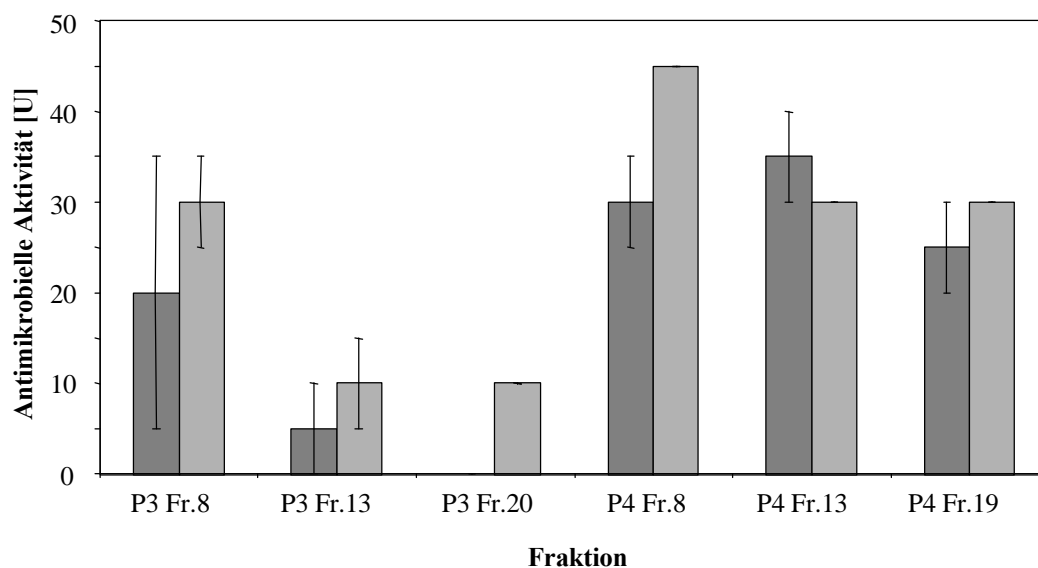


Abbildung 7: Reproduzierbarkeit der antimikrobiellen Aktivität im Radial-Diffusionshemmtest. Es wurden 4 g Gewebeäquivalent ausgewählter Fraktionen gegen *E. coli* (hellgrauen Balken) und *B. subtilis* (dunkelgrauen Balken) getestet.

Bei *E. coli* wurden nur geringe Schwankungen bei der Größe der Hemmhöfe festgestellt (Abbildung 7).

Da die antimikrobielle Aktivität der Substanzen auf *E. coli* sowohl größer und als auch exakter zu detektieren war, wurden weitere Untersuchungen mit *E. coli* als geeigneterem Testorganismus durchgeführt.

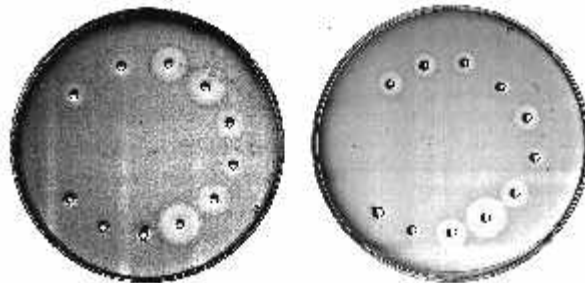


Abbildung 8: Vergleich der Hemmhöfe im Radial-Diffusionshemmtest, der mit *Escherichia coli* (links) und *Bacillus subtilis* (rechts) als Testbakterien durchgeführt wurde. Getestet wurden 4 g Gewebeäquivalent der Fraktionen 5 – 15 des pH-Pools 4 der Kalbsthymus-Peptidbank. Die Fraktionen wurden entgegen dem Uhrzeigersinn beginnend mit Fraktion 5 (unten links) aufgetragen.

3.2.2 Bestätigung der Peptidstruktur ausgewählter Peptidbank-Fractionen durch Hydrolyse

Im Rahmen der Isolierung antimikrobieller Peptide aus Kalbsthymus wurde zunächst der peptidische Charakter der aktiven Substanzen überprüft. Dies war notwendig, um ausschließen zu können, daß die antimikrobielle Aktivität z.B. von klassischen Antibiotika oder anderen Thymusbestandteilen wie Lipiden hervorgerufen sein könnte. Zu diesem Zweck wurden Peptidbank-Fractionen ausgewählt, die im antimikrobiellen Screening ein Maximum an Aktivität aufwiesen, und eine Äquivalentmenge von 4 g mit der Endoprotease Subtilisin hydrolysiert (Kapitel 2.3.5). Subtilisin spaltet Peptidbindungen unspezifisch in kurze nicht aktive Fragmente. Sollte die im Radial-Diffusionshemmtest nachgewiesene antimikrobielle Aktivität durch Peptide hervorgerufen werden, dürfte diese auf Grund der Degradation dieser Peptide durch die Protease nicht mehr nachweisbar sein (Zucht *et al.*, 1991). Die enzymatische Spaltung mittels Hydrolyse durch Subtilisin läßt somit Rückschlüsse auf die chemische Struktur der aktiven Substanzen zu.

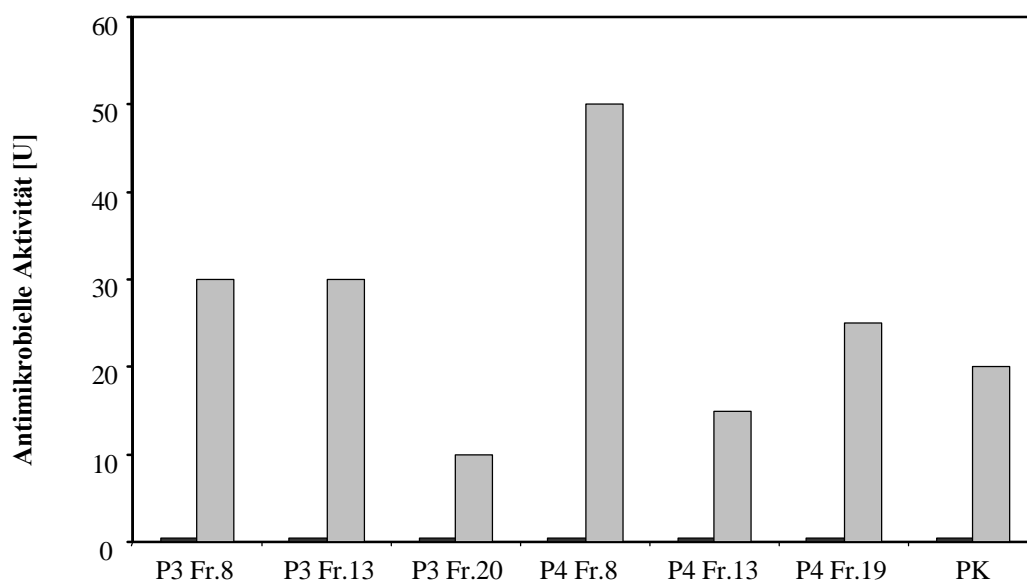


Abbildung 9: Antimikrobielle Aktivität von ausgewählten Peptidbank-Fractionen nach Hydrolyse durch die Protease Subtilisin. Als Teststamm wurde *E. coli* im Radial-Diffusionshemmtest eingesetzt. Als Positivkontrolle (PK) diente Lysozym (20 µg/ml).

- antimikrobielle Aktivität der Fractionen nach Inkubation mit Subtilisin
- antimikrobielle Aktivität der Fractionen ohne Enzymbehandlung

Als Kontrolle für die antimikrobielle Aktivität der getesteten Fraktionen wurde ein entsprechender Teil der Fraktionen analog den Hydrolysebedingungen, allerdings ohne Zusatz des Enzyms, behandelt. Zum Nachweis der Aktivität der Protease wurde ein bekanntes antimikrobiell wirksames Peptid (Lysozym 20 µg/ml) hydrolysiert.

Bei anschließender Überprüfung der biologischen Aktivität konnte bei allen hydrolysierten Peptidbank-Fractionen ein vollständiger Aktivitätsverlust festgestellt werden (Abbildung 9). Die unbehandelten Proben dagegen wiesen eine eindeutige antimikrobielle Aktivität im Radial-Diffusionshemmtest auf. Lysozym, welches als Positivkontrolle verwendet wurde, wies keine antimikrobielle Aktivität nach erfolgter Hydrolyse auf. Weiterhin zeigten der verwendete Puffer und die Lösung von Puffer und Enzym keine wachstumshemmende Aktivität.

Der vollständige Verlust der antimikrobiellen Aktivität nach Hydrolyse mit Subtilisin weist folglich auf den peptidischen Charakter der biologisch aktiven Substanzen hin.

3.2.3 Konzentrationsabhängigkeit der antimikrobiell aktiven Fraktion

Um festzustellen, ob die wachstumsinhibierende Wirkung der Peptidbank-Fractionen durch wirkstoffvermittelte Effekte ausgelöst wird oder ob der toxische Effekt auf die Applikation einer zu hohen Substanzmenge zurückzuführen ist, wurde die Konzentrationsabhängigkeit untersucht.

Abbildung 10 zeigt die antimikrobielle Wirkung einzelner Fractionen der Kalbsthymus-Peptidbank gegen *E. coli* in einem Konzentrationsbereich von 8 g, 4 g und 2 g Gewebeäquivalent. Es wurden jeweils die Fractionen gewählt, die Maxima im antimikrobiellen Screening aufwiesen (Kapitel 3.2.1).

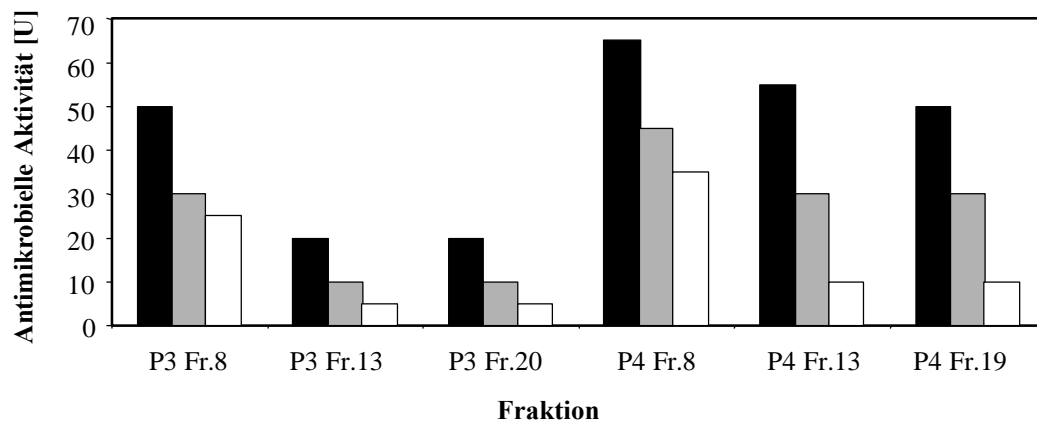


Abbildung 10: Konzentrationsabhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von ausgewählten Fractionen, die antimikrobielle Peptide enthielten, im Radial-Diffusionshemmtest. Die schwarzen Balken entsprechen 8 g, die grauen Balken 4 g und die weißen Balken 2 g Gewebeäquivalent der Kalbsthymus-Peptidbank.

Bei allen getesteten Fractionen konnte eine Konzentrationsabhängigkeit gegen *E. coli* gezeigt werden. Bei diesem Test wurde weiterhin ersichtlich, daß Fraktion 8 des pH-Pools 4 die größte antimikrobielle Wirkung auf *E. coli* hat. Außerdem wird deutlich, daß die Substanzen, die in Fractionen des pH-Pools 3 eluierten, einen weniger basischen Charakter haben als Peptide, die in den Fractionen des pH-Pools 4 eluieren. Eine hohe Basizität ist ein wesentliches Merkmal antimikrobieller Peptide; je höher die Basizität desto größer die antibakterielle Aktivität (Hancock und Diamond, 2000).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in Fraktionen von Pool 3, 4 und 5 der Kalbsthymus-Peptidbank Substanzen enthalten sind, die eine wachstumshemmende Wirkung auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien hervorrufen. Nach Hydrolyse der Substanzen mit der Protease Subtilisin konnte keine Aktivität mehr festgestellt werden. Dies deutet auf den peptidischen Charakter der antimikrobiell wirksamen Substanzen hin. Weiterhin zeigten die in den Fraktionen enthaltenen Komponenten im Radial-Diffusionshemmtest eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, was ein Hinweis für einen wirkstoffvermittelten Effekt ist. Auf Grund der besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der exakteren Auswertemöglichkeit sowie der größeren Sensibilität wurde im weiteren Verlauf der Reinigung antimikrobieller Peptide aus Kalbsthymus *E. coli* als Testorganismus verwendet. Fraktion 8 aus pH-Pool 4 der Kalbsthymus-Peptidbank zeigte die höchste antimikrobielle Aktivität gegen den Gram-negativen Bakterienstamm. Aus diesem Grund wurde diese Fraktion als Ausgangsmaterial für die Isolierung von antimikrobiellen Peptiden herangezogen.

Zur weiteren Reinigung dieser antimikrobiell aktiven Fraktion wurde ein Trennverfahren entwickelt, das im folgenden dargestellt werden soll.

3.3 Entwicklung eines Verfahrens zur Trennung von Thymuspeptiden

Zur Reinigung der biologisch aktiven Peptide aus Kalbsthymus war es notwendig, inaktive Bestandteile abzutrennen. Außerdem bestand die Notwendigkeit die aktiven Bestandteile anzureichern, um sie im Radial-Diffusionshemmtest nachweisen zu können. Um eine erste Einschätzung über die chemischen Eigenschaften der Peptide geben zu können, wurde das Elutionsverhalten der Peptide in der Peptidbank untersucht. Die Elution der Peptide in Fraktion 8 des pH-Pool 4 vom Kationenaustauscher erfolgte bei einem vergleichsweise hohen pH-Wert des Eluenten von 7,0. Dies läßt den Rückschluß zu, daß es sich um sehr kationische Peptide handelt, da sie offensichtlich eine starke Wechselwirkung mit dem Material des Kationenaustauscher eingehen. Andererseits erfolgte eine Elution von der RP-Säule bereits bei geringen Konzentrationen an dem hydrophoben Fließmittel Acetonitril (18%), was wiederum auf die hydrophilen Eigenschaften der Peptide schließen läßt.

Im folgenden ist das Trennverfahren dargestellt, das zur Reinigung von antimikrobiell wirksamen Peptiden aus der Kalbsthymus-Peptidbank benutzt wurde.

Die Isolierung der antimikrobiellen Peptide erfolgte entsprechend des bereits festgestellten hydrophilen und basischen Charakters über mehrere Reversed-Phase- und Kationenaustausch-Chromatographieschritte. Den resultierenden Fraktionen der einzelnen Chromatographieschritte wurden Aliquots entnommen, lyophilisiert und im Radial-Diffusionshemmtest zur Detektion antimikrobieller Aktivität eingesetzt. Diese Methode eignete sich besonders, da der Arbeitsaufwand als Screeningverfahren vergleichsweise gering ist und nur geringe Mengen des wirksamen Peptids benötigt werden, um einen Hemmhof zu erzeugen (Lehrer *et al.*, 1991). Damit werden die entstehenden Verluste gering gehalten. Außerdem ist es mit diesem Test möglich, ein Elutionsprofil der antimikrobiellen Substanzen durch die Größe der Hemmhöfe zu erkennen. Als Testbakterium wurde wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, *Escherichia coli* BL21 verwendet.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung diente Fraktion 8 aus pH-Pool 4 der Kalbsthymus-Peptidbank. Diese Fraktion wurde auf Grund des in Kapitel 3.2.3 festgestellten Maximums an antimikrobieller Aktivität gegen den Teststamm ausgewählt. Die bei der Chromatographie

entstehenden Fraktionen mit der höchsten antimikrobiellen Aktivität wurden mit den Nachbarfraktionen vereinigt, um eine Aufkonzentrierung der aktiven Substanzen zu erreichen. Diese dienten als Ausgangsmaterial für die weitere Trennung.

Zur Detektion von Lysozym in HPLC-Fractionen wurden alle Chromatographieschritte mit MALDI-Messungen begleitet. Lysozym, welches in vielen Geweben und Körperflüssigkeiten als antimikrobielles Peptid vorkommt, hat ein Molekulargewicht von 14767 Da. Im MALDI-Massenspektrum ist oftmals nur das doppelt geladene Ion sichtbar (Abbildung 11). Zur weiteren Aufklärung, ob die antimikrobielle Aktivität durch Lysozym verursacht wurde, wurde der Muramidase-Test angewendet (Kapitel 2.5.2.3). Mit Hilfe des Molekulargewichts und des Nachweises der Muramidaseaktivität in den Fraktionen konnte Lysozym eindeutig identifiziert werden.

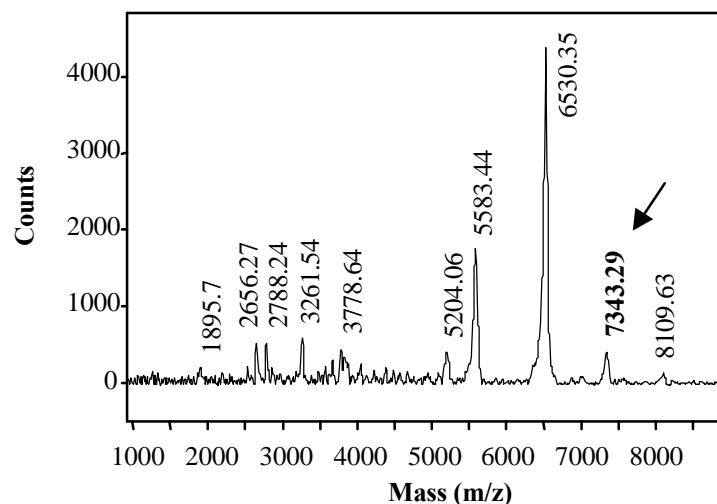


Abbildung 11: Detektion von Lysozym im MALDI-Massenspektrum. Der Pfeil markiert das zweifach geladene Ion von Lysozym.

Den ersten Schritt zur Trennung der Thymuspeptide stellte eine RP-Chromatographie dar. Nachdem der Peptidgehalt der ausgewählten Peptidbankfraktion ermittelt wurde (1,46 g), wurden die enthaltenen Peptide in bidestilliertem Wasser gelöst und auf eine semipräparative RP-Säule aufgetragen. Gebundene Peptide wurden durch einen linearen Anstieg von ACN im Elutionsmittel (10 mM HCl / 80 % ACN in 10 mM HCl) getrennt und fraktioniert. Es konnten zwei Maxima von antibakterieller Aktivität in den Fraktionen 10 und 13 detektiert werden.

Zur weiteren Reinigung wurden Fraktion 10 und 11 vereinigt und chromatographiert (Abbildung 12A).

Beim zweiten Reinigungsschritt wurde die stationäre Phase beibehalten und die flüssige Phase durch MeOH, ein hydrophileres Elutionsmittel, ersetzt. Um eine bessere Trennleistung zu erhalten, wurde ein Gradient mit flacherer Steigung (0,7% B/min) als bei der ersten HPLC-Trennung gewählt. Es zeigte sich eine deutliche Trennung der Peptide, die jeweils in zwei Hauptpeaks eluierten (Abbildung 12B). Fraktion 8 und 9 wiesen ein Maximum an antimikrobieller Aktivität auf, wurden vereinigt und in einem weiteren Reinigungsschritt chromatographiert.

Da ein Großteil der antimikrobiellen Peptide einen sehr hohen pI-Wert aufweist, der durch ihren meist hohen Gehalt an basischen Aminosäuren entsteht (Hancock und Lehrer, 1998), wurde zur Trennung von aktiven und inaktiven Peptiden im nächsten Schritt eine Kationenaustausch-Chromatographie verwendet. Aufgrund des verwendeten Elutionsmittels (1 M KCl) enthielten die dabei entstandenen Fraktionen Salz in Konzentrationen bis zu 600 mM. Bei dieser Salzkonzentration sind die verwendeten Testorganismen nicht mehr lebensfähig und viele der antimikrobiellen Peptide werden inaktiviert (Tossi *et al.*, 2000), so daß die Fraktionen entsalzt werden mußten (Kapitel 2.2.3), bevor sie im Radial-Diffusionshemmtest auf antimikrobielle Aktivität untersucht werden konnten (Abbildung 12C).

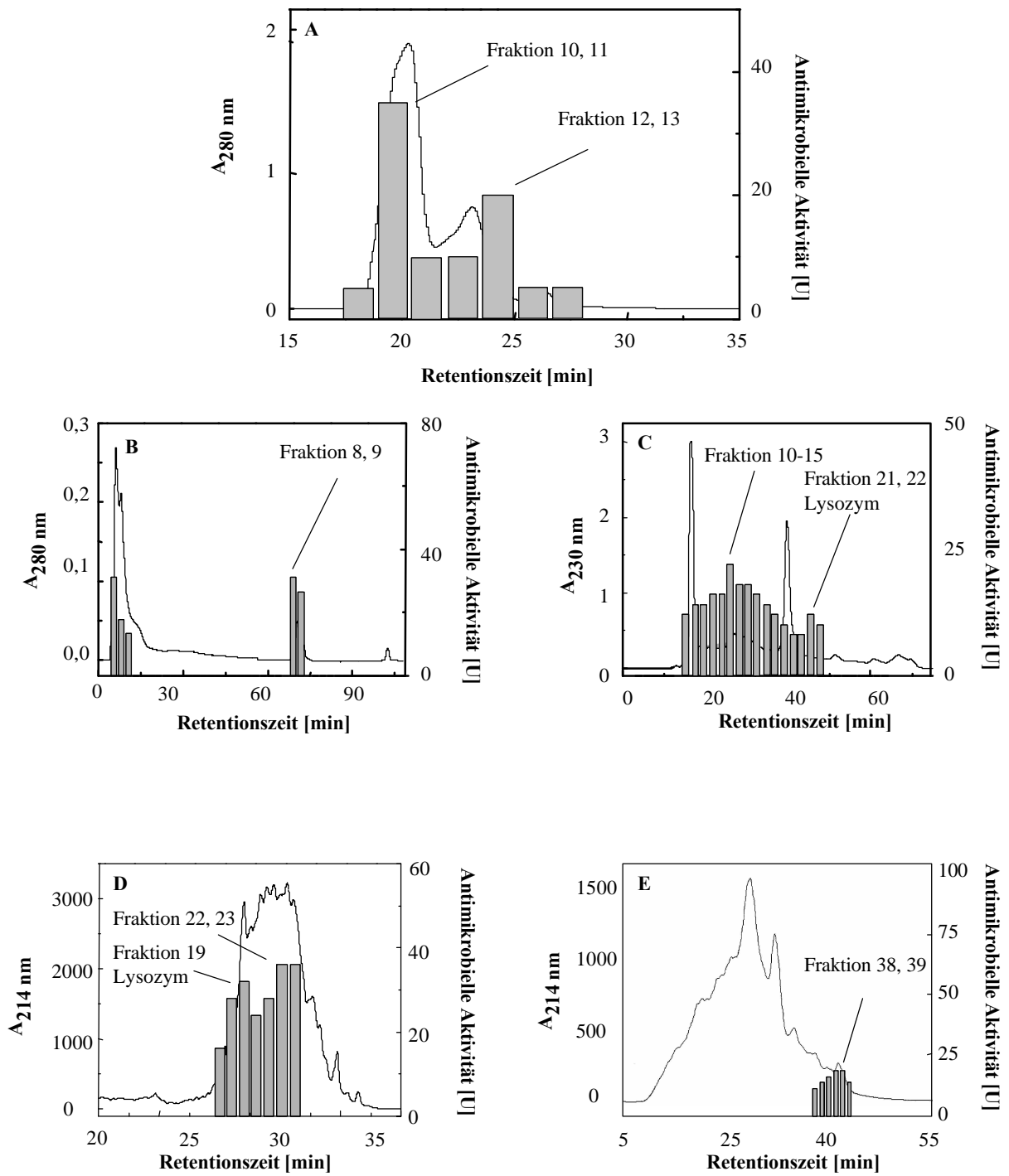
Im nächsten Reinigungsschritt wurde wieder eine RP-Chromatographie durchgeführt. Mit Hilfe von ACN als Elutionsmittel und einer RP-C15 Säule mit einer geringeren Poren- und Partikelgröße konnten die antimikrobiell aktiven Peptide weiter von inaktiven Peptiden getrennt werden (Abbildung 12D). Um eine bessere Trennleistung zu erhalten, wurde ein flacher Gradient gewählt (0,5 % B/min). Die Fraktionen 22 und 23, in denen die größte biologische Aktivität nachzuweisen war, wurden vereinigt und im folgenden Chromatographieschritt durch einen weiteren Kationenaustauscher separiert.

Die Verwendung analytischen Kationenaustauschermaterials resultierte in einer optimalen Trennung der Peptide. Als Puffersystem wurde ein Natriumphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 4,5 verwendet. Gebundene Peptide wurden durch linearen Anstieg von NaCl im

Elutionsmittel eluiert (Abbildung 12E). Die Fraktionierung erfolgte manuell nach Absinken der Absorption. Nach dem Entsalzen der zu testenden Äquivalentmenge konnten die Fraktionen im Radial-Diffusionshemmtest auf antimikrobielle Aktivität untersucht werden.

Den abschließenden Reinigungsschritt stellte eine analytische RP-Chromatographie dar (Abbildung 12F). Dabei wurden verschiedene Säulen mit unterschiedlichem Trennverhalten verwendet, die zuvor durch einen Peptidstandard getestet wurden (vgl. Kapitel 2.2.1). Die Auswahl richtete sich nach dem Trennverhalten der Säulen und der Hydrophobizität der Probe, die aus dem Elutionsprofil des 4. Chromatographieschrittes abgeschätzt wurde. Als Elutionsmittel diente ACN. Bei analytischem Säulenmaterial ist es möglich, durch geringe Poren- und Partikelgröße einen sehr flachen Gradienten von 0,3 % B/min für die Trennung zu nutzen, der zur Reindarstellung der Peptide führte. Im Anschluß wurden die Fraktionen auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht.

Der Reinheitsgrad der Fraktionen wurde durch Kapillarzonenlektrophorese überprüft (Kapitel 2.3.2). Nach Anwendung des dargestellten Trennverfahrens war im Elektropherogramm eine Substanz mit einer Reinheit von mindestens 95 % detektierbar (Abbildung 12H). Die molekulare Masse des gereinigten Peptids wurde durch MALDI- bzw. ESI-Messungen bestimmt (Abbildung 12G).



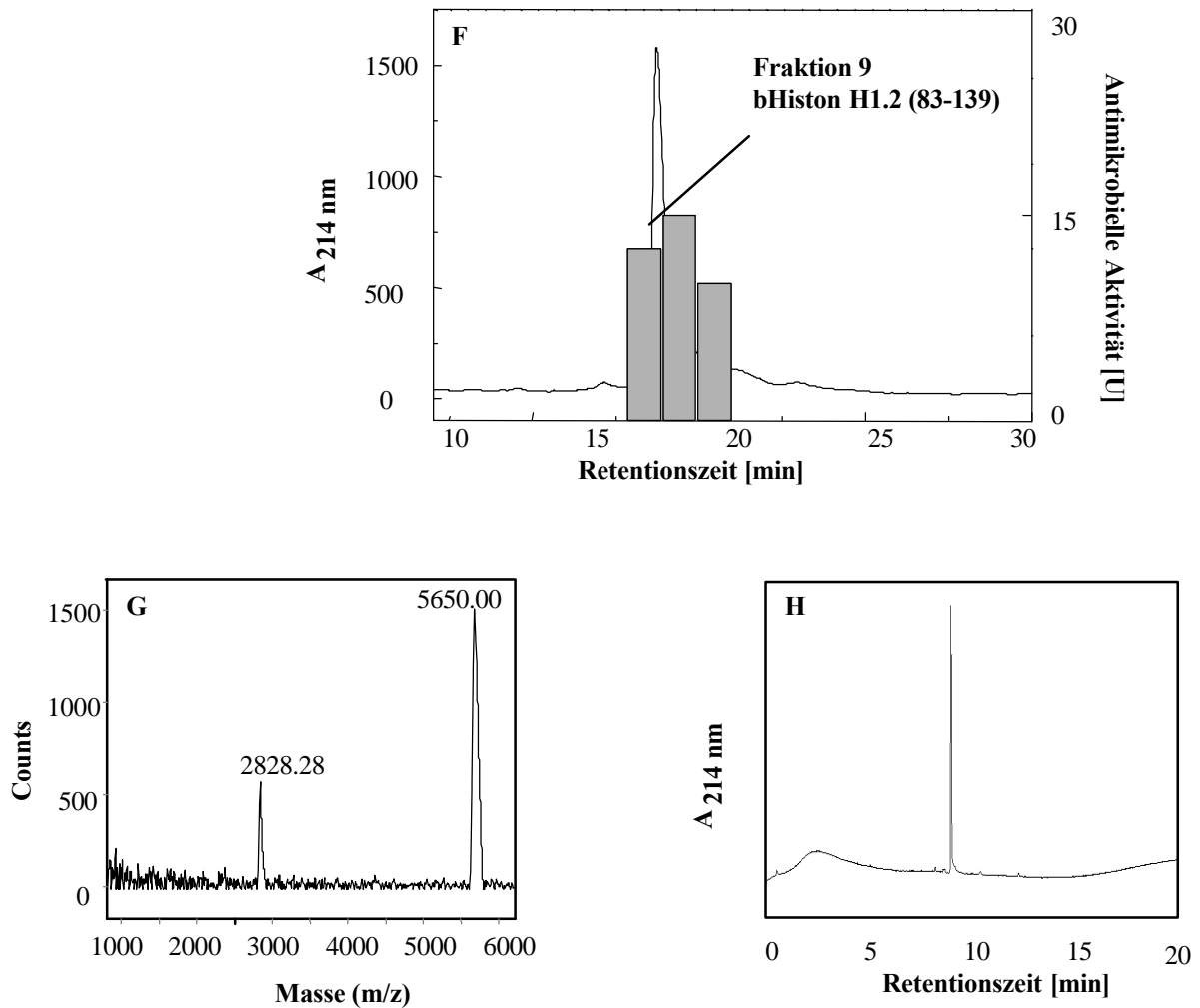


Abbildung 12: Reinigung von antimikrobiellen Peptiden aus Kalbsthymus. Die grauen Balken zeigen die antimikrobielle Aktivität der Fraktionen. Im Radial-Diffusionshemmtest (Kapitel 2.5.2.1) wurde ein Teil der HPLC-Fractionen entsprechend 16 g Gewebeäquivalent Thymus eingesetzt.

A) RP-Chromatographie von pH-Pool 4 Fraktion 8 der Kalbsthymus-Peptidbank. In den HPLC-Fractionen sind Substanzen enthalten, die das Wachstum von *Escherichia coli* inhibieren.

Säule: Bakerbond, RP C-18, 47 x 300 mm, 300 Å, 15 - 30 µm. Fließmittel: A: 10 mM HCl, B: 80 % Acetonitril / 10 mM HCl. Bei einer Flußrate von 40 ml/min wurde zur Elution folgender Gradient verwendet: 10 - 60 % B in 50 min. Detektionswellenlänge: 280 nm.

B) Rechromatographie der antibakteriell wirksamen Fraktionen 10 und 11 in einem zweiten Reversed-Phase-HPLC Trennungsschritt. Antimikrobielle Substanzen wurden in fünf Fraktionen nachgewiesen. Die Fraktionen 1, 8 und 9 hemmten das Wachstum von *E. coli* am stärksten. Fraktion 8 und 9 wurden vereinigt und weiter chromatographiert.

Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 40 g

Säule: siehe A). Fließmittel A: 20 % MeOH / 10 mM HCl, B: Methanol / 10 mM HCl, Flußrate: 30 ml/min. Gradient: 10 - 50 % B in 57 min. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

- C) Kationenaustausch-Chromatographie von Fraktion 8 und 9. Antimikrobielle Aktivität wurde im Bereich des gesamten Chromatogramms nachgewiesen, wobei zwei Maxima unterschiedlicher Intensität beobachtet werden konnten. Fraktion 12 zeigte den stärksten antimikrobiellen Effekt auf *E. coli*. Fraktion 10 bis 15 wurden vereinigt und weiter chromatographiert. In Fraktion 21 und 22 konnte Lysozym mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie und des Muramidase-Aktivitätstest (Kapitel 2.5.2.3) nachgewiesen werden.

Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 100 g

Säule: Biotek PrepPak, 10 x 125 mm, 1000 Å, 7 µm, Fließmittel: A: 50 mM KH₂PO₄, B: 1,5 M KCl / 50 mM KH₂PO₄, Gradient: 10 – 60 % B in 50 min, Flußrate: 2 ml/min, Detektionswellenlänge: 230 nm.

- D) Rechromatographie der antibakteriell wirksamen Fraktionen 10 - 15 in einem Reversed-Phase-HPLC Trennungsschritt. Die antimikrobielle Aktivität verteilte sich über einen breiten Bereich des Chromatogramms, wobei zwei Maxima nachgewiesen werden konnten. In Fraktion 19 wurde Lysozym detektiert. Die Fraktionen mit der größten antibakteriellen Aktivität wurden vereinigt und rechromatographiert.

Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 200 g

Säule: Pharmacia Source RP-C15, 10 x 250 mm, 120 Å, 15 µm, Fließmittel A: 0,1 % TFA, B: 80 % ACN / 0,085 % TFA, Gradient: 20 - 50 % B in 60 min, Flußrate: 1,8 ml/min, Detektionswellenlänge: 214 nm.

- E) Kationenaustausch-Chromatographie von Fraktion 22 und 23. Das antimikrobielle Peptid wurde effektiv von inaktiven Peptiden getrennt. Die biologische Aktivität wurde in sechs benachbart liegenden Fraktionen nachgewiesen. Fraktion 38 und 39 zeigten ein Maximum an antibakterieller Aktivität und wurden rechromatographiert.

Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 800 g

Säule: Parcasil Pepkat, 4 mm x 50 mm, 300 Å, 5 µm, Fließmittel A: 10 mM NaH₂PO₄ pH 4,5, Fließmittel B: 1 M NaCl in Fließmittel A, Flußrate: 0,75 ml/min, Gradient: 0 - 60 % B in 60 min. Detektionswellenlänge: 214 nm.

- F) Rechromatographie von Fraktion 38 und 39. Das antimikrobielle Peptid bHiston H1.2 konnte in Fraktion 9 rein dargestellt werden.

Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 1000 g

Säule: ReprosilPur RP-C18, 4,6 mm x 250 mm, 100 Å, 5 µm, Fließmittel A: 0,1 % TFA, Fließmittel B: 80 % ACN in 0,085 % TFA, Flußrate: 0,75 ml/min, Gradient: 20 - 40 % B in 67 min. Detektionswellenlänge: 214 nm.

- G) MALDI-Massenspektrum von bHiston H1.2. Die Masse des gereinigten Peptides beträgt 5648 Da. Im Massenspektrum wurde weiterhin das zweifach positiv geladene Ion (2824 Da) von bHiston H1.2 detektiert.
- H) Analyse des Reinheitsgrades des antimikrobiell aktiven Peptides bHiston H1.2 durch Kapillarzonenelktrophorese. Der Reinheitsgrad des gereinigten Peptides beträgt 96 %.

Die Aufklärung der Primärstruktur der gereinigten Peptide erfolgte durch N-terminale Sequenzierung mit Hilfe des Edman - Abbaus (Kapitel 2.3.3). Die Aminosäuresequenz von Peptiden mit weniger als 42 Aminosäuren wurde auf diese Weise vollständig bestimmt. Die weitere Folge von Aminosäuren von bisher unbekanntem Peptidsequenzen wurde mit Hilfe molekularbiologischer Methoden aufgeklärt.

Die erhaltenen Peptidsequenzen wurden mit Eintragungen aus der Swissprot- bzw. EMBL-Datenbank mit Hilfe des BLAST-Algorithmus verglichen. Die gereinigten Proteinfragmente wurden unter Berücksichtigung ihres Molekulargewichts über die bei den Sequenzvergleichen ermittelte wahrscheinlichste Möglichkeit identifiziert. Bei Massenunterschieden zwischen theoretischer und experimenteller Aminosäuresequenz wurden eventuelle Modifikationen von Aminosäuren untersucht. Unbekannte Sequenzen wurden durch Translation der genomischen Sequenz der Klone der EST-Datenbank in die Proteinsequenz identifiziert.

Das Reinigungsverfahren zur Isolierung antimikrobieller Peptide aus Kalbsthymus wurde unter Berücksichtigung ihrer chemischen Eigenschaften entwickelt. Dabei erwies sich der Wechsel von RP- und Kationenaustauschchromatographie als sehr effektive Methode und ermöglichte die Reindarstellung der Peptide in höchstens sechs Chromatographieschritten. Mit Hilfe der angewendeten Trennmethode wurde ein Reinheitsgrad von mindestens 95 % erreicht, der für die weitere Strukturaufklärung mittels MALDI- und ESI-MS sowie Edman-Sequenzierung erforderlich war.

Abbildung 13 zeigt das allgemein verwendete Verfahren zur Trennung, Reinigung und Identifizierung von antimikrobiell wirksamen Peptiden aus der Kalbsthymus-Peptidbank.

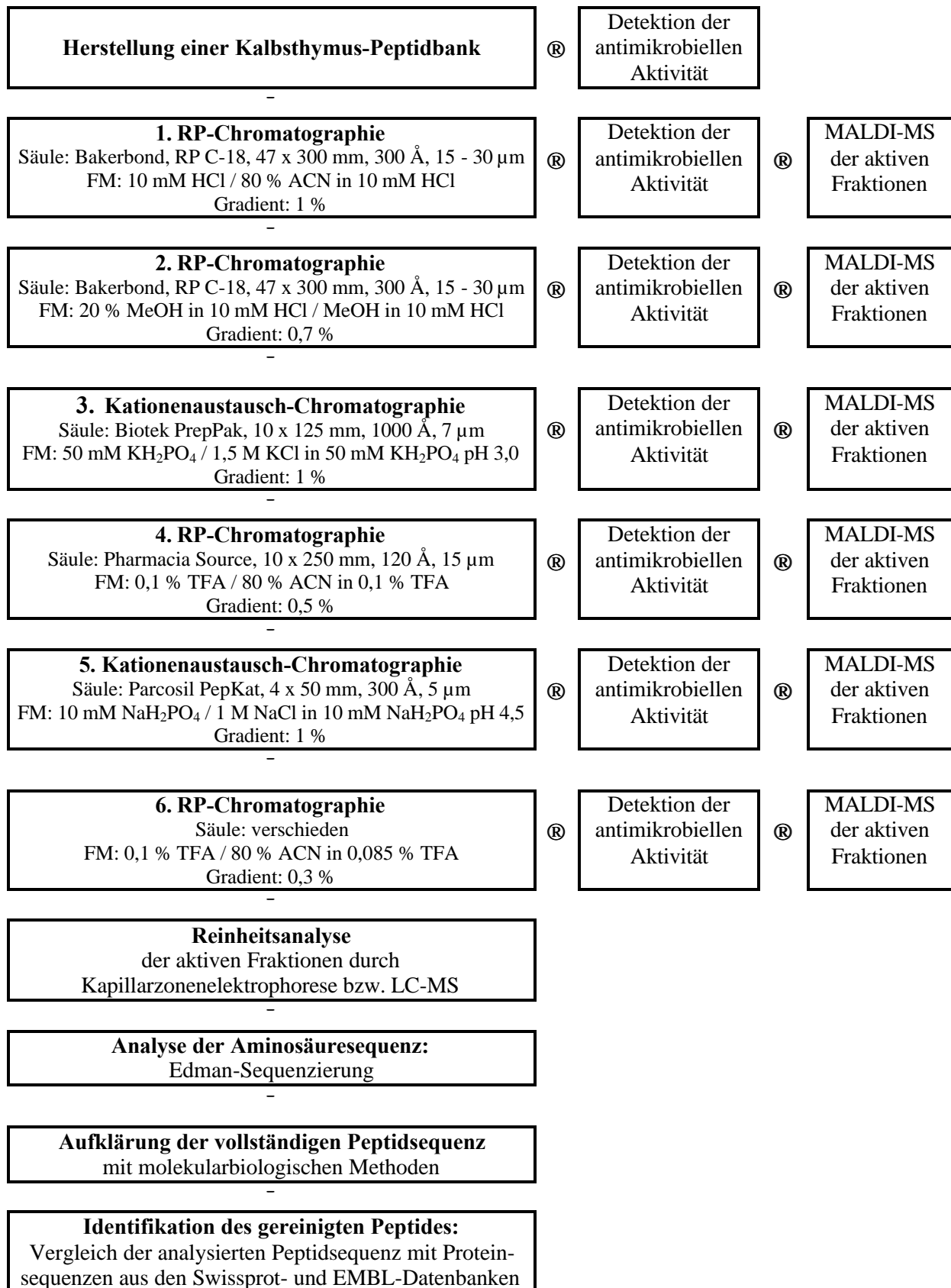


Abbildung 13: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit entwickelten Reinigungsverfahrens für antimikrobielle Peptide aus Kalbsthymus.

3.4 Reinigung von antimikrobiellen Peptiden aus Kalbsthymus

Wie im Kapitel 3.2.1 beschrieben wurde, sind im Thymus Peptide vorhanden, die eine wachstumshemmende Wirkung auf Bakterien haben. Fraktion 8 aus pH-Pool 4 der Kalbsthymus-Peptidbank zeigte dabei die größte antibakterielle Aktivität gegen *E. coli*. Im weiteren Verlauf wurden die Peptide, die diese Aktivität hervorriefen, mit Hilfe des dargestellten Reinigungsverfahrens isoliert und ihre Primärstruktur aufgeklärt.

Die antimikrobielle Aktivität von Fraktion 8 des pH-Pools 4 wird im wesentlichen durch fünf Peptide und Lysozym hervorgerufen. Die Peptide konnten aus Fraktionen der Chromatographien gereinigt werden, in denen eine antibiotische Wirkung nachzuweisen war, die nicht durch Lysozym hervorgerufen wurde. Die gereinigten Peptide wurden als Proteinfragmente identifiziert. Die antimikrobielle Wirkung dieser Fragmente war bisher nicht bekannt. Da bei drei Proteinfragmenten die Aminosäuresequenz der Ausgangsproteine noch unbekannt war und keine Massenübereinstimmung mit der humanen Sequenz oder Sequenzen anderer Spezies festgestellt werden konnte, mußten diese Aminosäuresequenzen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden aufgeklärt werden. Desweiteren konnte die Modifikation einer Aminosäure eines Proteinfragmentes aufgeklärt werden, die zu einer Massendifferenz führte. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht der gereinigten Proteinfragmente.

Tabelle 8: Übersicht der gereinigten antimikrobiellen Peptide.

Proteinprecursor	gereinigtes Proteinfragment
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	bGAPDH (104-122)
Glycin-rich Protein	bGRP (95-133)
Histon H1.2	bH1.2 (82-138)
Nuclear Mitotic Apparatus Protein	bNuMA (2052-2103)
Nucleolin	bNucleolin (40-141/142/143)

3.4.1 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (104-122)

Bei einem gereinigten Peptid mit antimikrobieller Aktivität handelt es sich um ein Fragment der bovinen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (104-122) (bGAPDH). Das Peptid konnte in 4 Chromatographieschritten rein dargestellt werden (Anhang 2.1). Das Proteinfragment besteht aus 19 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 1861 Da auf. Sowohl die Sequenz als auch die mit MALDI-Massenspektrometrie analysierte Masse des gereinigten Peptides stimmte mit der rechnerisch ermittelten des Proteinfragmentes bGAPDH (104-122) überein.

Das Proteinfragment hat einen pI von 11,9 und zählt mit einem Anteil von 26 % an kationischen Aminosäuren zu den basischen Peptiden. In der Aminosäuresequenz sind keine Cysteinreste enthalten, das Peptid ist linear und unverbrückt. Die Dokumentation der Isolierung von bGAPDH (104-122) aus der Kalbsthymus-Peptidbank ist in Anhang 6.2.1 enthalten.

Das Peptid eluiert im Bereich von 15 – 17 % ACN von einer semipräparativen RP-Säule, was Rückschlüsse auf den stark hydrophilen Charakter des Proteinfragments zulässt. Die Identität der bovinen zur humanen Sequenz beträgt bei diesem Fragment 95 % (Abbildung 14), wobei nur eine Aminosäure, ein Glutaminrest, durch einen basischen Lysinrest ausgetauscht ist. bGAPDH (104-122) besitzt somit eine Gesamtnettoladung von +5.

```
hGAPDH (104-122)    KAGAHHLQGGAKRVIISAPS
bGAPDH (104-122)    KAGAHHLKGGAKRVIISAPS
                    *****
```

Abbildung 14: Aminosäuresequenzvergleich zwischen humaner GAPDH (104-122) (hGAPDH) und boviner GAPDH (104-122) (bGAPDH). Die identischen Aminosäuren sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die basischen Aminosäuren sind farbig hervorgehoben.

Durch NMR-Messungen konnte die α -helikale Struktur des Proteins in diesem Bereich nachgewiesen werden (Prosite, PS00071). Das Ausbilden einer solchen Struktur sowie die positive Nettoladung des Peptids größer +3 werden als wesentliche Voraussetzungen für die Wirkungsweise antimikrobieller Peptide angenommen (Vaara, 1992; Scott *et al.*, 1999; Saberwal und Nagaraj, 1994; Hancock, 1997).

GAPDH ist ein 37 kDa großes Enzym. Es katalysiert die Reaktion von Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-Bisphosphoglycerat durch Reduktion von NAD^+ zu NADH, das innerhalb der Glykolyse zur Energiegewinnung im Stoffwechselkreislauf benötigt wird. Allerdings konnten in den letzten Jahren dem Enzym viele weitere Funktionen zugeschrieben werden, wie Phosphotransferase-Aktivität, eine Rolle bei der Membranfusion, beim Zell-RNA-Transport, der DNA-Replikation, und dem DNA-Reparatur-Mechanismus (Habenicht, 1997). Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen GAPDH und verschiedenen Krankheiten wie altersbedingte neurodegenerative Erkrankungen, Prostata – Krebs und viraler Pathogenese hergestellt werden. Bei neurodegenerativen Erkrankungen kommt es zu Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen GAPDH und β -Amyloid-Precursorprotein, Huntington-Protein, Antropin und Ataxin und ihrem Rezeptor. Dies führt zu einer Verminderung der glykolytischen Aktivität des Proteins, welche Strukturveränderungen und Läsionen des Gehirns verursachen. Bei metastasierenden Zellen in der Prostata konnte eine erhöhte Expression von GAPDH im Cytoplasma festgestellt werden (Sirover, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die steigende Expression von GAPDH in neuronalen wie auch nicht-neuronalen Zellen in Zusammenhang mit induzierter Apoptose dieser Zellen steht (Berry und Boulton, 2000). Der Mechanismus ist allerdings noch unklar. Es ist bekannt, daß auch Bakterien bei Zellen Apoptose induzieren können (Hecht, 1999). Die ansteigende Expression von GAPDH und die anschließende durch Proteolyse entstehenden Fragmente könnten als Schutz der Zellen bei einem Bakterienbefall dienen.

Hessler *et al.* konnte die Bedeutung der GAPDH als kalzium-abhängiges Fusionsmolekül nachweisen, welches entscheidend an der Fusion von neutrophilen Granulozyten und der Plasmamembran beteiligt ist (Hessler *et al.*, 1998). Neutrophile Granulozyten nehmen im Immunsystem entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung von Entzündungserkrankungen. 1982 konnte das Enzym in hohen Konzentrationen aus verschiedenen menschlichen Organen,

wie Leber, Gehirn, Herz, Niere und Lunge isoliert werden (Heinz und Freimüller, 1982). Keokitichai und Wrigglesworth zeigten, daß nach Lyse frisch entnommener Erythrozyten 73 % der GAPDH – Aktivität assoziiert mit der Membran – Fraktion gefunden wurde, während sich 27 % im Überstand befanden (Keokitichai und Wrigglesworth, 1980). Das zeigt, daß mehr als $\frac{1}{4}$ des Enzyms nach dem Absterben und Lyse der Zellen nicht mehr an die Membran gebunden ist, sondern dem Körper als freies Protein zur Verfügung steht. Dieses unterliegt der Proteolyse, bei welcher biologisch aktive Fragmente entstehen könnten, wie das hier isolierte Fragment (104-122).

Ein weiteres GAPDH-Fragment (1-25) konnte von Seiler *et al.* (1999) aus Schweinehirn isoliert werden, was für das Vorkommen von Protein-Fragmenten in Geweben spricht. Allerdings ist die biologische Funktion dieses Proteinfragments noch unklar. Bisher sind keine weiteren biologisch aktiven Fragmente des Proteins bekannt.

3.4.2 Glycin-rich-Protein (95-133)

Ein weiteres antimikrobielles Peptid, welches in 6 Chromatographieschritten aus Fraktion 8 des pH-Pools 4 der Kalbsthymus-Peptidbank gereinigt wurde (Anhang 6.2.2), wurde als Fragment des Glycin-rich-Proteins identifiziert und im weiteren Verlauf als bGRP (95-133) bezeichnet. Das Peptid besitzt 39 Aminosäuren und einen pI von 12,7. Auffällig sind die große Anzahl an basischen Aminosäuren (5 Argininreste, 4 Lysinreste), die zusammen mehr als 23 % des Peptids ausmachen. Durch die polaren Seitenketten der Aminosäuren zeigt das Peptid ein hydrophiles Elutionsverhalten bei der HPLC und eluiert bei 21 % ACN.

bGRP (95-133) besitzt eine positive Nettoladung von +8, was den stark kationischen Charakter des Peptids unterstreicht. Über die sekundäre Struktur ist bisher nichts bekannt.

bGRP (95-133) QQKQQKGRGMGGAGRGVFGGRGRGGIPGTGRGQPEKKPG

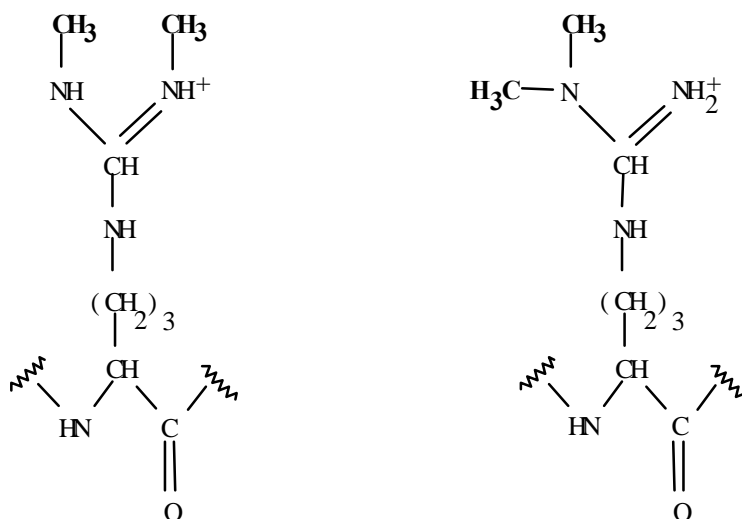
Abbildung 15: Aminosäuresequenz von bovinem GRP (95-133). Die kationischen Aminosäuren sind rot, die anionische Aminosäure ist grün gekennzeichnet.

Die bovine und humane Sequenz des Proteinfragmentes sind identisch.

Glycin-rich-Protein, welches auch als U6 snRNA-associated Sm-like Protein (U6-LSm) bekannt ist, besteht aus 139 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 13 kDa. Die native Form konnte bisher nicht isoliert werden, daher ist über eventuelle Modifikationen einzelner Aminosäuren nichts bekannt. Erstmals konnte die Genexpression im Hypothalamus des Menschen 1998 nachgewiesen werden (Lin *et al.*, 1998).

Bei „small nuclear ribonucleoprotein particles“ (snRNP) handelt es sich um kleine Proteine, die spezifisch mit der RNA zu Komplexen assoziiert sind. Im Spleißosom sind drei Arten von snRNP's bekannt. Diese sind am Spleißen der mRNA-Vorläufer beteiligt. Dabei sind U4/U6- und U5- snRNA entscheidend an der Spleißreaktion beteiligt. U6 snRNA-associated Sm-like Protein bindet spezifisch an die U6- snRNA und fördert die Bildung von U4/U6- RNA-Komplexen (Achsel *et al.*, 1999).

Bei einem Vergleich des theoretischen Molekulargewichts (3891 Da) mit dem experimentell durch MALDI-MS bestimmten (4031 Da) wurde eine Massendifferenz von 140 Da ermittelt, die nicht auf eine weitere Aminosäure zurückzuführen sein konnte. Außerdem zeigten die Argininreste kein übliches Elutionsverhalten im Edman-Abbau, was auf eine Modifizierung der Argininreste hindeutete. Da alle Argininreste das gleiche ungewöhnliche Elutionsverhalten bei der Edman-Sequenzierung zeigten, lag die Vermutung nahe, daß alle fünf Argininreste auf die gleiche Weise modifiziert sind. Die Massendifferenz von 140 Da ließ sich ausschließlich auf eine Dimethylierung der Argininreste zurückführen, wobei zwei N-ständige Wasserstoffatome der Aminogruppen des Arginins durch je eine Methylgruppe ersetzt werden (Abbildung 16). Dabei besteht die Möglichkeit einer symmetrischen oder unsymmetrischen Dimethylierung.



symmetrisches N^G, N^G-Dimethylarginin (SDMA) unsymmetrisches N^G, N^G-Dimethylarginin (ADMA)

Abbildung 16: Mögliche Dimethylierung der Argininreste.

1987 konnten Young und Grynspan zeigen, daß es durch Edman-Sequenzierung eines Proteins möglich ist, die unterschiedliche Methylierung des Argininrestes zu detektieren (Young und Grynspan, 1987). In Übereinstimmung damit konnte in dieser Arbeit die Modifizierung in diesem Proteinfragment durch Edman-Abbau eindeutig als symmetrische Dimethylierung der Argininreste ermittelt werden (Abbildung 17). Bei GRP ist bisher keine Modifizierung der Aminosäuren bekannt.

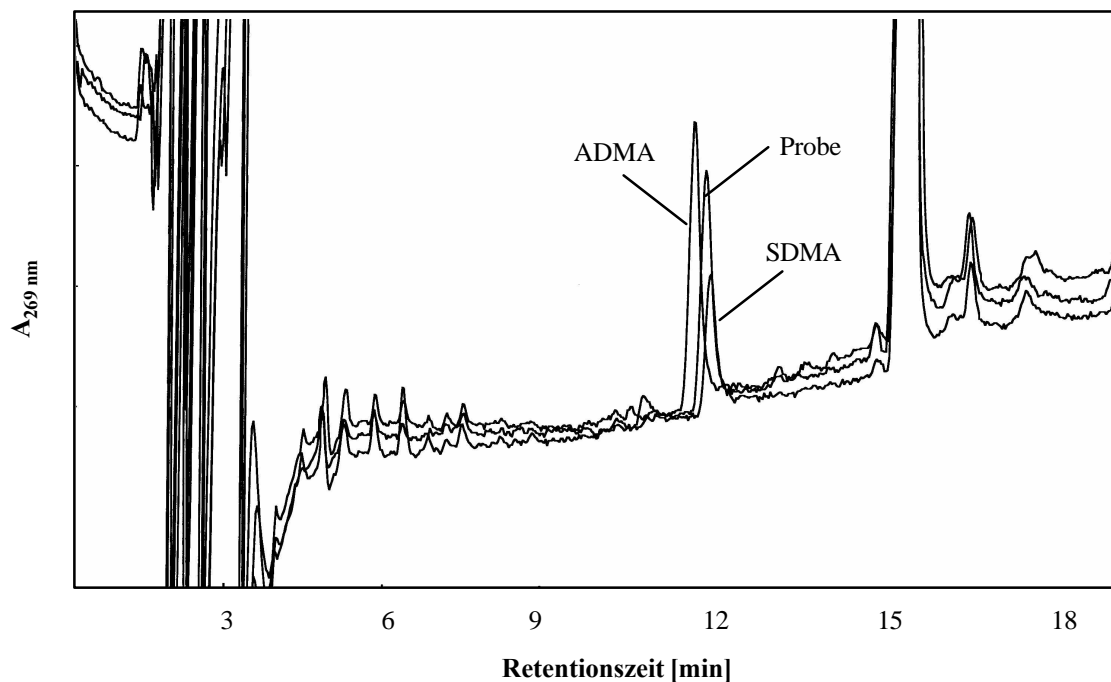


Abbildung 17: Edman-Sequenzierung von unsymmetrischem N^G, N^G -Dimethylarginin (ADMA), symmetrischem N^G, N^G -Dimethylarginin (SDMA) und des Argininrests der Probe.

Dimethylierungen an Argininresten wurden bereits bei mehreren Proteinen festgestellt, die mit der RNA interagieren (Najbauer *et al.*, 1993). Durch Modifikationen an Aminosäuren ist die Zelle auf einfache Art und Weise in der Lage, „neue“ Aminosäuren mit anderen Eigenschaften zu bilden. Durch die Einführung von Methylgruppen verstärkt sich die Hydrophobizität der Aminosäure entscheidend ($\text{Arg} \ll \text{MMA} \ll \text{ADMA} \ll \text{SDMA}$) (Young und Grynspan, 1987). Besonders bei Nucleolin und Fibrillarin konnten unsymmetrische Dimethylierungen der Argininreste (ADMA) bei verschiedenen Spezies festgestellt werden. Verantwortlich für diese Art der Dimethylierung ist die Protein-Arginin-N-Methyltransferase Typ I. Dieses Enzym ist ebenso für die N^G -Monomethylierung der Argininreste (MMA) verantwortlich (Gary und Clarke, 1998) und konnte erstmals 1967 aus Kalbsthymus isoliert werden (Paik und Kim, 1967). Typ II der Protein-Arginin-N-Methyltransferase katalysiert ebenfalls die Reaktion zur N^G -Monomethylierung und weiterhin zu symmetrischen N^G, N^G -Methylierung der Argininreste (SDMA). Eine besondere Bedeutung scheint dabei das Motiv FGGRGG in verschiedenen Variationen einzunehmen, wobei jedoch immer der Argininrest

von zwei Glycinresten eingeschlossen wird. Auch in dem isolierten Proteinfragment des bGRP ist der modifizierte Argininrest von zwei Glycinresten eingeschlossen.

Die Verteilung der Dimethylargininreste (DMA) in verschiedenen Rattenorganen wurde über eine Elementaranalyse verdeutlicht (Nakajima *et al.*, 1971). Dabei konnten besonders im Dünndarm, Milz, Lunge, Leber und Herz DMA's nachgewiesen werden. Allerdings lag der Anteil an unsymmetrischen DMA's fast um das 10 fache höher als der Anteil der symmetrisch dimethylierten Argininreste. Die N-Arginin-Methylierung in RNA-bindenden Proteinen mit GRGG-Motiv stellt die größte Gruppe der Methylierungen in Proteinen dar (Li *et al.*, 1998). Die N-Methylierung ist generell eine irreversible Modifizierung eines Proteins. Zwei Arginin-Methyltransferasen konnten bisher aus Kälberhirn und aus der Rattenleber isoliert werden (Ghosh *et al.*, 1988; Rawal *et al.*, 1994). Eine der Transferasen katalysiert die Methylierung vom myelin-basic-protein, welches einen hohen Anteil an symmetrischen DMA enthält (Baldwin *et al.*, 1971; Brostoff *et al.*, 1971).

Die funktionelle Rolle der Methylierung ist weitestgehend unklar. Es wird jedoch vermutet, daß sich Argininmethylierungen bei Proteinen an Positionen befinden, wo posttranslationale Modifikationen einen Einfluß auf die globale Struktur des Proteins nehmen können (Ridsdale *et al.*, 1997), wie es durch Elektronenmikroskopie für das β -Faltblatt des myelin-basic-protein gezeigt wurde. Weiterhin wird vermutet, daß es in Folge der steigenden Hydrophobizität durch die Methylierung der Argininreste zu einer Erhöhung der freien Energie durch bevorzugte ionische Interaktionen kommt (Young *et al.*, 1987). Es ist anzunehmen, daß Säuger-Protein-Arginin-Methyltransferasen eine entscheidende Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen spielen (Lin *et al.*, 1996). Außerdem wurde postuliert, daß asymmetrische Dimethylargininreste als endogene antiangiogene Faktoren wirken, da ADMA als endogener Inhibitor auf Stickstoffoxid-Synthasen wirkt (NOS), Enzyme, die durch angiogene Faktoren reguliert werden. Bei Personen mit Atherosklerose wurde ein erhöhter Plasmaspiegel von ADMA festgestellt (Jang *et al.*, 2000).

Ob die Methylierung von Argininresten Einfluß auf die antimikrobielle Aktivität von Proteinen oder Peptiden hat, ist bisher ungeklärt. Bisher konnten bei keinem antimikrobiell wirkenden Peptid eine solche Modifikation festgestellt werden. Eine Auswirkung auf die antibiotische Aktivität ist jedoch wahrscheinlich, da die Struktur des Peptids durch die

sterische Hinderung der Methylgruppen beeinflußt werden könnte. Weiterhin ist ein Anstieg der Hydrophobizität des Peptids anzunehmen, da die Argininreste durch die Dimethylierung wesentlich hydrophober werden. Der basische Charakter des Peptid könnte ebenfalls beeinflußt werden, da die sterischen Effekte zu einer Abschirmung der kationischen Ladung führen könnten. Eine chemische Synthese von Peptiden, die symmetrische Dimethylargininreste enthalten, ist bisher nicht gelungen.

3.4.3 Nucleolin (40-141 / 142 / 143)

3.4.3.1 Isolierung von bNucleolin-Fragmenten aus der Kalbsthymus-Peptidbank

Aus der Kalbsthymus-Peptidbank konnten drei antimikrobiell wirksame Fragmente des Kernproteins Nucleolin gereinigt werden. Die Dokumentation der Reinigung der Nucleolin-Fragmente (40-141 / 142 / 143) ist in Anhang 6.2.2 enthalten.

Die Peptide koeluierten bis zum 4. RP-Chromatographieschritt mit bGRP (95-133) und konnten erst durch Verwendung eines analytischen Kationenaustauschers abgetrennt werden. Eine weitere analytische RP-Chromatographie führte zur Reindarstellung dieser drei Nucleolin-Fragmente, die N-terminal identisch, jedoch am C-Terminus jeweils um eine Aminosäure verkürzt sind. Diese drei Peptide konnten durch keinen weiteren Chromatographieschritt getrennt werden, wie das LC-MS (Abbildung 18) von Fraktion 13 zeigt, da sowohl ihre Hydrophobizität, ionischer Charakter sowie Masse keine deutlichen Unterschiede aufweisen.

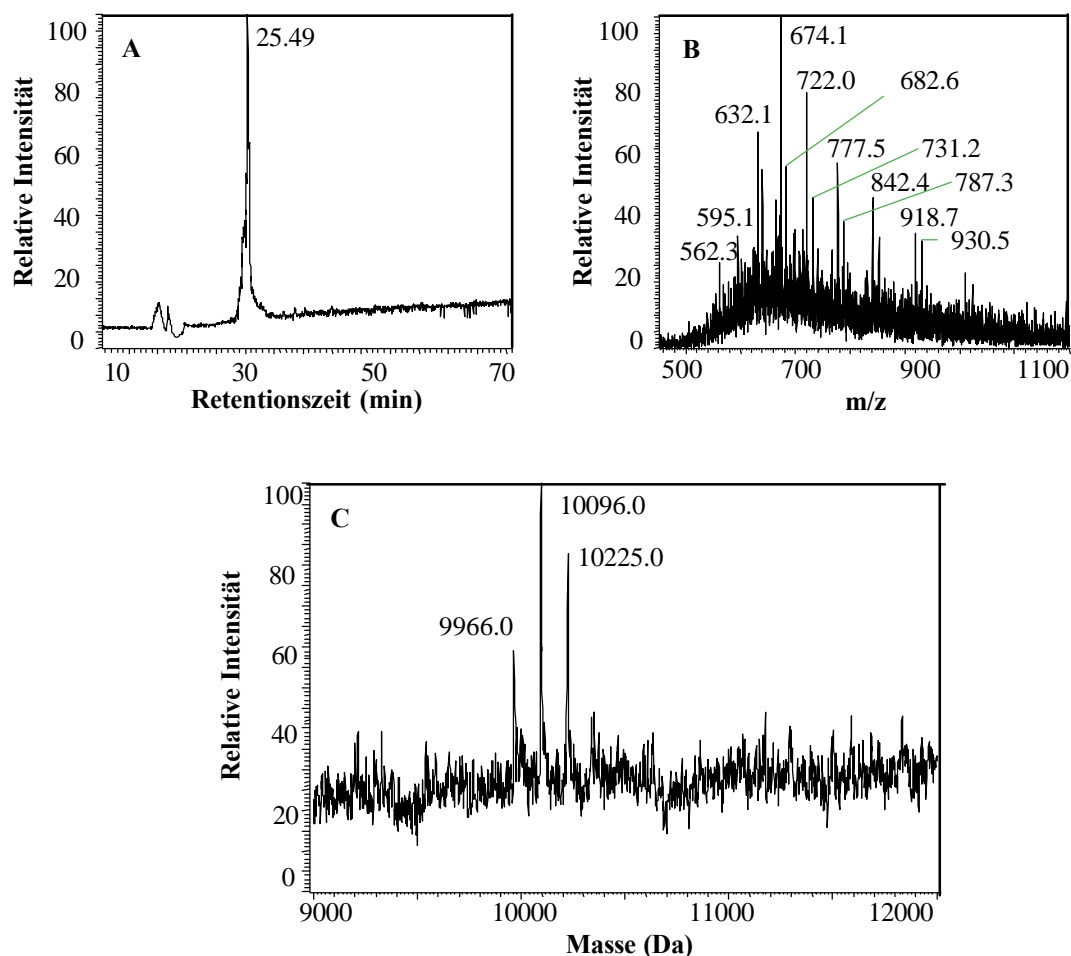


Abbildung 18: LC-MS der bovinen Nucleolin-Fragmente (40-141, 40-142 und 40-143). Die MS-Analyse resultiert in drei Massen, die sich jeweils um das Molekulargewicht der C-terminal ständigen Aminosäure unterscheiden. (A) Total-Ionenstrom-Chromatogramm.

RP-Chromatographie: Säule: YMC ODS-AQ, 1 x 100 mm, 3 μ m, Fließmittel A: 0,06 % TFA, Fließmittel B: 80 % ACN in 0,05 % TFA, Flußrate: 20 μ l/min, Gradient: 1 % B/min;

(B) ESI-MS der drei bNucleolin-Fragmente. Die detektierten Ionen entsprechen den ganzzahlig mehrfach geladenen Ionen der Massen 9969 / 10097 / 10226.; (C) Dekonvolution des ESI-MS. Die prozentuale Abweichung der berechneten Massen ist kleiner 0,05 %.

In Abbildung 18A ist das Total-Ionenstrom-Chromatogramm der LC-MS-Messung dargestellt, bei welchem die Einzelspektren über die Laufzeit aufsummiert werden. Abbildung 18B verdeutlicht die Einzelspektren des ESI-Massenspektrums, in welchem die ganzzahlig mehrfach geladenen Ionen des jeweiligen Analyten abgebildet sind, da das Massenspektrum nur in einem Messbereich bis $m/z = 2000$ detektiert. In Abbildung 18C ist das ESI-MS dekonvolviert und resultiert in drei berechneten Massen von 9969 Da, 10097 Da und 10226 Da, die den Massen der isolierten Peptide entsprechen. Der Masseunterschied von

128 Da und 129 Da deutet auf die Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure hin, welche mit der C-terminalen Aminosäuresequenz der Nucleolin-Fragmente korrelieren. Das Spektrum verdeutlicht weiterhin, daß die Probe keine weiteren Peptide enthält und diente somit gleichzeitig als Reinheitsnachweis.

Durch Edman-Sequenzierung wurden zunächst 32 Aminosäuren eindeutig identifiziert (Abbildung 19). Es konnte nur eine Aminosäurefolge für die drei Peptide detektiert werden, da beim Edman-Abbau vom N-Terminus sequenziert wird (Kapitel 2.3.3) und dieser bei den Peptiden identisch ist. Die Homologie zur humanen Sequenz beträgt 90 %. Da die Proteinsequenz von bovinem Nucleolin bisher nur teilweise bekannt ist (Sapp *et al.*, 1989), war es notwendig zur vollständigen Aufklärung der Aminosäuresequenz molekularbiologische Methoden zu verwenden.

```
hNucleolin (40-71)  SSGEEVVIPQKKGKKAATS AKKVVV SPTKKV
bNucleolin (40-71)  SSGEEVVIPQKKGKKAATTPAKKMVV SPTKKV
                    ***** * *** *****
```

Abbildung 19: Vergleich der Aminosäuresequenz der ersten 32 N-terminalen Aminosäuren des Rinder-Nucleolin-Fragments (bNucleolin), welche durch den Edman-Abbau analysiert wurden und humanem Nucleolin (hNucleolin). Die homologen Aminosäuren sind durch einen Stern gekennzeichnet.

3.4.3.2 Ermittlung der genomischen Sequenz des bovinen Nucleolin-Fragmentes

Die vollständige Aminosäuresequenz der isolierten Nucleolinfragmente sollte durch Translation der genomischen Sequenz ermittelt werden. Dazu war es erforderlich, die bovine cDNA-Sequenz, die für die Proteinfragmente bNucleolin (40-141, 40-142, 40-143) kodiert, aufzuklären. Als Ausgangspunkt für die Aufklärung dieser cDNA-Sequenz diente die bovine cDNA-Sequenz eines Klons (EST-Datenbank, Id.-Nr.: 5797020). Von dieser Sequenz wurden die antisense Primer Nucleo 2, Nucleo 3 und Nucleo 4 abgeleitet (Kapitel 2.4.1). Von der humanen Sequenz wurde ein degenerierter Primer (Nucleo 1, Kapitel 2.4.1) abgeleitet. In Abbildung 20 ist schematisch die Aufklärung der cDNA-Sequenz des bovinen Nucleolinfragmentes dargestellt.

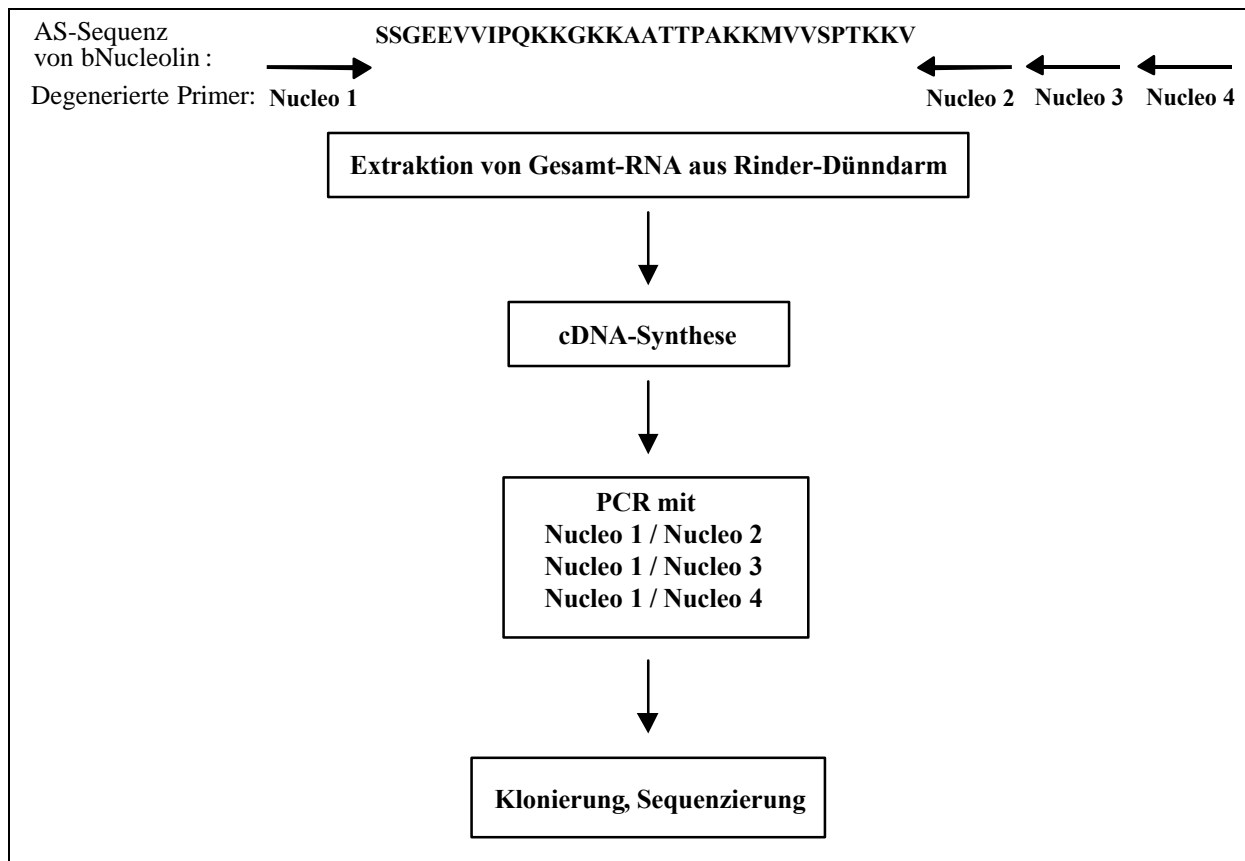


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Aufklärung der bovinen cDNA-Sequenz von bNucleolin (40-141, 40-142 und 40-143).

Zunächst wurde bovine Gesamt-RNA aus Rinder-Dünndarm isoliert (Kapitel 2.4.2) und eine Erststrangsynthese durchgeführt (Kapitel 2.4.3). Die Synthese wurde durch eine PCR mit β -Tubulin-Primern (Tabelle 7) überprüft. Es folgte eine PCR mit drei Primerkombinationen (Tabelle 7), wobei jeweils der degenerierte sense-Primer (Nucleo 1) mit den drei antisense-Primern (Nucleo 2, Nucleo 3 und Nucleo 4) kombiniert wurde. Die verwendeten PCR-Bedingungen und Temperaturprofile sind nachfolgend aufgeführt.

	PCR (β -Tub1 / β -Tub 2)		PCR (Nucleo 1 / Nucleo 2); (Nucleo 1 / Nucleo 3); (Nucleo 1 / Nucleo 4)	
1. Erst-Denaturierung der DNA	94°C	3 min	97°C	3 min
2. Denaturierung	98°C	0 sek	98°C	0 sek
3. Primeranlagerung	48°C	30 sek	59°C	30 sek
4. Elongation	72°C	1 min	72°C	30 sek
5. End-Elongation	72°C	5 min	72°C	7 min
6. Kühlen	4°C	∞ min	4°C	∞ min

Es konnten drei PCR-Fragmente in der erwarteten Größenordnung, die von der humanen Sequenz abgeleitet wurde, detektiert werden (Abbildung 21). Die abgeleiteten Primer generieren Amplicons der erwarteten Größe von Nucleo 1 / Nucleo 2 ca. 1050, Nucleo 1 / Nucleo 3 ca. 1400 und Nucleo 1 / Nucleo 4 ca. 1500 Basenpaaren. Es sind deutlich die unterschiedlich großen Amplifikationsprodukte erkennbar, die den Primerkombinationen entsprechen. Das Amplifikationsprodukt der ersten Primerkombination (1/2) wurde zum Klonieren ausgewählt. Die DNA wurde aus dem Gel extrahiert und nach Ligation mit dem pGEM-T - Vektor erfolgte die Transformation der DNA in superkompetente *E. coli*-Zellen (Kapitel 2.4.6.4). Nach Kultivierung der Klone wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt (Kapitel 2.4.8).

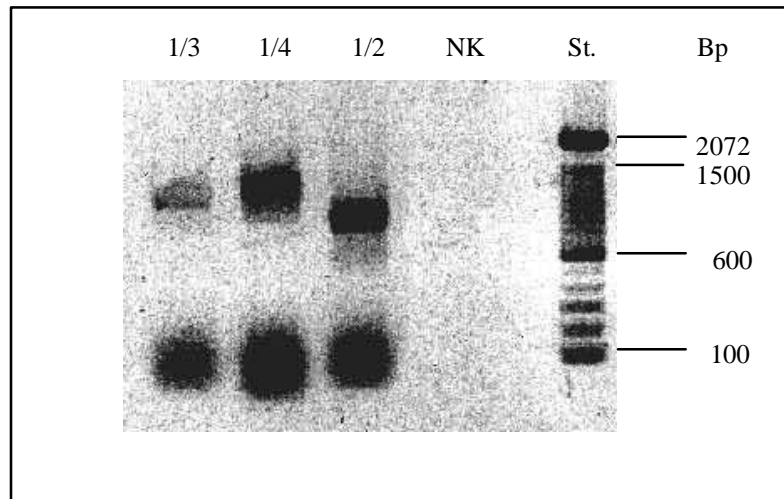


Abbildung 21: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Amplifikationsprodukten der bovinen Nucleolin-Fragmente mit den Primerkombinationen Nucleo 1 / Nucleo 2 (1/2), Nucleo 1 / Nucleo 3 (1/3) und Nucleo 1 / Nucleo 4 (1/4). Als Größenstandard (St.) wurde 100 Bp – Leiter verwendet. Es wurden 10 μ l des jeweiligen PCR-Ansatzes auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. NK bezeichnet die Negativkontrolle.

Es folgte die Sequenzierung von 688 Basen des klonierten Fragmentes (Kapitel 2.4.9). Die cDNA-Sequenz der isolierten Fragmente ist vollständig enthalten. Auf diese Art und Weise konnte ein Teil der cDNA-Sequenz für bovines Nucleolin aufgeklärt sowie die Proteinsequenz des gesuchten Fragments abgeleitet werden (Abbildung 22).

1	cggccgcct ggccgcggg	<div style="text-align: center;"> N Q G D P K K M A P P ───────────▶ </div>			gctcctccc
55	P K E V E E D S E D E E M S E D E D	ccaaaggag gtagaagaa gatagtгаа gatgaggaa atgtcagaa gatgaagac			
	Peptidsequenz				
99	D E S S G E E V V I P Q K K G K K A	gatgagagc agtggagaa gaggttggt atccctcag aaaaaaggc aagaaggct			
143	A T T P A K K M V V S P T K K V A V	gccacaact ccagcaag aagatggtg gtttcccca acaaaaaag gttgcagtt			
197	A T P A K K A V V T P G K K A A A M	gccacacca gcaagaaa gcagttgtc acccctggc aaaaaggca gcagctatg			
251	P A K K T V T P A K A V V T P G K K	ccagccaag aagacagtt acacctgcc aaagcagtg gttacacct ggcaaaaag			
305	G A T P G K A V V A T S G K K G A A	ggagccacc ccaggcaaa gcagtggtg gcaacctct ggtaagaag ggagcagcc			
359	T P G K G A K N G K N A K K E D S D	accccaggc aagggagca aagaacggc aagaatgcc aagaaggaa gacagtgat			
413	E E D E D D S E E E D D D D E E E D	gaagaagat gaagatgac agtgaagag gaagacgat gatgatgaa gaggaggat			
467	E P A V R K A A A A F G A A P A T D	gagccagca gtgaggaag gcagctgct gcttttggt gctgctcct gccacagat			
521	D E D D E D D D D D E E E E E D	gatgaggat gacgaggat gacgatgat gacgacgat gaggaggag gaggaggat			
575	E E D E E D E D D S E E E P M E I V	gaggaggat gaggaggac gaagatgac tctgaagaa gaacctatg gagattgta			
629	P A K G K K A P V K A V P V K A	ccagccaaa ggaaagaaa gctccagta aaagctggt cctgtgaag gctaa			

Abbildung 22: Die vollständige cDNA- und Proteinsequenz der bovinen Nucleolin-Fragmente (40-141, 40-142 und 40-143). Der Pfeil markiert die Sequenzregion, in welcher der degenerierte Primer Nucleo 1 eingesetzt wurde. Die gesuchte Sequenz ist durch die Linie markiert.

3.4.3.3 Vergleich von bNucleolin (40-141 / 40-142 / 40-143)

Tabelle 9 zeigt das Molekulargewicht, die Nettoladung sowie den isoelektrischen Punkt der drei antimikrobiell wirkenden Proteinfragmente von Nucleolin. Die Peptide sind entsprechend ihrer Massendifferenz C-terminal jeweils um eine Aminosäure verlängert. Auffällig sind die große Anzahl an basischen Lysinresten, die ca. $\frac{1}{4}$ des gesamten Proteinfragmentes entsprechen. Durch die polaren Seitenketten der Aminosäuren zeigen die Peptide ein hydrophiles Elutionsverhalten und eluieren bei 24 % ACN von analytischem RP-Material.

Die Nucleolinfragmente besitzen eine positive Nettoladung von + 22 bzw. + 23, was den stark kationischen Charakter des Peptids verdeutlicht. Die theoretische Masse stimmt mit der experimentell ermittelten Masse überein, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Peptide in diesem Bereich keine modifizierten Aminosäuren enthalten.

Tabelle 9: Übersicht der gereinigten antimikrobiellen Nucleolinfragmente.

Proteinfragment	AS	MW (Da)	pI	Nettoladung
bNucleolin (40-141)	101	9969	11,8	+ 22
bNucleolin (40-142)	102	10097	11,8	+ 23
bNucleolin (40-143)	103	10226	11,6	+ 22

In Abbildung 23 ist ein Alignment der bovinen Nucleolinsequenz (40-143) mit der humanen Sequenz dargestellt. Die Identität zur humanen Sequenz beträgt bei diesem Fragment 90 %.

Nucleolin ist ein 110 kDa großes Kernprotein, welches im Nucleolus lokalisiert ist (Sapp *et al.*, 1986). In exponentiell wachsenden eukaryotischen Zellen konnte es mit einem Anteil von 5 % aller Kernproteine detektiert werden. Es wird vermutet, daß es die Chromatinkondensation durch seine Bindung an das Histon H1 induziert und eine entscheidende Rolle bei der Transkription der pre-rRNA und der Ribosomenformation spielt (Lapeyre *et al.*, 1987). Das Protein ist in verschiedene strukturelle Regionen unterteilt, die mehrere funktionelle Domänen bilden (Srivastava *et al.*, 1989). Nucleolin ist durch eine speziesübergreifende, stark konservierte basische „Tandem – Repeat – Domäne“ von Position 52 bis 134 gekennzeichnet. Diese 8 x 8 Aminosäure-Wiederholungen der Form

X-T-P-X-K-K-X-X sind auch in den isolierten Peptiden nachzuweisen; allerdings sind in diesen Regionen häufig einzelne Aminosäureaustausche vorhanden (Abbildung 23). Fragmente des Proteins, die diese Region enthalten, konnten im Nucleolus und Cytoplasma lokalisiert werden und könnten entscheidend für den Transport von ribosomalen Komponenten vom Cytoplasma in den Nucleolus verantwortlich sein (Kalderon *et al.*, 1984; Slomi *et al.*, 1988). Durch NMR-Spektroskopie konnte die α -helikale, amphipathische Struktur des Motivs nachgewiesen werden, bei welcher die Threonin- und Lysinreste auf einer Seite der Helix angeordnet sind, während sich die nichtpolaren Aminosäuren Alanin, Prolin und Valin auf der anderen Seite der Helix befinden (Xu *et al.*, 1995). Dieser amphipathische, α -helikale Charakter der Struktur sowie der starke Überschuß an positiver Nettoladung von + 22 bzw. + 23 könnte die Grundlage für die antimikrobielle Wirksamkeit der Fragmente sein (vgl. Kapitel 1.2.1).

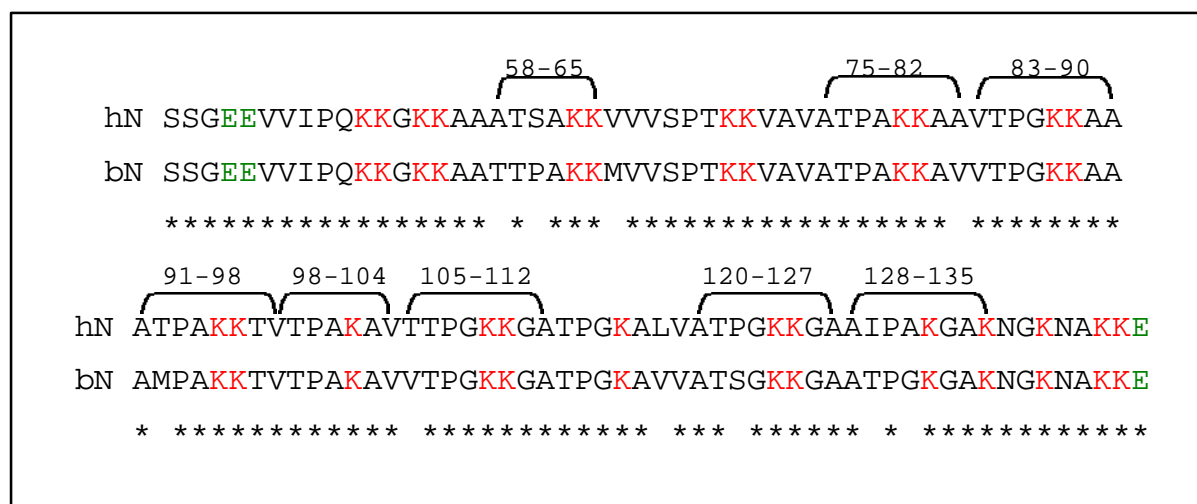


Abbildung 23: Aminosäuresequenzvergleich zwischen humanem Nucleolin (40-143) (hN) und bovinem Nucleolin (40-143) (bN). Die identischen Aminosäuren sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die Positionen der „Repetitive Region“ im Protein ist angegeben und durch Klammern gekennzeichnet. Die kationischen Aminosäuren sind rot, die anionischen Aminosäuren grün hervorgehoben.

Von Position 143 bis 272 schließen sich drei saure Asparaginsäure–Glutaminsäure–reiche Domänen an, die bei der Bindung des Proteins an Histone involviert sind. Dieser Domäne schließen sich ab Position 308 acht RNA –Bindungsdomänen an, die mit den „ribonucleoprotein particles“ (RNP) 1 und 2 interagieren. Das C-terminale Ende des Proteins

(Position 648-703) ist durch eine konservierte glycinreiche Domäne gekennzeichnet, die an Protein / Protein- bzw. Protein / Nucleinsäureinteraktionen beteiligt ist. Weiterhin sind mehrere konservierte Phosphorylierungsstellen an den Positionen 28, 34, 144, 498, 580, 584 und 619 im Protein bekannt, die speziesspezifisch in die Kontrolle der rRNA-Transkription involviert sind (Srivastava *et al.*, 1989).

Das Protein zeigt nur geringe Proteasestabilität. Es konnten Proteolyseprodukte unterschiedlicher Größe mit spezifischen Antisera aus Zellextrakten nachgewiesen werden, die als Resultat einer Thiolproteasehydrolyse entstanden (Bugler *et al.*, 1982). Trypsin spaltet das Protein in zwei stabile Fragmente, die beide aus Kalbsthymus isoliert werden konnten (Sapp *et al.*, 1985). Das entstehende C-terminale 48 kDa große Fragment weist eine geringere Bindungsaffinität zur DNA als das gesamte Protein auf. Das N-terminale ca. 61 kDa große Fragment ist dagegen weniger stabil gegen Proteasen. Ihm ist eine Rolle bei der Protein / Protein-Interaktion zuzuordnen (Sapp *et al.*, 1989). Dies zeigt, daß durch Einwirkung spezifischer Proteasen Fragmente von Proteinen gebildet werden können, die unterschiedliche Funktionen innerhalb des Stoffwechsels der Zelle, der Proteinsynthese oder auch, wie in diesem Fall eine Rolle als antimikrobielles Peptid beim Angriff von Mikroorganismen leisten können. Auffällig ist, daß die isolierten Proteinfragmente vor der Phosphorylierungsstelle 144 am Serin geschnitten sind, was auf eine spezifische Protease hindeutet. Die unterschiedliche Lokalisation der einzelnen Fragmente des Proteins weist auf eine unterschiedliche Prozessierung der Domänen hin. Dadurch könnten die isolierten Peptide bei einer von Erregern entstehenden Entzündung am Entzündungsherd separat prozessiert und durch induzierte Apoptose der Zelle freigesetzt werden.

2000 konnten erstmals Antikörper gegen Nucleolin im Serum von Patienten mit Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), einer Autoimmunerkrankung nachgewiesen werden (Hirata *et al.*, 2000). Eine virale Infektion spielt unter anderem als Auslöser für diese Krankheit eine entscheidende Rolle. Auffällig ist, daß eine wesentlich größere Konzentration der Antikörper bei Kindern als bei Erwachsenen mit dieser Erkrankung festgestellt wurde. Dies könnte mit der Entwicklung des Thymus in Zusammenhang stehen, der im Kindesalter voll ausgebildet ist, sich aber bei Jugendlichen bereits zurückbildet. Ein Hinweis darauf könnte auch die Isolierung von Proteinfragmenten von Nucleolin aus diesem Gewebe sein.

3.4.4 Histon H1.2 (83-139)

Mit Hilfe des Trennverfahrens für die Isolierung antimikrobieller Peptide aus der Kalbsthymus-Peptidbank konnte ein antimikrobiell wirksames Fragment des bovinen Histons H1.2, im folgenden als bH1.2 (83-139) bezeichnet, gereinigt werden. bH1.2 (83-139) besteht aus 56 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 5648 Da. Auffällig ist die Aminosäurezusammensetzung des Peptides. Mit 17 Lysinresten (30 mol%) und einem pI von 11,7 ist bH1.2 den basischen Peptiden zuzuordnen. Die Nettoladung des Peptids ist + 16, was seinen stark kationischen Charakter unterstreicht. Der 6. Chromatographieschritt, bei welchem das Peptid bei 23 % ACN von einer analytischen RP-Säule eluiert, führte zu seiner Reindarstellung. Die Reinigung des Peptids ist in Anhang 6.2.4 dargestellt.

Ein Vergleich der durch Edman-Abbau identifizierte Sequenz mit bovinen Sequenzen der EST-Datenbank (EST-Id.-Nr. 6350927) führte zu einer eindeutigen Bestimmung des Peptids als Proteinfragment des bovinen Histons H1.2. Die größte Homologie konnte dabei mit der humanen Sequenz für das Histon H1B festgestellt werden. Sie beträgt 93 % (Abbildung 24).

```

hH1B  LKSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAASGEAKPKAKKAGAAKAKKPAGAAKKPKK
bH1   LKSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAATGEAKPKGKKAGAAKPKKAAGAAKKPKK
*****

```

Abbildung 24: Aminosäuresequenzvergleich zwischen humanem Histon H1B (83-139) (hH1B) und bovinem Histon 1.2 (83-139) (bH1). Die identischen Aminosäuren sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die kationischen Aminosäuren sind rot, die anionische Aminosäure ist grün hervorgehoben.

Histone sind die am häufigsten im Kern vorkommenden Proteine, die in einer außerordentlich hochkonservierten Form in verschiedenen Zelltypen und Spezies vorliegen. Sie unterteilen sich in fünf Klassen, die als Histon H1 (H1), Histon H2A (H2A), Histon H2B (H2B), Histon H3 (H3) und Histon H4 (H4) bezeichnet und alle den basischen Proteinen zugeordnet werden. Die DNA wickelt sich innerhalb des Kerns $1\frac{3}{4}$ mal um ein Histon-Oktamer, welches sich aus je zwei Molekülen H2A, H2B, H3 und H4 zusammensetzt und bildet das Chromatin

(Luger und Richmond, 1998; Kasinsky *et al.*, 2001). Das Histon H1 nimmt eine Sonderstellung ein. Es ist einerseits für die Kompaktierung des Chromatins von der Perlenschnur zur nächst höheren Kondensationsstufe verantwortlich, andererseits werden H1 regulatorische Effekte, wie eine direkte Rolle bei der Genregulation zugesprochen. Es zeigt eine größere Vielfalt in seiner evolutionären Variabilität und die meisten Organismen exprimieren verschiedene H1-Varianten in verschiedenen Zelltypen und Entwicklungsstadien (Thomas, 1999; Widom, 1998; Wolffe, 1997).

Die antimikrobielle Wirkung von den Histonen H1 und H2A bzw. H2B ist schon seit längerer Zeit bekannt. Bereits 1942 konnte die antimikrobielle Wirkung von Histonen, welche aus Kalbsthymus isoliert wurden, nachgewiesen werden (Miller, *et al.*, 1942). Histone konnten aus verschiedenen Zellen unterschiedlicher Gewebe isoliert werden, z.B. aus einer murinen Makrophagenzelllinie (Hiemstra *et al.*, 1993) und aus den Epithelzellen des humanen Gastrointestinaltraktes (Rose *et al.*, 1998). Ebenso konnten antimikrobielle Histonfragmente des Histons H2A aus der Haut des Katzenhais *Parasilurus asotus* (Park *et al.*, 1998, Robinette *et al.*, 1998) und aus dem Magen der asiatischen Kröte *Bufo Bufo gagarizans* (Kim *et al.*, 1996, Park *et al.*, 2000, Park *et al.*, 1996) gereinigt werden.

Die Expression der Histone erfolgt im Cytoplasma. Da in der S-Phase des Zellzyklus ein ca. 30 – 50 facher Überschuss an Histonen produziert wird (Park *et al.*, 1996), den die Zelle aufgrund des hohen Energieaufwands nicht in den Zellkern transportieren kann, besteht die Möglichkeit der Freisetzung der Histone bei induzierter Apoptose der Zelle (Rose *et al.*, 1998; Kratzmeier *et al.*, 1999). Anschließend könnte die spezifische proteolytische Spaltung zu antimikrobiell wirksamen Fragmenten erfolgen (Park *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996). Dies wäre ein wichtiger Schutzmechanismus innerhalb des angeborenen Immunsystems. Für eine Zirkulation der Peptide spricht allerdings auch der Nachweis von Antikörpern gegen Fragmente der Histone H2B und H3 bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes (SLE) im Serum (Williams *et al.*, 2001). Bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen scheinen zirkulierende Kernproteine, wie Histone und Nucleolin und ihre Fragmente eine entscheidende Rolle für eine abnormale Immunantwort zu spielen.

Es konnte nachgewiesen werden, daß der Chromatin-Komplex selbst keine antimikrobielle Wirkung besitzt. Allerdings erfolgt bei Zugabe von DNase die Freisetzung der bakteriziden

Histone. Anschließend können diese Moleküle durch die Kernmembran diffundieren und so ins Cytoplasma gelangen (Breeuwer und Goldfarb, 1990). Die DNase wird von verschiedenen pathogenen Bakterien freigesetzt oder befindet sich im Lysosom von Leukozyten (Miller und Watson, 1969), so daß nach erfolgter Lyse der Zellen die antimikrobiellen Histone bzw. ihre Fragmente unmittelbar an den Ort der Entzündung gelangen können.

Die antimikrobielle Wirkungsweise von Histonen und ihren Fragmenten wurde mehrfach untersucht. Durch seine helikale Struktur (Wolffe, 1997) ist es dem Protein und seinen Fragmenten möglich, wie andere antimikrobielle Peptide eine Interaktion mit der äußeren Zellmembran der Bakterien einzugehen (vgl. Kapitel 1.2.1). Weiterhin konnte ihre Bindung an die Phospholipidmembran der Bakterien nachgewiesen werden (Park *et al.*, 1996). Folglich stören Histone die Integrität der äußeren Membran und erhöhen gleichzeitig die Durchlässigkeit der inneren Membran für intrazelluläre und extrazelluläre Stoffe. Allerdings wurde auch gezeigt, daß Histone nicht nur die Zellmembran der Bakterien zerstören, sondern auch ihre Zellkernstruktur. Die Kerne reduzieren dadurch ihre Größe oder lösen sich vollständig auf (Macmillan und Hibbitt, 1969).

Die Histonfragmente können auch durch die bakterielle Zellmembran in das Cytoplasma der Bakterienzelle penetrieren und dort akkumuliert werden. Es kommt aufgrund der hohen Bindungsaffinität von Histonen zur DNA zu einer Bindung der Fragmente an intrazelluläre Nucleinsäuren und dadurch zu einer Interaktion mit der DNA bzw. RNA in Bakterienzellen (Park *et al.*, 2000). Dadurch erscheint die Beeinflussung der Proteinsynthese nicht ausgeschlossen (Hibbitt und Benians, 1973). Da Prokaryonten keine Histone zum Schutz ihrer DNA besitzen (Vogel und Angermann, 1992), würde eine Bindung von Histonen an die DNA, deren DNA-Struktur sehr stark verändern. Dies würde einerseits zur Blockierung der Transkription und somit zum Zelltod führen. Andererseits treten durch kovalente Vernetzungen starke Konformationsspannungen auf, die einen Bruch der DNA induzieren können. Diese massive Fragmentierung würde den Tod der Zelle zu Folge haben (Gräfe, 1992). Histone besitzen die Fähigkeit die bakterielle exogene und intrazelluläre RNA zu depolymerisieren (Zhdan-Pushkina und Dronova, 1976). Es ist denkbar, daß auch die gereinigten Histonfragmente auf diese Art und Weise den Stoffwechsel der Bakterienzelle inhibieren können.

3.4.5 Nuclear Mitotic Apparatus Protein (2052-2103)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem beschriebenen Trennverfahren (Kapitel 3.3) ein weiteres antimikrobiell wirksames Proteinfoagment aus der Kalbsthymus-Peptidbank gereinigt. Es handelt sich dabei um das C-terminale Ende des Proteins Nuclear Mitotic Apparatus Protein, im weiteren Verlauf der Arbeit als bNuMA (2052-2103) bezeichnet. bNuMA (2052-2103) besteht aus 52 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 5085 Da. Auffällig ist die große Anzahl an basischen Aminosäuren, die mit 7 Lysinresten, 5 Argininresten und einem Histidinrest insgesamt 23 % der gesamten Aminosäuresequenz des Peptids entsprechen. Mit einem pI von 13,1 und einer Nettoladung von + 13 ist bNuMA den stark basischen Peptiden zuzuordnen. Der 6. Chromatographieschritt, bei welchem das Peptid bei 28 % ACN von einer analytischen RP-Säule eluiert, führte zur Reindarstellung. Die Reinigung des Peptids ist in Anhang 6.2.3 dargestellt.

Mit Hilfe des Edman-Abbaus konnten zunächst N-terminal 31 Aminosäuren des Peptids eindeutig identifiziert werden (Abbildung 27). Da die bovine Aminosäuresequenz des Proteins nicht bekannt ist, wurde eine Identifizierung auf cDNA-Ebene durchgeführt. Dabei wurde die genomische Sequenz der Klone unter Anwendung des Computerprogramms SequencerTM in die Aminosäuresequenz translatiert. In der Nucleotidsequenz des Klons 22 (EST-Id-Nr.: 3744967) ließ sich die Startsequenz des isolierten Peptids lokalisieren. Die Plasmid-DNA wurde aus diesem Klon mit Hilfe einer Plasmidschnellpräparation (Kapitel 2.4.7) isoliert und in Wasser aufgenommen. Zur Überprüfung der Größe des Amplifikationsproduktes erfolgte die Restriktionshydrolyse der Plasmid-DNA (Kapitel 2.4.8). Bei rekombinanten Klonen wird dabei das insertierte Fragment aus dem Vektor herausgeschnitten und kann in einem Agarosegel als Bande in einer Größe von ca. 700 Bp identifiziert werden. Die elektrophoretische Auftrennung der Ansätze ist in einem 1,8 %igem Agarosegel in Abbildung 25 dargestellt. Die von der humanen Sequenz abgeleitete Größe des nichthydrolysierten Plasmids beträgt ca. 3500 Basenpaaren.

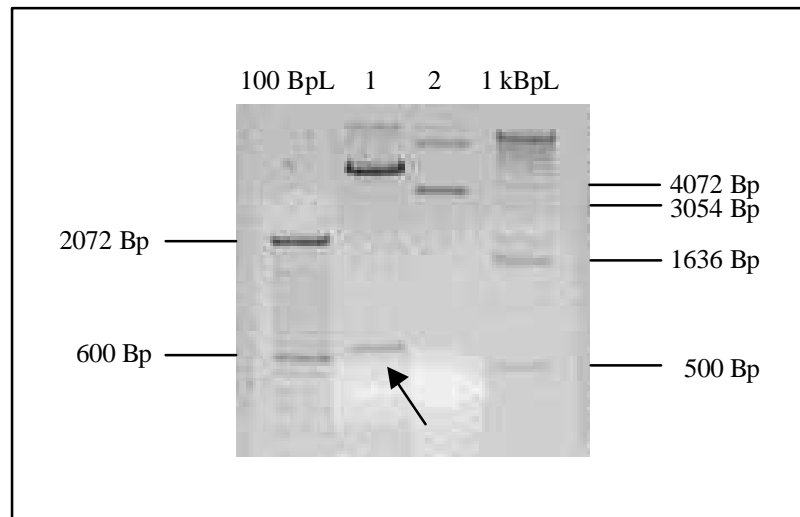


Abbildung 25: Elektrophoretische Auftrennung hydrolysierter (1) und nichthydrolysierter (2) Plasmid-DNA des bNuMA-Fragments. Der Pfeil markiert das bNuMA-cDNA-Fragment. Es wurden 10 μ l des jeweiligen Reaktionsansatzes in einem 1,8 %igem Agarosegel aufgetragen. Größenstandard: 100 Bp-Leiter (100 BpL) bzw. 1 kBp-Leiter (1 kBpL).

Es konnten 722 Nukleinsäuren der cDNA sequenziert werden. Nach erfolgter Sequenzierung wurde die Nukleinsäuresequenz in die Aminosäuresequenz mit Hilfe des Computerprogramms SequencerTM übersetzt (Abbildung 26). Die Sequenz für das Protein wird durch ein Stopcodon an Position 524 unterbrochen. Auf Grund der Homologie der zehn C-terminalen Aminosäuren des humanen Proteins mit dem bovinem NuMA kann davon ausgegangen werden, daß dieses Stopcodon das Ende der Proteinsequenz darstellt. Die theoretisch ermittelte Masse von 5085 Da für das isolierte Proteinfragment wurde mit der experimentell ermittelten Masse verglichen. Die Übereinstimmung führte zu dem Schluß, daß das Peptid ohne Modifikationen vorliegt und die ermittelte Sequenz der bovinen Sequenz des Proteinfragmentes entspricht.

	K	S	R	L	V	P	V	R	N	S	R	D	I	V	D	P	R	V
1	aaaagcagg	ctggtaccg	gtccggaat	tcccgggat	atcgtcgac	ccacgcgtc												
	R	A	G	I	T	T	R	Q	Q	R	K	R	V	S	S	E	T	H
61	cgcgctggc	attaccaca	cggcagcag	cgcaagcgg	gtttcctca	gagaccac												
	Q	G	P	G	T	P	E	S	K	K	A	T	T	C	F	P	R	P
121	cagggcccc	ggcacaccc	gagtcaaag	aaggccacc	acatgtttc	ccgcgcccc												
	M	T	P	R	D	R	H	E	G	R	R	H	S	S	T	E	A	Q
181	atgaccccc	cgggaccga	cacgaaggg	cgcagacac	agcagtacc	gaggcccag												
	K	K	A	V	P	A	V	K	Q	A	D	R	R	Q	S	M	A	F
241	aagaaggca	gttccagct	gttaaacag	gctgaccgc	cgccagtct	atggccttc												
	S	I	L	N	T	P	K	K	L	G	N	S	L	L	R	K	A	A
301	agcatcctc	aacacaccc	aagaagctt	ggaaacagc	cttctgcgg	aaggcagcc												
	S	K	K	A	P	S	K	A	S	P	N	P	R	S	G	T	R	R
361	tccaagaaa	gccccctcc	aaagcctca	cccaacccc	cgcagtggg	accgcgccc												
	S	P	R	I	A	T	T	A	A	S	A	A	T	A	A	A	S	A
421	tctccgcgc	atcgccacc	actgcagcc	agcgtgcc	actgctgct	gccagcgcc												
	A	A	T	T	P	R	A	K	G	K	A	K	H	Stop				
481	gctgccacc	accccccg	gcaaagggc	aaggcgaag	cactgaaga	gccagtgcc												
541	agtgagtgg	ccccgccc	tgttcctga	tgctgccct	cgctggcc	cttctcctt												
601	ctgtccctt	tcagtgcct	tctctcagc	tcccaggcc	aacagtggc	ccaaatcct												
661	cgagacagt	gagcctgc	ccacaccct	ggccgggac	ccggaccat	ccccaggtg												
721	aa																	

Abbildung 26: Die cDNA- und translatierte Proteinsequenz von bNuMA (2052-2103). Die hervorgehobene Sequenz entspricht dem isolierten Proteinfragment.

Der Vergleich der bovinen Sequenz mit der humanen Sequenz des Proteinfragmentes ließ eine Identität von 83 % feststellen (Abbildung 27). Der Sequenzvergleich verdeutlicht, daß das bovine Kernproteinfragment zwei Aminosäuren mehr enthält. Dabei handelt es sich um einen Alaninrest und einen Tyrosinrest. Die Aminosäuren haben allerdings keinen Einfluß auf die Gesamtnettoladung des Peptids und sollten auch keine weiteren Auswirkungen auf seine antimikrobielle Wirksamkeit haben.

```

hNuMA,  RGASKKALSKASPNT*RS*GT*RRSP*RIATTTASAATAAAIGA--TP*RAK*GKAKH
bNuMA,  KAASKKAPSKASP*N*PR*SGT*RRSP*RIATTAASAATAAASAAATTP*RAK*GKAKH
          *****

```

Abbildung 27: Vergleich zwischen humanem NuMA (2052-2101) (hNuMA) und bovinem NuMA (2052-2103) (bNuMA). Die identischen Aminosäuren sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die hervorgehobene Aminosäuresequenz konnte durch Edman-Abbau identifiziert werden. Die kationischen Aminosäuren sind rot hervorgehoben.

Nuclear Mitotic Apparatus Protein ist ein 236 kDa großes Protein, welches unmittelbaren Einfluß auf den Zellzyklus nimmt und während der Mitose an der Segregation der Chromosomen beteiligt ist. Das Protein ist im Spindelapparat lokalisiert und konnte während der Mitose sowohl im Cytoplasma als auch im Kern nachgewiesen werden (Sparks *et al.*, 1993; Zeng, 2000). Im Cytoplasma konnte allerdings auch eine partielle Degradation des Proteins festgestellt werden (Taimen *et al.*, 2000). Durch Apoptose der Zellen könnte es zu einer Freisetzung dieses Proteinfragmentes kommen und nach Proteolyse das isolierte Fragment entstehen. In Osteoblasten bildet NuMA mit anderen Kernproteinen während ihrer Entwicklung ein Kerngerüst aus. Dabei ist die quantitative Zusammensetzung dieser Kernproteine von entscheidender Bedeutung. Während der Knochenzellentwicklung werden die Kernproteine in unterschiedlicher Menge exprimiert und nehmen so Einfluß auf die Proliferation der Zellen (Feister *et al.*, 2000). NuMA ist in drei strukturelle Domänen unterteilt, wobei das prolinreiche Hauptsegment von ca. 1500 Aminosäuren eine α -helikale Struktur besitzt und von zwei globularen punktierten Regionen eingeschlossen ist, die den N- und C-Terminus des Proteins bilden. Die Hauptdomäne agiert mit den Zellkomponenten während der Mitose, in dem Oligomere in einer „coiled-coil-Konformation“ gebildet werden (Compton *et al.*, 1992). Über Sekundärstruktur und Funktion der globularen Domänen, welche auch das isolierte Fragment beinhalten, ist nichts bekannt.

Bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen konnten Antikörper gegen das NuMA-Protein nachgewiesen werden, was für eine erhöhte Prozessierung und Zirkulation des Proteins spricht (Price *et al.*, 1984). Dabei könnte durch Proteolyse das antimikrobielle Fragment entstehen, welches isoliert wurde.

3.4.6 Zusammenfassende Betrachtung

In dieser Arbeit wurden Peptide aus Kalbsthymus gereinigt, die das Wachstum von Mikroorganismen hemmen. Die isolierten Peptide wurden als Fragmente von Proteinen, die im Zellkern oder Cytoplasma lokalisiert sind, identifiziert. GAPDH, Nucleolin sowie NuMA stellen Proteine dar, die mehrere Funktionen im Körper übernehmen (Habenicht, 1997; Srivastava *et al.*, 1989; Feister *et al.*, 2000). Mit Ausnahme von bH1.2 konnte bislang bei keinem der Proteine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings zeigten Liepke *et al.* (2001) und Zucht *et al.* (1995), daß aus antimikrobiell inaktiven Proteinen, wie z.B. Casein, durch Proteolyse Fragmente entstehen können, die einen wachstumshemmenden Einfluß auf Mikroorganismen haben. Enzymatische Hydrolyse könnte auch die Ursache für die Entstehung der hier isolierten Proteinfragmente sein.

Die hohe Homologie von über 80 % der bovinen Peptidsequenzen zu den humanen Sequenzen der Proteinfragmente läßt vermuten, daß auch im Menschen ähnlich antimikrobiell wirksame Proteinfragmente gebildet werden. Der Austausch der Aminosäuren betrifft bei keinem Proteinfragment die kationischen Aminosäuren (außer bei GAPDH (104-122)), was diese Vermutung verstärken könnte. Weiterhin spricht der Nachweis von Antikörpern gegen die Proteine oder Fragmente von NuMA, Nucleolin und H1.2 im Serum Autoimmunerkrankter dafür, daß diese zirkulieren und somit einen wesentlichen Bestandteil der Immunantwort des Körpers auf eine bakterielle Infektion darstellen können. Durch Apoptose der Zellen, die auch durch Bakterien induziert werden kann (Hecht, 1999), könnte es zur Freisetzung der Proteine bzw. der Peptide aus dem Cytoplasma kommen. Durch spezifische Proteolyse könnten die isolierten Fragmente entstehen und unmittelbar bei der Bekämpfung der Bakterieninfektion eingreifen.

Die Struktur der isolierten antimikrobiellen Peptide läßt Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus zu. Bei allen Peptiden konnte eine hohe positive Nettoladung ($\geq +5$) sowie ein hoher isoelektrischer Punkt ($> 11,5$) festgestellt werden, welcher aus dem hohen Anteil kationischer Aminosäuren resultiert (≥ 23 %). Dieser Überschuß an kationischer Ladung führt zu einer ersten elektrostatischen Anziehung der Peptide an die Bakterienmembran und im weiteren Verlauf zur Interaktion mit den negativ geladenen

Membran-Molekülen (LPS bei Gram-negativen und Teichonsäure bei Gram-positiven Bakterien) (vgl. Kapitel 1.2.1).

Sowohl für das Fragment der bGAPDH (104-122) als auch für bH1.2 (83-139) und bNucleolin (40-143) kann durch Ableitung von der Proteinstruktur eine α -helikale Struktur angenommen werden. Diese Struktur könnte es den Peptiden ermöglichen, nach der Assoziation der kationischen Aminosäurereste an die negativ geladenen Membrankomponenten, sich parallel zur äußeren Bakterienmembran auszurichten und kleine Poren in diese zu bilden. Anschließend interagieren die kationischen Peptide mit den anionischen Phospholipiden der Cytoplasmamembran. Es kommt zu einer Akkumulation und Insertion der Peptide in die Bakterienmembran. Dies kann zur Bildung von Kanälen führen, wie dies auch für Magainine und Defensine beschrieben wurde (Falla, *et al.*, 1996; Hancock, *et al.*, 1995).

Der Wechsel von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren innerhalb eines antibiotischen Peptids stellt eine wichtige Voraussetzung für die Bildung von Kanälen dar. Dabei formieren sich die Peptide so, daß ihr hydrophober Teil zur Membran gerichtet ist, während der hydrophile Teil Bestandteil des durch mehrere Moleküle geformten Kanals ist (Bechinger, *et al.*, 1992; Hancock, 1997). Die Störung der Membranintegrität verursacht einen Verlust der Zelle an cytoplasmatischen Komponenten wie z. B. Metaboliten, Elektrolyten und Enzymen, und resultiert in dem Tod der Bakterienzelle (Saberwal und Nagaraj, 1994).

Zusammenfassend läßt sich vermuten, daß die isolierten Peptide aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Eigenschaften (positive Nettoladung, hoher Anteil an kationischen Aminosäuren, α -helikale Struktur) über denselben Mechanismus das Wachstum von Bakterien und Hefen inhibieren. Die antimikrobielle Wirksamkeit der gereinigten Proteinfragmente läßt den Schluß zu, daß diese Peptide gemeinsam von großer Bedeutung für die Immunabwehr sind.

3.5 Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden aus Kalbsthymus

Zur funktionellen Charakterisierung der in dieser Arbeit identifizierten antimikrobiellen Proteinfragmente wurde das Wirkungsspektrum der Peptide untersucht. Dazu wurden synthetisch hergestellte Peptide (IPF PharmaCeuticals GmbH, Abteilung Peptidsynthese) verwendet, da die gereinigten Peptide nur in geringen Mengen vorlagen. Folgende synthetisch hergestellten Peptide standen für weitere Untersuchungen zur Verfügung:

bGAPDH (104-122)

bNuMA (2052-2082)

bNuMA (2052-2103)

bGRP (95-133)

bNuMA wurde auch in einer verkürzten Form (31 AS, MW: 3151, pI: 13,1) synthetisiert, um eventuelle Unterschiede zur isolierten Form bezüglich der antimikrobiellen Aktivität untersuchen zu können. Das Peptid wird im weiteren Verlauf als bNuMA (2052-2082) bezeichnet. bNuMA (2052-2082) hat eine verringerte positive Gesamtnettoladung von + 8 (bNuMA (2052-2103) Nettoladung: +13), jedoch einen höheren Anteil an basischen Aminosäuren von 25 % (bNuMA (2052-2103) 23 %).

bGRP (95-133) wurde mit unmodifizierten Argininresten synthetisiert. Eine chemische Synthese von Peptiden, die symmetrisch dimethylierte Argininreste enthalten, ist nicht möglich.

Ziel der folgenden Experimente war die Feststellung der Wirkungsbreite der antimikrobiellen Peptide. Die antimikrobielle Aktivität der Peptide wurde daher gegen Spezies unterschiedlicher Bakteriengruppen und gegen Hefen im Radial-Diffusionshemmtest überprüft und durch Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC) (Kapitel 2.5.2.2) quantifiziert. In Tabelle 10 sind die zum Test verwendeten Mikroorganismen aufgeführt.

Tabelle 10: Die zur Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden verwendeten Bakterienspezies.

Gruppe	Spezies	Abkürzung
Gram-positive Kokken	<i>Staphylococcus carnosus</i> TM 300	<i>St. carnosus</i>
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>M. luteus</i>
Gram-positive Stäbchen	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
Gram-negative Stäbchen	<i>Escherichia coli</i> BL 21	<i>E. coli</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>
Hefen	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>

3.5.1 Wirkungsspektrum von antimikrobiellen Thymuspeptiden

Mit Hilfe des Radial-Diffusionshemmtests (Kapitel 2.5.2.1) wurde die antimikrobielle Aktivität der synthetisch hergestellten Peptide überprüft sowie ihr Wirkungsspektrum untersucht.

Um die Wirkpotenz der hier gereinigten antimikrobiellen Thymuspeptide mit der bereits bekannter Peptidantibiotika zu vergleichen, wurde MBI-28 als Kontrollpeptid getestet. MBI-28 ist ein kationisches antimikrobiell wirksames Peptid, das aus 26 Aminosäuren besteht. Es war ein Kandidat der Firma Micrologix Biotech bei der Entwicklung von neuen Peptidantibiotika. Abbildung 28 zeigt das repräsentative Bild eines Radial-Diffusionshemmtests. Als Beispiel wurde bGAPDH (104-122) in unterschiedlichen Mengen aufgetragen. Als Testbakterium wurde *E. coli* verwendet. Die klaren Hemmhöfe unterschiedlichen Durchmessers um die Kavitäten lassen eine konzentrationsabhängige antimikrobielle Wirkung des Peptids erkennen.

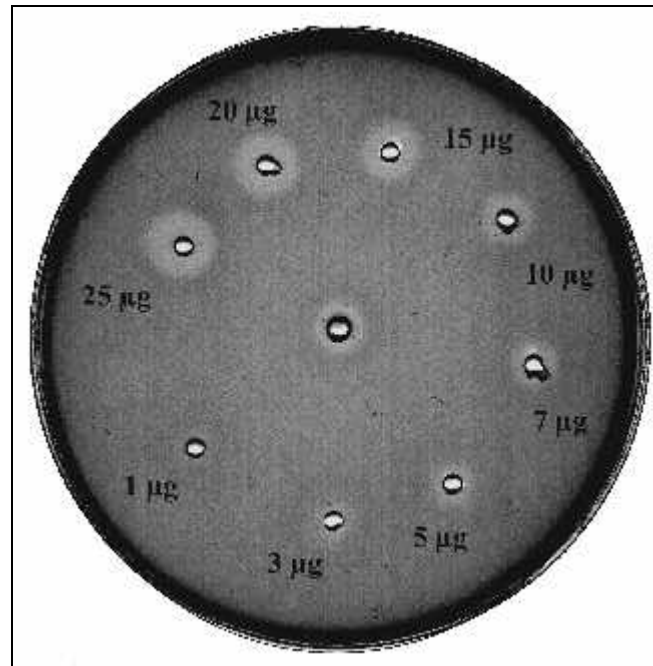


Abbildung 28: Radial-Diffusionshemmtest von boviner GAPDH (104-122) in Peptidmengen von 1 µg bis 25 µg gegen *E. coli*. In der Mitte wurde MBI-28 (10 µg) aufgetragen. Die Bakterien wurden 18 Stunden bei 37°C inkubiert.

Abbildung 29 gibt die Wirkung der Peptide auf unterschiedliche Mikroorganismen im Radial-Diffusionshemmtest wieder. Die antimikrobiell wirksamen Proteinfragmente sind in der Lage, sowohl Gram-positive und -negative Bakterien als auch Hefen in ihrem Wachstum zu inhibieren und besitzen somit ein breites Wirkungsspektrum. Dabei ist die Wirkpotenz der Thymuspeptide in diesem Test von vergleichbarer Größenordnung wie die des Peptidantibiotikums MBI-28.

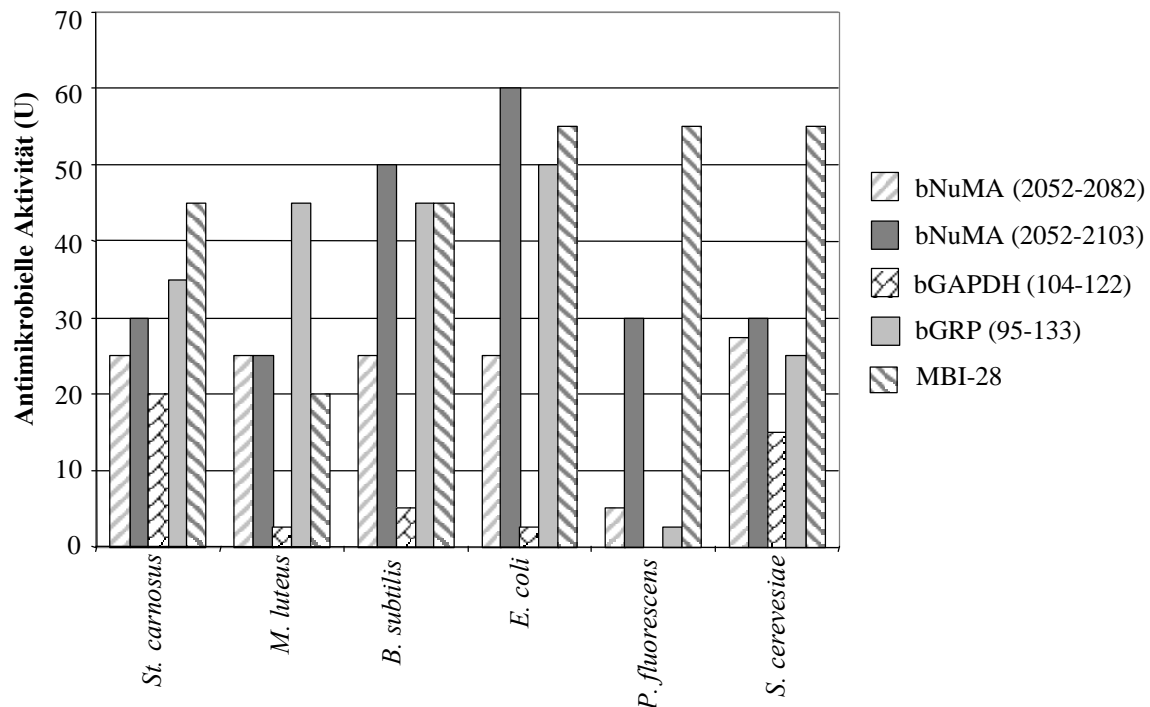


Abbildung 29: Antimikrobielle Wirkung der Thymuspeptide gegen unterschiedliche Bakterienstämme sowie eine Hefe im Radial-Diffusionshemmtest. Es wurden 10 µg des jeweiligen Peptids eingesetzt. Eine Unit entspricht einem Hemmhofradius von 0,1 mm (Lehrer *et al.*, 1991).

Die stärkste Wachstumshemmung verursachten bNuMA (2052-2103) sowie bGRP (95-133). Beide Peptide inhibierten in den eingesetzten Mengen von 10 µg das Wachstum der getesteten Mikroorganismen mit einer vergleichbaren Aktivität wie das Kontrollpeptid. Die verkürzte Form von bNuMA (2052-2082) zeigte dagegen in diesem Test eine geringere Aktivität als das isolierte Fragment des Proteins bNuMA (2052-2103). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die positive Nettoladung, die bei der nativen Form um + 5 höher ist, einen entscheidenden Einfluß auf die Wirksamkeit des Peptides hat. Der prozentual leicht erhöhte Anteil an basischen Aminosäuren beim verkürzten Fragment (25 % zu bNuMA (2052-2103) 23%) scheint keinen Einfluß auf die Hemmaktivität zu haben. Offensichtlich ist das Vorhandensein von einer größeren Menge an freien positiven Ladungen und das Verhältnis von hydrophilen zu hydrophoben Aminosäuren ausschlaggebend für die Wirkung, da bei zu starker Basizität der Peptide ihre antimikrobielle Wirkung minimiert werden kann (Andreu und Rivas, 1999). Bei dem verkürzten Fragment scheint der amphipathische Charakter weniger ausgeprägt zu sein, möglicherweise aufgrund der fehlenden hydrophilen Aminosäuren am C-Terminus.

In diesem Test konnte auch die antimikrobielle Wirksamkeit des unmodifizierten Peptids bGRP (95-133) nachgewiesen werden. Obwohl das synthetisch hergestellte Peptid nicht über symmetrisch dimethylierte Argininreste verfügt, wie die native Form, ist antimikrobielle Aktivität nachweisbar. Ein Vergleich zwischen dem nativen bGRP (95-133) und dem synthetischen Peptid ist nicht möglich, da das Peptid mit symmetrisch modifizierten Argininresten in nur geringen Mengen aus Thymus isoliert werden konnte. Das synthetische Peptid ist in der Lage, sowohl das Wachstum von Gram-positiven und -negativen Bakterien, als auch Hefe zu inhibieren und besitzt somit ebenfalls ein breites Wirkungsspektrum. Die antimikrobielle Wirkpotenz von bGRP (95-133) ist mit der von MBI-28 vergleichbar. Es zeigt allerdings bei der getesteten Peptidmenge von 10 µg gegen *M. luteus* eine größere Wachstumshemmung als MBI-28.

Die geringste antimikrobielle Aktivität zeigte das Proteinfragment der bovinen GAPDH in diesem Test. Das Peptid war in der applizierten Menge nicht in der Lage, das Gram-negative Stäbchen *P. fluorescens* am Wachstum zu hindern. Alle aus Kalbsthymus isolierten Peptide, ausgenommen bNuMA (2052-2103), zeigten jedoch im Vergleich mit MBI-28 eine nur geringe Aktivität bei der Inhibition des Wachstums dieses Bakterienstamms.

Der Radial-Diffusionshemmtest stellt eine semiquantitative Methode zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität dar. Die Quantifizierung und Überprüfung der antimikrobiellen Aktivität erfolgte mittels Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC).

3.5.2 Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC)

Die Bestimmung der minimalen Peptidkonzentration, die notwendig ist, um das Wachstum von Mikroorganismen zu hemmen, gibt Aufschluß über die antimikrobielle Wirkpotenz der getesteten Peptide (Kapitel 2.5.2.2). Als Vergleichssubstanz diente wiederum das Peptid MBI-28.

Alle Experimente wurden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 11: Minimale Hemmstoffkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) der Thymuspeptide (Kapitel 2.5.2.2). Im Vergleich ist die MIC des antimikrobiell wirksamen Peptides MBI-28 angegeben. Als maximale Konzentration wurden $250 \mu\text{g/ml}$ des jeweiligen Peptids getestet.

Peptide ($\mu\text{g/ml}$)/ Mikroorganismus	bGAPDH (104-122)	bGRP (95-133)	bNuMA (2052-2082)	bNuMA (2052-2103)	MBI-28
<i>St. carnosus</i>	50	37,5	25	15,6	6,2
<i>M. luteus</i>	200	18,7	50	25	12,5
<i>B. subtilis</i>	62,5	20	25	3,9	3,1
<i>E. coli</i>	100	9,4	6,2	3,9	3,1
<i>P. fluorescens</i>	> 250	250	65	15,6	25
<i>S. cerevesiae</i>	100	25	31,2	25	3,1

Die MIC bestätigt die bereits beim Radial-Diffusionshemmtest erhaltenen Ergebnisse. Alle Proteinfragmente inhibieren sowohl das Wachstum von Gram-positiven und -negativen Bakterien, als auch Hefen und besitzen somit ein weit gefächertes Wirkungsspektrum. Sowohl die native Form des bNuMA (2052-2103) als auch bGRP (95-133) zeigen vergleichbare Wirkpotenz wie das Kontrollpeptid. bNuMA (2052-2103) (MIC = $15,6 \mu\text{g/ml}$) wirkt gegen *P. fluorescens* bereits bei geringeren Konzentrationen als MBI-28 (MIC = $25 \mu\text{g/ml}$). Alle anderen Peptide können das Wachstum dieses Bakterienstammes nur in sehr hohen Konzentrationen (MIC $\geq 200 \mu\text{g/ml}$) hemmen. bGAPDH (104-122) zeigt auch in diesem

Versuch bei der höchsten Testkonzentration von 250 µg/ml keine Wirkung auf die Gram-negativen Stäbchen.

Bei einem Vergleich der bNuMA-Fragmente wird deutlich, daß das isolierte Fragment eine wesentlich bessere antimikrobielle Wirkung auf alle Bakterienstämme hat als das kürzere Fragment. Besonders deutlich ist dies bei der Inhibition von *P. fluorescens*. Dabei zeigte sich, daß mehr als die vierfache Menge an Peptid nötig war (bNuMA (2052-2082) MIC = 65 µg/ml, bNuMA (2052-2103) MIC = 15,6 µg/ml), um diesen Bakterienstamm am Wachstum zu hindern. Bei *B. subtilis* wurde die sechsfache Peptidkonzentration benötigt, um eine Hemmung zu erhalten. Die höhere Wirkpotenz des isolierten Fragmentes gegenüber der verkürzten Form könnte auf die erhöhte positive Nettoladung zurückzuführen sein. Durch die größere Nettoladung stehen bNuMA (2052-2103) fünf weitere freie positive Ladungen zu Verfügung, um mit der äußeren Bakterienmembran in Wechselwirkung treten zu können. Weiterhin scheinen die hydrophilen Aminosäuren am C-terminus des längeren Fragments, die beim Eindringen des Peptids in die Bakterienmembran eine verstärkte Rolle zu spielen scheinen, für die Wirkpotenz entscheidend zu sein (vgl. Kapitel 3.5.1).

Die größte Wirksamkeit zeigte bGRP (95-133) gegen *E. coli* (MIC = 9,4). Das ebenfalls Gram-negative Stäbchen *P. fluorescens* wurde jedoch nur bei einer Peptidkonzentration von 250 µg/ml am Wachstum gehindert. Bei Gram-positiven Keimen sowie Hefe wurden zwischen 18 µg/ml und 37 µg/ml zur Wachstumshemmung benötigt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sowohl die isolierten Peptide als auch das verkürzte Fragment von bNuMA ein breites Spektrum gegen verschiedene Bakteriengruppen besitzen. Die antimikrobielle Wirkpotenz der Peptide ist jedoch von der Keimart abhängig und kann wie folgt dargestellt werden:

bNuMA (2052-2103):

E. coli = *B. subtilis* >> *P. fluorescens* = *St. carnosus*. >> *S. cerevisiae* = *M. luteus*

bNuMA (2052-2082):

E. coli >> *B. subtilis* = *St. carnosus* >> *S. cerevisiae* >> *M. luteus* >> *P. fluorescens*

bGRP (95-133)

E. coli >> *M. luteus* >> *B. subtilis* >> *S. cerevisiae* >> *St. carnosus* >> *P. fluorescens*

bGAPDH (104-122)

St. carnosus >> *B. subtilis* >> *E. coli* = *S. cerevisiae* >> *M. luteus* >> *P. fluorescens*

Abbildung 30: Wirkpotenz der synthetischen Peptide auf verschiedene Bakterienstämme.

Dabei ist ersichtlich, daß keines der Peptide ausschließlich auf Gram-negative oder Gram-positive Bakterien wirkt. Eine Erklärung für die unterschiedliche Wirksamkeit der Peptide gegen die verschiedenen Mikroorganismengruppen liegt wahrscheinlich im unterschiedlichen Aufbau der Bakterienzellwände. Gram-negative Bakterien besitzen, im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien, zusätzlich eine der Mureinschicht aufgelagerte äußere Membran. Diese ist aus Lipopolysacchariden (LPS), Phospholipiden und Peptidoglycanen aufgebaut und stellt somit einen chemisch anderen Angriffspunkt für antimikrobiell wirkende Substanzen dar (Hancock, 1997). Die Integrität der Außenmembran wird dadurch gewährleistet, daß die anionische LPS-Schicht durch bivalente Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} stabilisiert wird (Vaara, 1992). Als erster Schritt zur Permeabilisation der Membran wird eine elektrostatische Interaktion zwischen den negativ geladenen Komponenten der Bakterienmembran und den kationischen Peptiden postuliert. Dadurch kommt es zu Wechselwirkungen mit den sauren LPS-Molekülen bzw. den anionischen Lipiden und zur Assoziation der Peptide an die äußere Bakterienmembran. Es wird angenommen, daß in die LPS-Schicht eingetretene Peptide die kleinen, stabilisierenden Kationen verdrängen und wesentlich mehr Raum beanspruchen, was wiederum die Integrität der äußeren Membran stört (Andreu und Rivas, 1999). Dadurch könnte die Durchlässigkeit der Membran für weitere kationische Peptide erhöht werden, die aufgrund ihres amphipathischen Charakters, den auch die isolierten Peptide besitzen, in die

Cytoplasmamembran eindringen können. Sie verändern dadurch die thermodynamische Membranfluidität und bewirken wiederum eine erhöhte Durchlässigkeit der Cytoplasmamembran für intrazelluläre und extrazelluläre Stoffe. Es kommt zur Lyse der Bakterienzelle.

Die Zellwand Gram-positiver Bakterien enthält eine bis zu 40-schichtige Mureinschicht, die negativ geladene Teichonsäure enthält. Diese könnte ein Angriffspunkt für die kationischen Peptide sein, die mit dieser Säure in Wechselwirkungen treten und somit an die Zellwand assoziieren können. Die hohe Schichtdicke der Mureinschicht könnte ein Grund für die höhere Peptidkonzentration bei bNuMA (2052-2082) und bGRP (95-133) sein, die im Vergleich mit den ein- bis zweischichtigen Mureinschicht der Gram-negativen Bakterien erforderlich ist, um Gram-positive Bakterien zu hemmen. Durch Bindung der kationischen Peptide an die Teichonsäure könnten diese in die Mureinschicht vordringen. Um zur Cytoplasmamembran zu gelangen und diese zu permeabilisieren, müssen die Peptide die Mureinschicht durchdringen. Durch Bindung an die negativ geladenen Komponenten dieser Peptidoglycanschicht könnten größere Konzentrationen dieser Peptide notwendig sein, um den Effekt einer Wachstumshemmung bei Gram-positiven Bakterien herbeizuführen.

Hefen besitzen eine Chitinschicht, die aus Stoffen wie Cellulose und Glucanen aufgebaut ist und als Stützskelett der Zellwand dient. Wahrscheinlich interagieren die Peptide mit den anionischen Komponenten der Hefezellwand. Allerdings ist die Zellwandstruktur der Hefen komplex durch β -glycosidische Bindungen der Glycane und des Chitins verknüpft (Schlegel, 1992). Dies könnte der Grund für die leicht erhöhte Hemmstoffkonzentration (MIC für alle Peptide $\geq 25 \mu\text{g/ml}$) sein, da es für die Peptide schwerer ist, diese komplexen Strukturen zu durchdringen.

Bei einem Vergleich der getesteten Peptide miteinander, zeigt sich, daß bNuMA (2052-2103), welches die höchste positive Gesamtnettoladung (+13) besitzt, bei allen Bakterienstämmen (außer *M. luteus*) die geringste Konzentration benötigt, um das Wachstum der Bakterien zu inhibieren. Das GAPDH-Fragment, welches nur eine Nettoladung von +5 hat, zeigt die geringste antimikrobielle Aktivität. bNuMA (2052-2082) und bGRP (95-133), die beide eine Nettoladung von +8 haben, inhibieren sowohl die Gram-positiven Bakterienstämme (MIC: $18 \mu\text{g/ml} \geq 50 \mu\text{g/ml}$) sowie *E. coli* (MIC $< 10 \mu\text{g/ml}$) und *S. cerevisiae* (MIC: $25 \geq 31 \mu\text{g/ml}$)

in vergleichbaren Konzentrationen. Dies führt zu dem Schluß, daß eine hohe Gesamtnettoladung entscheidend zur antimikrobiellen Wirksamkeit beitragen könnte.

3.5.3 Untersuchungen zur Wirkspezifität der Peptide

Um antimikrobielle Peptide pharmakologisch nutzen zu können, muß zunächst ihre Wirkspezifität untersucht werden. Zur Bestimmung der Spezifität für Mikroorganismen sollte die hämolytische und cytotoxische Aktivität der Peptide bestimmt werden. Dabei sollte geklärt werden, ob die Peptide körpereigene Blutzellen, wie Erythrozyten lysieren bzw. Säugerzellen zerstören können. Alle Versuchsergebnisse wurden durch Doppelbestimmungen verifiziert.

3.5.3.1 Hämolytische Aktivität

Die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten gilt als Nachweis für die membranpermeabilisierende Aktivität einer Substanz. Eine 100 %ige Hämolyse wurde mit dem Detergenz Tween 20 erreicht. Die Auswertung erfolgte durch photometrische Messung und anschließende Berechnung der prozentualen Hämoglobinfreisetzung (Kapitel 2.5.3). Als Vergleichspeptid wurde MBI-28 verwendet.

Der Versuch wurde in isotonischem Medium durchgeführt, das Glucose als Osmoprotektant enthielt. Ein hypotones Medium verstärkt die toxische Wirkung von membranpermeabilisierende Substanzen, da die Aktivität der Proteinfragmente zu einem Verlust der Zelle an intrazellulären Komponenten bzw. zum Eindringen von extrazellulären Substanzen in die Zelle führen könnten.

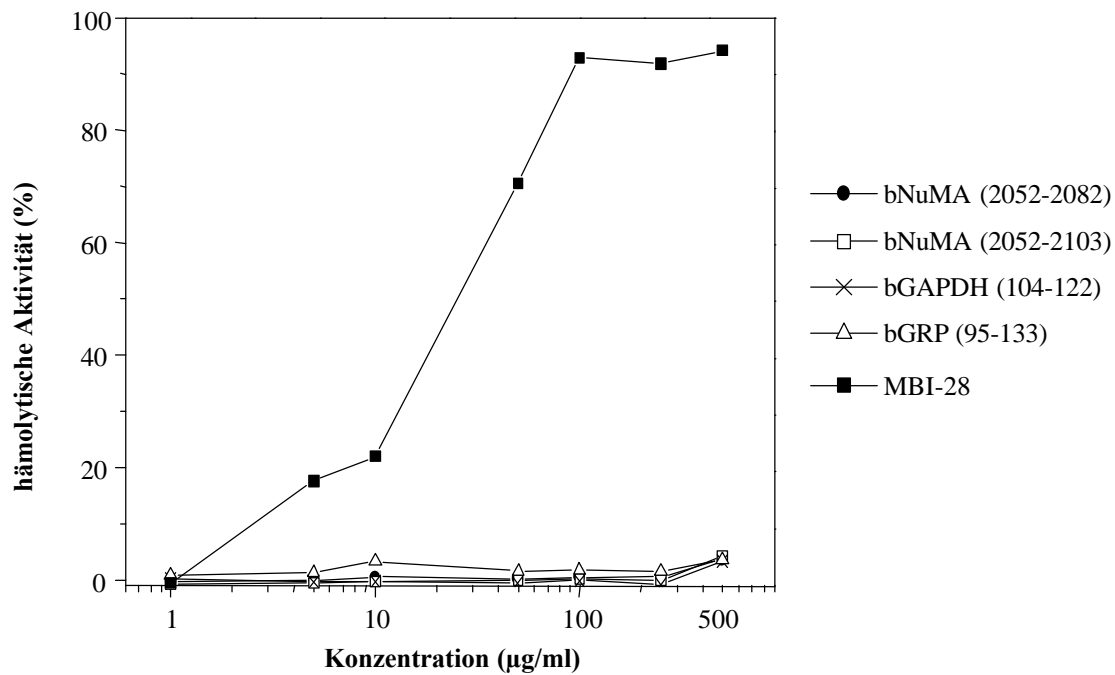


Abbildung 31: Hämolytische Wirkung der Thymuspeptide. Es wurden zwischen 1 µg/ml und 500 µg/ml des jeweiligen Peptids eingesetzt. Die Peptidkonzentrationen sind logarithmisch aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde. Die Auswertung erfolgte durch photometrische Messung und anschließende Berechnung der prozentualen Hämoglobinfreisetzung (Kapitel 2.5.3). Eine 100 %ige Hämolyse wurde mit 1 %iger Tween 20-Lösung erreicht.

Alle Peptide zeigen auch bei einer hohen Konzentration von 500 µg/ml eine nur sehr geringe hämolytische Aktivität < 5 %. Bei bNuMA (2052-2082), bNuMA (2052-2103) und bGAPDH (104-122) ist keine hämolytische Aktivität bis zu einer Konzentration von 250 µg/ml nachweisbar. bGRP (95-133) zeigt eine geringe Aktivität unter 2 % bis 250 µg/ml. Das Vergleichspeptid MBI-28 lysiert 17,6 % der Erythrozyten bereits ab einer Konzentration von 5 µg/ml. Ab 50 µg/ml konnte eine 70 %ige hämolytische Aktivität nachgewiesen werden.

Es wird vermutet, daß die hämolytische Aktivität von Substanzen initial durch elektrostatische Interaktion der Substanzen mit der Erythrozytenmembran entsteht und anschließend durch hydrophobe Interaktion, die mit einem tieferen Eindringen der Substanzen in die Membran des Erythrozyten verbunden ist (Helmerhorst *et al.*, 1999). Durch den großen Überschuß an kationischen Aminosäuren kommt es zu einer ersten Interaktion der Peptide mit zwitterionisch geladenen Phospholipiden der äußeren Membran des Erythrozyten. Allerdings

scheint die Höhe der positiven Nettoladung keinen weiteren Einfluß auf die Hämolyse der Zellen zu haben. Durch den Austausch von Aminosäureresten bei hämolytisch aktiven Peptiden konnte nachgewiesen werden, daß bei Erhöhung des Anteils von hydrophoben Aminosäureresten die hämolytische Aktivität der Peptide steigt (Saberwal und Nagaraj, 1994). Da das native bGRP (95-133) aufgrund der symmetrischen Dimethylierung der Argininreste hydrophober als das synthetisch hergestellte Peptid ist, könnte es eine größere hämolytische Aktivität als das Peptid mit unmodifizierten Argininresten aufweisen. Allerdings konnte diese Vermutung nicht überprüft werden, da das native Peptid in nur geringen Mengen aus Thymus isoliert werden konnte.

Die Schädigung von Zellen durch Hämolyse, die durch antimikrobielle Peptide hervorgerufen wird, stellt ein großes Problem bei der Entwicklung von neuen Antibiotika dar. Das Kontrollpeptid MBI-28 zeigte bereits bei einer Konzentration von 5 µg/ml eine 20 %ige Hämolyse der humanen Erythrozyten. Dadurch ist es als Medikament zur Bekämpfung pathogener Keime in der Medizin nicht mehr einsetzbar. Die hier getesteten Thymuspeptide scheinen in Konzentrationen bis 500 µg/ml nicht mit den lipophilen Membrankomponenten der inneren Membran zu interagieren und bewirken somit keine nennenswerte Lyse der Zellen.

Zum Vergleich wurde die cytotoxische Wirkung der Peptide auf eine murine Astrozytenzelllinie untersucht.

3.5.3.2 Cytotoxische Aktivität von Thymuspeptiden

Sowohl hämolytische als auch toxische Wirkung sind zunächst eine Folge der Bindung der Peptide an die Zellmembran. Cytotoxine können allerdings auch die Proteinsynthese spezifisch inhibieren oder Peptidyltransferasen hemmen, und führen auf diese Art und Weise zum Zelltod (Wehner und Gehring, 1990). Um die cytotoxische Aktivität der antimikrobiellen Peptide aus Kalbsthymus zu untersuchen, wurde die mitochondriale Stoffwechselaktivität einer murinen Astrocytomazelllinie gemessen, die durch toxische Substanzen beeinflusst wird und somit als Maß für die Toxizität von Substanzen herangezogen werden kann (Baker *et al.*, 1993). Es wurden $1 \cdot 10^4$ Zellen / ml pro Kavität 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellzahl sowie Vitalität der Zellen wurde vor Inkubation mit der Trypan-Blau-Methode bestimmt. Die Vitalität der Zellen betrug 92 %. Die Auswertung erfolgte durch photometrische Messung des Stoffwechselproduktes von WST und anschließende Berechnung der Vitalität der Zellen (Kapitel 2.5.4.3). Ein 100 %iges Absterben der Zellen wurde durch das Toxin Cytosinarabinofuranosid in einer Konzentration von 10 µM erreicht. Dieses wurde durch Messung der Vitalität der Zellen mit Hilfe der Trypan-Blau-Methode (Kapitel 2.5.4.2) überprüft.

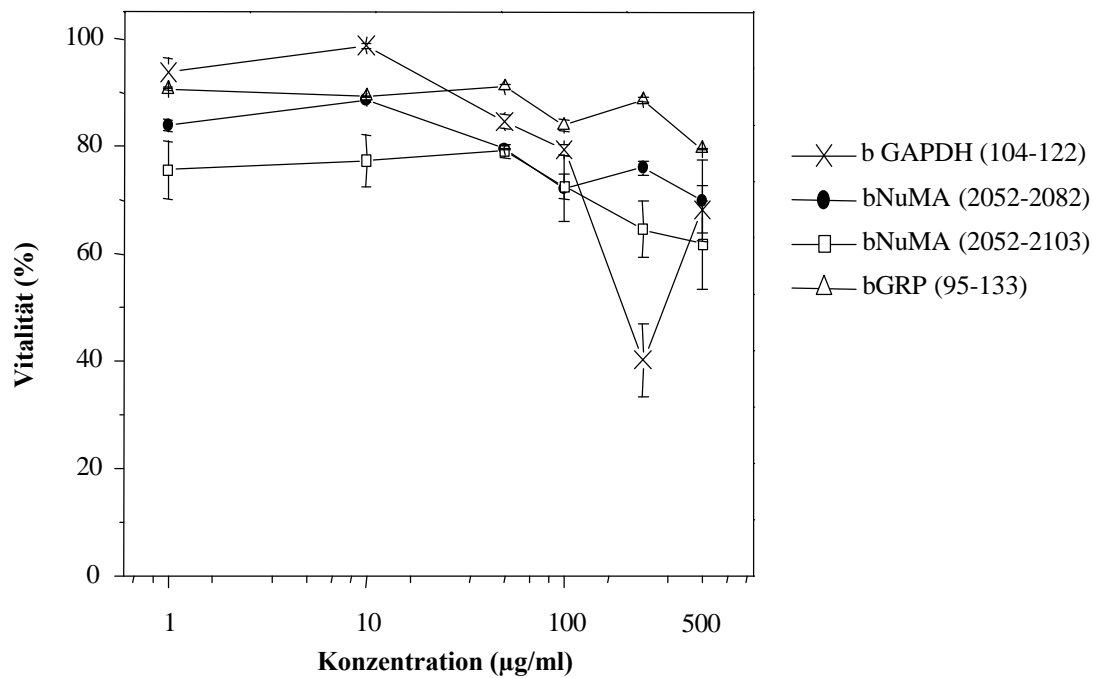


Abbildung 32: Cytotoxische Wirkung der Thymuspeptide auf die Astrocytomazelllinie CLTT1. Es wurden 10^4 Zellen / ml 48 Stunden bei 37°C mit den jeweiligen Peptidkonzentrationen von $1\ \mu\text{g/ml}$ bis $500\ \mu\text{g/ml}$ inkubiert. Die Peptidkonzentrationen sind logarithmisch aufgetragen. Eine vollständiges Absterben der Zellen wurde mit $10\ \mu\text{M}$ Cytosinarabinofuranosid erreicht. Die Zellen ohne Peptid wurden als Positivkontrolle mit einer 100 %igen Vitalität angenommen. Die Auswertung erfolgte durch photometrische Messung bei $405\ \text{nm}$ und anschließende Berechnung der Vitalität (Kapitel 2.5.4.3). Die Berechnung der Standardabweichung ist im Anhang aufgeführt.

Abbildung 32 verdeutlicht die cytotoxische Wirkung der Peptide in Konzentrationen von $1\ \mu\text{g/ml}$ bis $500\ \mu\text{g/ml}$. bGRP (95-133) wirkt in diesen Konzentrationen nicht toxisch. Die verkürzte Form von bNuMA (2052-2082) führt erst bei einer Konzentration von $500\ \mu\text{g/ml}$ zu einem leichten Vitalitätsverlust der Zellen (Vitalität = 69 %). Bei dem isolierten Fragment des Proteins dagegen läßt sich eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der toxischen Aktivität erkennen. bNuMA (2052-2103) verringert die Vitalität der Zellen ab einer Konzentration von $100\ \mu\text{g/ml}$ auf 72 %. Bei Applikation der fünffachen Peptidkonzentration steigt die cytotoxische Aktivität, die Vitalität der Zellen sinkt auf 61 %.

bGAPDH (104-122) zeigt bis zu einer Konzentration von $250\ \mu\text{g/ml}$ einen konzentrationsabhängigen cytotoxischen Effekt, bei welchem die Zellen nach einer

48 stündigen Inkubation mit dem Peptid nur noch 40 % der Vitalität aufweisen. Bei Applikation des Peptides in einer Konzentration von 500 µg/ml verringert sich die toxische Wirkung und die Vitalität der Zellen steigt auf 68 % an. Es konnte gezeigt werden, daß besonders basische Peptide in der Lage sind, Kanäle in verschiedenen Zellmembranen zu formen. Diese Kanäle erhöhen die Permeabilität der Zellen für kleine Kationen und führen über einen Ausgleich des Membranpotentials zum Zelltod (Andreu und Rivas, 1999; Hancock und Scott, 2000). Pohlmeier *et al.* stellte die Vermutung auf, daß das antimikrobiell wirksame Histon H1.2 als Ligand für spezielle Rezeptoren an Zellmembranen bindet und so die Apoptose von eukaryotischen Zellen einleitet (Pohlmeier *et al.*, 2000). Durch zu hohe Konzentrationen des Peptides ist es möglich, daß die einzelnen Moleküle sich bei der Bindung an den Rezeptor behindern und es somit zu einer geringeren Sterberate an Zellen kommt. Eine weitere Möglichkeit diesen Effekt zu erklären besteht in der Bildung von Peptidoligomeren. Das Protein GAPDH konnte in verschiedenen oligomeren Formen nachgewiesen werden. In den meisten Fällen sind neben dem Monomer auch Di- und Tetramere als aktive Formen bei der Glycolyse beteiligt (Meyer-Siegler *et al.*, 1991). Damit könnten die kanalbildenden Struktur motive im Inneren des Molekülverbandes liegen und somit blockiert sein. Dieses würde wiederum zu einer Verringerung der toxischen Aktivität bei höheren Konzentrationen führen.

Aufgrund des amphipathischen Charakters der Peptide könnte nicht nur die Bildung von Kanälen innerhalb der Zellmembran ein Grund für die toxische Wirkung sein. Durch die basischen Eigenschaften der Peptide könnte auch eine Affinität zur DNA- und RNA-Bindung bestehen, was zu einer möglichen Beeinflussung der Proteinsynthese führen könnte (Hancock und Scott, 2000). Die Hypothese könnte besonders bei bNuMA (2052-2103) zutreffen. Das Protein nimmt unmittelbaren Einfluß auf die Mitose, so daß die Teilung der Zellen bei zu hohen Konzentrationen des Peptids gehemmt werden könnte, was wiederum zu einer Verringerung der Zellvitalität führt.

Untersuchungen haben gezeigt, daß einige antimikrobielle Peptide eine toxische Wirkung besonders gegen Krebszellen zeigen, während sie auf die Proliferation von Blutzellen keinen Einfluß nehmen (Pohlmeier *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 1993). Dies scheint auch bei den getesteten Peptiden so zu sein. Astrocytomazellen werden besonders von bGAPDH (104-122) und in geringerem Maße von bNuMA (2052-2103) zerstört, Erythrozyten dagegen nicht

(Kapitel 3.5.3.1). Der Grund dafür ist nicht bekannt. Es ist jedoch möglich, daß die Expression von Phosphatidylserin, ein negativ geladenes Molekül, an der Oberfläche von Tumorzellen als Zielmolekül für die antimikrobiellen Peptide dient (Pohlmeyer *et al.*, 2000). Durch ihre kationische Ladung ist somit eine Bindung an die Membran der Tumorzellen und ein Vordringen innerhalb der Zellmembran möglich. Dies würde zum Verlust der Membranintegrität und zum Tod der Tumorzellen führen.

4 Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war die Isolierung und Identifizierung von Peptiden aus Kalbsthymus, die das Wachstum von Mikroorganismen hemmen, und somit einen wesentlichen Bestandteil der humoralen unspezifischen Abwehr des Immunsystems darstellen. Zu diesem Zweck wurde eine Peptidbank aus 20 kg Kalbsthymus hergestellt. Zur Separation von antimikrobiellen Peptide von inaktiven Thymuskomponenten wurde ein Trennverfahren entwickelt. Die Kombination aus verschiedenen Chromatographietechniken mit einem sensitiven Test zum Nachweis der antimikrobiell aktiven Substanzen in den erhaltenen HPLC-Fractionen resultierte in der Reindarstellung von mehreren bislang unbekanntem antimikrobiell wirksamen Peptiden. Die Primärstruktur der isolierten Peptide wurde mittels bioanalytischer Methoden (Edman-Sequenzierung und MALDI-MS bzw. ESI-MS) oder durch molekularbiologische Methoden aufgeklärt. Diese wurden als Fragmente der bovinen Proteine Histon H1.2, Glycin-rich-Protein, Nucleolin, Nuclear mitotic Apparatur Protein und Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase identifiziert.

Modifizierungen von Aminosäureresten, wie z.B. die symmetrische Dimethylierung der Argininreste im bGRP-Fragment, wurden erfolgreich über Edman-Abbau und MS bestimmt.

Die identifizierten Peptide wurden zur Bestätigung ihrer antimikrobiellen Aktivität synthetisch hergestellt und funktionell charakterisiert.

bGAPDH (104-122), bNuMA (2052-2103) und bGRP (95-133) haben ein breites Wirkungsspektrum und wirken gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie gegen Hefen. Untersuchungen zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkpotenz führten zu dem Ergebnis, daß die Peptide bereits in geringen Konzentrationen das Wachstum von Mikroorganismen hemmen. Der Vergleich von einem synthetisch hergestellten kürzeren Fragment von bNuMA (2052-2082) mit bNuMA (2052-2103) zeigte eine deutlich höhere antimikrobielle Aktivität des nativen Peptids. Im Gegensatz dazu konnte keine Lyse von Erythrozyten beobachtet werden. Auch cytotoxische Aktivität auf Säugerzelllinien wurde nicht (bGRP (95-133)) oder erst in hohen Konzentrationen (bNuMA (2052-2103), bGAPDH (104-122)) nachgewiesen.

Die in dieser Arbeit identifizierten Proteinfragmente könnten als Bestandteil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen spielen. Aufgrund ihrer Spezifität für Bakterien und Hefen und ihrer geringen Toxizität gegen Erythrozyten und andere Säugerzellen könnten sich die isolierten Peptide zur Entwicklung als neue klinisch anwendbare Peptidantibiotika eignen.

5 Literaturverzeichnis

Achsel T., Brahms H., Kastner B., Bachi A., Wilm M., Luhrmann R., A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. (1999) *EMBO J.* 18: 5789-802.

Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., Lindbom L., Kiessling R., Jornvall H., Wigzell H., Gudmundsson G.H., The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. (2000) *Blood* 96: 3086-3093.

Ahlström, L. von Euler, H., Toxic action of histones and protamines from thymus. (1946) *Ark. Kemi. Mineral. och Geol.* 23A, No. 3: 1-10.

Andersson M., Gunne H., Agerberth B., Boman A., Bergman T., Olsson B., Dagerlind A., Wigzell H., Boman H.G., Gudmundsson G.H., NK-lysin, structure and function of a novel effector molecule of porcine T and NK cells. (1996) *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54: 123-126.

Andreu D., Rivas L., Animal antimicrobial peptides: an overview. (1998) *Biopolymers* 47: 415-433.

Avorn J., Solomon D.H., Cultural and economic factors that (mis)shape antibiotic use: the nonpharmacologic basis of therapeutics. (2000) *Ann. Intern. Med.* 133: 128-35.

Baker M.A., Maloy W.L., Zasloff M., Jacob L.S., Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. (1993) *Cancer Res.* 53: 3052-3057.

Baldwin G.S., Carnegie P.R., Isolation and partial characterization of methylated arginines from the encephalitogenic basic protein of myelin. (1971) *Biochem. J.* 123: 69-74.

Basch R.S., Goldstein G., Induction of T-cell differentiation in vitro by thymine, a purified polypeptide hormone of the thymus. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.71: 1474-8.

Bellamy W., Wakabayashi H., Takase M., Kawase K., Shimamura S., Tomita M., Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. (1993) Med. Microbiol. Immunol. 182: 97 - 105.

Boman H.G., Antibacterial peptides: key components needed in immunity. (1991) Cell. 65: 205-7.

Boman H.G., Peptide antibiotics and their role in innate immunity. (1995) Annu. Rev. Immunol. 13: 61-92.

Breithaupt, N., Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften des antimikrobiellen Peptids Bolisin., (2001) Diplomarbeit, Hochschule Bremerhafen.

Brostoff S., Eylar E.H., Localization of methylated arginine in the A1 protein from myelin. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.68: 765-9.

Burstein Y., Buchner V., Pecht M., Trainin N., Thymic humoral factor gamma 2: purification and amino acid sequence of an immunoregulatory peptide from calf thymus. (1988) Biochemistry. 27: 4066-71.

Bush K., Macielag M., New approaches in the treatment of bacterial infections. (2000) Curr. Opin. Chem. Biol. 4: 433-9.

Casey L.C., Immunologic response to infection and its role in septic shock. (2000) Crit. Care Clin. 16: 193-213.

Charp P.A., Rice W.G., Raynor R.L., Reimund E., Kinkade J.M. Jr., Ganz T., Selsted M.E., Lehrer R.I., Kuo J.F., Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils. (1988) Biochem. Pharmacol. 37: 951-6.

Chopra I., Hodgson J., Metcalf B., Poste G., The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. (1997) *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 497-503.

Collins F.M., Mucosal defenses against Salmonella infection in the mouse. (1979) *J. Infect. Dis.* 139: 503-10.

Davison P.F., James D.W.F., Shooter K.V., Butler J.A.V., The histones of calf thymus deoxyribonucleoprotein. (1954) *Biochim. et Biophys. Acta.* 15: 415-424.

Davison P.F., Butler J.A.V., The fractionation and composition of histones from thymus nucleoprotein. (1954) *Biochim. et Biophys. Acta.* 15: 439-440.

Edgerton M., Koshlukova S.E., Araujo M.W., Patel R.C., Dong J., Bruenn J.A., Salivary histatin 5 and human neutrophil defensin 1 kill *Candida albicans* via shared pathways. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3310-6.

Falla T., Karunaratne D.N., Hancock R.E., Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 19298-19303.

Finch R.G., Antibiotic resistance. (1998) *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 125-8.

Fogaca A.C., da Silva P.I., Miranda M.T., Bianchi A.G., Miranda A., Ribolla P.E., Daffre S., Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 25330-25334.

Frohm M., Agerberth B., Ahangari G., Stahle-Backdahl M., Liden S., Wigzell H., Gudmundsson G.H., The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 15258-15263.

Gallo R.L., Ono M., Povsic T., Page C., Eriksson E., Klagsbrun M., Bernfield M., Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11035-11039.

Garred P., Innate immunity creates hope for new strategies in treatment of infections. (2000) *Immunol. Today.* 21: 531.

Gary J.D., Clarke S., RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. (1998) *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 61: 65-131.

Ghosh S.K., Paik W.K., Kim S., Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein- and histone-specific enzyme. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 19024-33.

Goldstein G., Isolation of bovine thymine: a polypeptide hormone of the thymus. (1974) *Nature.* 247: 11-4.

Goldstein A.L., Low T.L., McAdoo M., McClure J., Thurman G.B., Rossio J., Lai C.Y., Chang D., Wang S.S., Harvey C., Ramel A.H., Meienhofer J., Thymosin alpha1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 725-9.

Habenicht A., The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemistry, structure, occurrence and evolution. (1997) *Biol. Chem.* 378: 1413-9.

Hänsch G.M., Einführung in die Immunbiologie. (1986) Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.

Hancock R.E., Scott M.G., The role of antimicrobial peptides in animal defenses. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 8856-61.

Hancock R.E., Diamond G., The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. (2000) *Trends Microbiol.* 8: 402-10.

Hancock R.E., Lehrer R., Cationic peptides: a new source of antibiotics. (1998) Trends Biotechnol. 16: 82-8.

Hancock R.E., Nair P., Cationic antimicrobial peptide antibiotics. (2000) Curr. Opin. Anti-infective Investig. Drugs. 2: 140-144.

Hancock R.E., Peptide antibiotics. (1997) Lancet. 349: 418-22.

Hancock R.E., Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. (2000) Expert. Opin. Investig. Drugs. 9: 1723-9.

Haynes B.F., Markert M.L., Sempowski G.D., Patel D.D., Hale L.P., The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18: 529-60.

Haynes B.F., Hale L.P., The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components. (1998) Immunol Res. 18: 175-92.

Heinz F., Freimuller B., Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human tissues. (1982) Methods Enzymol. 89 Pt D: 301-5.

Helmerhorst E.J., Reijnders I.M., van 't Hof W., Veerman E.C., Nieuw Amerongen A.V., A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. FEBS Lett. 1999; 449: 105-11.

Hessler R.J., Blackwood R.A., Brock T.G., Francis J.W., Harsh D.M., Smolen J.E., Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a Ca²⁺-dependent fusogen in human neutrophil cytosol. (1998) J. Leukoc. Biol. 63: 331-6.

Hirsch J.G., Bactericidal action of histone. (1958) J. exp. Med. 108: 925-944.

Islam D., Bandholtz L., Nilsson J., Wigzell H., Christensson B., Agerberth B., Gudmundsson G., Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. (2001) *Nat. Med.* 7: 180-5.

Jang J.J., Ho H.K., Kwan H.H., Fajardo L.F., Cooke J.P., Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of asymmetric dimethylarginine. (2000) *Circulation.* 102: 1414-9.

Johnston, N., Agriculture and Antibiotics. *Modern Drug Discovery.* (2000) American Chemical Society. September: 21-22

Jolles P., Charlemagne D., Petit J.F., Maire A.C., Jolles J., (1965) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47: 2241-2259.

Keokitichai S., Wrigglesworth J.M., Association of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the membrane of the intact human erythrocyte. (1980) *Biochem. J.* 187: 837-41.

Kim H.S., Yoon H., Minn I., Park C.B., Lee W.T., Zasloff M., Kim S.C., Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I. (2000) *J. Immunol.* 165: 3268-3274.

Kook A.I., Yakir Y., Trainin N., Isolation and partial chemical characterization of THF, a thymus hormone involved in immune maturation of lymphoid cells. (1975) *Cell. Immunol.* 19: 151-7.

Krensky A.M., Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. (2000) *Biochem. Pharmacol.* 59: 317-20.

Latham P.W., Therapeutic peptides revisited. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17: 755-7.

Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S.L., Jackson R., Eisenhauer P., Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. (1991) *J. Immun. Methods* 137: 167-173.

Levy S.B., Antimicrobial resistance: bacteria on the defence. Resistance stems from misguided efforts to try to sterilise our environment. (1998) *B.M.J.* 317: 612-3.

Li C., Ai L.S., Lin C.H., Hsieh M., Li Y.C., Li S.Y., Protein N-arginine methylation in adenosine dialdehyde-treated lymphoblastoid cells. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.* 351: 53-9.

Liepke C., Zucht H.D., Forssmann W.G., Standker L., Purification of novel peptide antibiotics from human milk. (2001) *J. Chromatogr. B.* 752: 369-377.

Lin A., Nguyen T., Miller W.M., A Rapid Method for Counting Cell Nuclei Using a Particle Sizer/Counter. (1991) *Biotech. Techniques* 12: 153-156.

Lin W.J., Gary J.D., Yang M.C., Clarke S., Herschman H.R., The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 15034-44.

Lin W., Gu J., Shi J., Jin W., Fu S., Huang Q., Dong H., Yu Y., Fu G., Wang Y., Chen Z. Han Z., A novel gene expressed in human hypothalamus. (1998) Chinese National Human Genome Center at Shanghai, Guo Shoujing Rd. 351, Zhangjiang Hi-Tech Park, Pudong, Shanghai 201203, P. R. China.

Liu C., Gelius E., Liu G., Steiner H., Dziarski R., Mammalian peptidoglycan recognition protein binds peptidoglycan with high affinity, is expressed in neutrophils, and inhibits bacterial growth. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 24490-24499.

Mabuchi A., Kanamori S., Yokomuro K., Kimura Y., Partial purification, physicochemical characterization and biological function of a rosette-decreasing factor (RDF) extracted from guinea pig thymus. (1979) *Microbiol. Immunol.* 23: 669-78.

Manzi A.E., Norgard-Sumnicht K, Argade S., Marth J.D., van Halbeek H., Varki A., Exploring the glycan repertoire of genetically modified mice by isolation and profiling of the

major glycan classes and nano-NMR analysis of glycan mixtures. (2000) *Glycobiology*. 10: 669-89.

Marchuk D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F.S., Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 1154.

Meyer-Siegler K., Mauro D.J., Seal G., Wurzer J., deRiel J.K., Sirover M.A., A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 8460-4.

Miller B.F., Abrams R., Dorfman A., Klein M., Antibacterial properties of protamines and histone. (1942) *Science* 96: 428-431.

Miller R.V., Gentransfer zwischen Bakterien in der Natur. (1998) *Spektrum der Wissenschaften*. März: 50-56.

Moll U.M., Functional histology of the neuroendocrine thymus. (1997) *Microsc. Res. Tech.* 38: 300-10.

Morozov V.G., Khavinson V.K., Natural and synthetic thymic peptides as therapeutics for immune dysfunction. (1997) *Int. J. Immunopharmacol.* 19: 501-5.

Najbauer J., Johnson B.A., Young A.L., Aswad D.W., Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 10501-9.

Nakajima T., Matsuoka Y., Kakimoto Y., Isolation and identification of N-G-monomethyl, N-G, N-G-dimethyl- and N-G,N' G-dimethylarginine from the hydrolysate of proteins of bovine brain. (1971) *Biochim. Biophys. Acta.* 230: 212-22.

Paik W.K., Kim S., Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. (1968) *J. Biol. Chem.* 243: 2108-14.

Park C.B., Kim M.S., Kim S.C., A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 408-13.

Park C.B., Yi K.S., Matsuzaki K., Kim M.S., Kim S.C., 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. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 8245-50.

Park I.Y., Park C.B., Kim M.S., Kim S.C., Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. (1998) *FEBS Lett.* 437: 258-62.

Picker L.J., Butcher E.C., Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10: 561-91.

Pohlmeyer K., Broer J., Mayer G., Gumz E., Wiederhold F., Caliebe A., Wick R., Siede H., Muhlhard W., Behnke B., Beuth J., The recombinant human histones H1 zero and H1.2 cause different toxicity profiles on the human leukemia cell line K562. (2000) *Anticancer Res.* 20: 2499-503.

Price C.M., McCarty G.A., Pettijohn D.E., NuMA protein is a human autoantigen. (1984) *Arthritis Rheum.* 27: 774-9.

Rao A.G., Antimicrobial peptides. (1995) *Mol. Plant Microbe. Interact.* 8: 6-13.

Rawal N., Rajpurohit R., Paik W.K., Kim S., Purification and characterization of S-adenosylmethionine-protein-arginine N-methyltransferase from rat liver. (1994) *Biochem. J.* 300 (Pt 2): 483-9.

Ridsdale R.A., Beniac D.R., Tompkins T.A., Moscarello M.A., Harauz G., Three-dimensional structure of myelin basic protein. II. Molecular modeling and considerations of predicted structures in multiple sclerosis. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 4269-75.

Robinette D., Wada S., Arroll T., Levy M.G., Miller W.L., Noga E.J., Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. (1998) *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 467-75.

Rose F.R., Bailey K., Keyte J.W., Chan W.C., Greenwood D., Mahida Y.R., Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. (1998) *Infect. Immun.* 66: 3255-63.

Saberwal G., Nagaraj R., Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. (1994) *Biochim. Biophys. Acta.* 1197:109-31.

Saiki R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. (1985). *Science.* 230: 1350-1354.

Sanger F., Nicklen S., Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.

Sapp M., Konig H., Riedel H.D., Richter A., Knippers R., A newly detected class of mammalian single strand-specific DNA-binding proteins. Effects on DNA polymerase alpha-catalyzed DNA synthesis. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 1550-6.

Sapp M., Knippers R., Richter A. DNA binding properties of a 110 kDa nucleolar protein. (1986) *Nucleic. Acids Res.* 14: 6803-20.

Sapp M., Richter A., Weisshart K., Caizergues-Ferrer M., Amalric F., Wallace M.O., Kirstein M.N., Olson M.O., Characterization of a 48-kDa nucleic-acid-binding fragment of nucleolin. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179: 541-8.

Scannon P.J., Recombinant 21 kDa N-Terminal fragment of human bacteridal/permeability-increasing protein (rBPI21): progress in clinic. (1999) *J. Endotoxin. Res.* 5: 209-212.

Schlegel H.G., Allgemeine Mikrobiologie. (1992) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Schulz-Knappe P., Schrader M., Standker L., Richter R., Hess R., Jurgens M., Forssmann W.G., Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. (1997) *J. Chromatogr. A.* 776: 125-32.

Scott M.G., Yan H., Hancock R.E., Biological properties of structurally related alpha-helical cationic antimicrobial peptides. (1999) *Infect. Immun.* 67: 2005-9.

Seiler P., Standker L., Mark S., Hahn W., Forssmann W.G., Meyer M. Application of a peptide bank from porcine brain in isolation of regulatory peptides. (1999) *J. Chromatogr. A.* 852: 273-283.

Selsted M.E., Novotny M.J., Morris W.L., Tang Y.Q., Smith W., Cullor J.S., Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 4292-5.

Selsted M.E., Tang Y.Q., Morris W.L., McGuire P.A., Novotny M.J., Smith W., Henschen A.H., Cullor J.S., Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 6641-8.

Sirover M.A., New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* 1432: 159-84.

Sorensen O., Bratt T., Johnsen A.H., Madsen M.T., Borregaard N., The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 22445-51.

Sparks C.A., Bangs P.L., McNeil G.P., Lawrence J.B., Fey E.G.. Assignment of the nuclear mitotic apparatus protein NuMA gene to human chromosome 11q13. (1993) *Genomics.* 17: 222-4.

Srivastava M., Fleming P.J., Pollard H.B., Burns A.L., Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. (1989) FEBS Lett. 250: 99-105.

Straus E., Ryder S., Eng J., Yalow R.S., Nature of immunoreactive CCK in rat and pig brain. (1981) Peptides. 2: 89-92.

Taimen P., Viljamaa M., Kallajoki M., Preferential expression of NuMA in the nuclei of proliferating cells. (2000) Exp. Cell Res. 256: 140-9.

Tang Y.Q., Yuan J., Osapay G., Osapay K., Tran D., Miller C.J., Ouellette A.J., Selsted M.E., A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. (1999) Science. 286: 498-502.

Thomas J.O., Histone H1: location and role. (1999) Curr. Opin. Cell Biol. 11: 312-7.

Tossi A., Sandri L., Giangaspero A., Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. (2000) Biopolymers. 55: 4-30.

Turk B.E., Jiang H., Liu J.O., Binding of thalidomide to alpha1-acid glycoprotein may be involved in its inhibition of tumor necrosis factor alpha production. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 7552-6.

Vaara M., Agents that increase the permeability of the outer membrane. (1992) Microbiol. Rev. 56: 395-411.

Vogel G., Angermann, H., dtv-Atlas zur Biologie. (1992) Band 1

Wehner R., Gehring W., Zoologie. (1990) Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

Weissmann N., Graf L.H., Studies on infection with *Bacillus anthracis*. VII. A comparison of the antibacterial effects of calf thymus histone and a quarternary ammonium cationic detergent on *B. anthracis*. (1947) J. Infect. Dis. 80: 145-148.

Werneck C.C., Oliveira-Dos-Santos A.J., Silva L.C., Villa-Verde D.M., Savino W., Mourao P.A., Thymic epithelial cells synthesize a heparan sulfate with a highly sulfated region. (1999) *J. Cell Physiol.* 178: 51-62.

Widom J., Chromatin structure: linking structure to function with histone H1. (1998) *Curr. Biol.* 8: R788-91.

Wolffe A.P., Histone H1. (1997) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 1463-6.

Wu H., Zhang G., Ross C.R., Blecha F., Cathelicidin gene expression in porcine tissues: roles in ontogeny and tissue specificity. (1999) *Infect. Immun.* 67: 439-42.

Xu X., Cooper L.G., DiMario P.J., Nelson J.W., Helix formation in model peptides based on nucleolin TPAKK motifs. (1995) *Biopolymers.* 35: 93-102.

Young P.R., Waickus C.M., Time dependence of the methylation of myelin basic protein from bovine brain; evidence for protein-methylarginine demethylation. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 200-4.

Young P.R., Grynspan F., Analysis of methylated amino acids by high-performance liquid chromatography: methylation of myelin basic protein. (1987) *J. Chromatogr.* 421: 130-5.

Zeng C., NuMA: a nuclear protein involved in mitotic centrosome function. (2000) *Microsc. Res. Tech.* 49: 467-77.

Zhang G., Wu H., Shi J., Ganz T., Ross C.R., Blecha F., Molecular cloning and tissue expression of porcine beta-defensin-1. (1998) *FEBS Lett.* 424: 37-40.

Zhao C., Wang I., Lehrer R.I., Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. (1996) *FEBS Lett.* 396: 319-22.

Zhdan-Pushkina S.M., Dronova N.V., Differential sensitivity of bacteria to histones. (1976) Mikrobiologiya. 45: 60-6.

Zucht H.D., Raida M., Adermann K., Mägert H.J., Forssmann W.G., Human beta-defensin-1: Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. (1995) FEBS Lett. 372: 185-188.

6 Anhang

6.1 Geräte und Chemikalien

Waagen:

Analytik-Waage AC 120 S

Sartorius, Göttingen

Laborwaage MC-1

Sartorius, Göttingen

Thermostaten, Rührer, Inkubatoren:

IKA-Rührwerk RE 162 P

Janke & Kunkel, Staufen

Inkubationsschrank B 6120

Heraeus, Hanau

Labormixer JKA VF 2

Janke & Kunkel, Staufen

Magnetrührer KMO 2

Janke & Kunkel, Staufen

Thermomixer 5436

Eppendorf Laborgeräte, Hamburg

Kulturschüttler Innova TM 4340

New Brunswick, Edison, C.A., USA

Wasserbad 1012

GFL, Burgwedel

Hälde Mixer SB-4

Saro, Stock, Laatzen

Filtration:

Filterpapier 12 - 25 μm und 7 - 12 μm

Schleicher & Schuell, Dassel

Sterilfilter 2 μm

Sartorius, Göttingen

Mini Crossflow

Sartocon, Mannheim

Zentrifugen:

Biofuge 28 RS	Heraeus, Hanau
Centrikon T-142	Kontron, Henningen
Rotixa RP 4200-80	Hettich, Tuttlingen
Sigma 201 m	Heraeus, Hanau
Sigma 6K10-Kühlzentrifuge	Heraeus, Hanau
Speedvac Univapo 150 H	Uniequip, Martinsried

Sonstiges:

pH-Meter CG 804	Schott, Hofheim a. Ts.
Photometer Uvikon 940	Kontron, Henningen
Reinstwasseranlage Milli-Q ^{UF} plus	Millipore, Eschborn
Tiefkühltruhe UF-85-360 T	Colora Meßtechnik, Lorch
Bioclav 3.021001	Schütt Labortechnik, Göttingen
Photometer DU640	Beckman, München
Microplate Autoreader	Biotek Instruments, Winooski

Chromatographiesysteme:

Biocad TM 250	PerSeptive Biosystems, Cambridge
Biocad TM 60	PerSeptive Biosystems, Cambridge
Biocad TM Sprint	PerSeptive Biosystems, Cambridge
Kontron, Henningen	
2 Doppelkolbenpumpen Type 420	
Durchflußphotometer Type 432	
Mischkammer M 494	
Merck Sep-Tech	R & S Technology, Wakefield
Fraktionssammler 2110	BioRad, München

Aminosäureanalytik:

Aminoquant 1090 II

Hewlett, Packard

Edman Sequenzierung:494 Protein sequencer / ProciseTM Protein sequencing

Applied Biosystems, Weiterstadt

785 A Absorbance Detector

Software 610 A 2.1

Massenspektrometrie:

LCQ

ThermoQuest, Egelsbach

LaserTec RBT II

Perseptive Biosystems / Vestec,
Houston**Kapillaronenelektrophorese:**

Kapillaronenelektrophoresesystem P/ACE 2100 Beckman, München

fused silica capillary TSP 075375

Composite Metal Services Ltd. UK

Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) bezogen. Es wurden ausschließlich Chemikalien und Lösungsmittel in der Reinheitsstufe p.a. verwendet. Die organischen Lösungsmittel für die HPLC wurden von der Firma Merck mit dem Reinheitsgrad "prepsolv" oder "gradient grade" bezogen.

Standard-Pufferlösungen:

Natriumphosphatpuffer:	10 mM Natriumhydrogenphosphat 10 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7,2
Tris-HCl-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 7,4
Ammoniumcarbonatpuffer:	100 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,0

Auftragspuffer für MALDI-MS:	2,5 mg CHC 2,5 mg Fucose 250 µl TFA (0,1 %) 250 µl ACN (100 %)
-------------------------------------	---

Bakterienstämme und Zelllinie:

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellen (DSMZ) in Braunschweig bezogen.

Bacillus subtilis DSM 10^T (ATCC 6051)

Micrococcus luteus DSM 348 (ATCC 9341)

Pseudomonas fluorescens DSM 6147

Staphylococcus carnosus TM 300 wurde von F. Goetz (Universität München), *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 von J. Zimmer (Laborarztpraxis Hannover), *Escherichia coli* BL21 von J. Alves (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

CLTT1

BioMerieux, Paris

Computer, Programme und Statistik

Mit Hilfe eines Personal-Computers und der Programme Sequencher™ Version 3.1 wurden Translationen sequenzierter DNA und DNA- bzw. Protein-Vergleiche durchgeführt. Zum Durchsuchen von öffentlichen Datenbanken via Internet fand der NCBI-Server und der BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) Anwendung. Zur Erstellung dieser Dissertation dienten weiterhin Computerprogramme zur Text- und Graphikbearbeitung (Microsoft® Office und AdobePhotoshop). Daten von mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit 3-6 Replika wurden statistisch mit Microsoft®-Excel 97 SR-1 ausgewertet. Als Standardabweichung (SD) wurde angegeben:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_{\text{Mittelwert}})^2}{n - 1}}$$

mit y_i = Einzel-Meßwerte; $y_{\text{Mittelwert}}$ = Summe der Einzel-Meßwerte, n = Anzahl der Replika.

6.2 Dokumentation der Reinigung der antimikrobiellen Peptide

Im folgenden ist die Reinigung der in dieser Arbeit identifizierten antimikrobiellen Peptide aus pH-Pool 4 Fraktion 8 der Kalbsthymus-Peptidbank dokumentiert. Die Reinigung der Peptide erfolgte unter Anwendung des in Kapitel 3.3 dargestellten Trennverfahrens. Die Fraktionen wurden eine entsprechende Gewebeäquivalentmenge entnommen, lyophilisiert und im Radial-Diffusionshemmtest eingesetzt. Die antimikrobielle Aktivität wurde in Unit angegeben. Eine Unit entspricht einem Hemmhofradius von 0,1 mm im Radial-Diffusionshemmtest (Kapitel 2.4.3.1). In den Abbildungen zeigen die grauen Balken die antimikrobielle Aktivität der HPLC-Fraktionen. Die Fraktionen mit der höchsten antimikrobiellen Aktivität wurden vereinigt und sind im Chromatogramm angegeben. In den folgenden Anhängen zeigen die Abbildungen A bis F die sechs zur Reinigung erforderlichen HPLC-Trennschritte, die Abbildungen G und H die Reinheitskontrolle der aktiven Fraktionen mittels Kapillarzonelektrophorese (CE) sowie die MALDI-Massenspektren der gereinigten Peptide. Zur Reinigung von bGAPDH (104-122) waren nur vier Chromatographieschritte notwendig. Da die ersten fünf Reinigungsschritte bei allen Reinigungen beibehalten wurden, sind diese hier zusammengefaßt. Der sechste Chromatographieschritt, mit welchem die Peptide isoliert werden konnten, wurde mit verschiedenen RP-Säulen durchgeführt. Diese sind jeweils unter den Abbildungen angegeben.

A) RP-Chromatographie von pH-Pool 4 Fraktion 8 der Kalbsthymus-Peptidbank.

Gewebeäquivalent: 16 g

Säule: Bakerbond, RP C-18, 47 x 300 mm, 300 Å, 15 - 30 µm. Fließmittel: A: 10 mM HCl, B: 80 % Acetonitril / 10 mM HCl. Bei einer Flußrate von 40 ml/min wurde zur Elution folgender Gradient verwendet: 10 - 60 % B in 50 min. Das Chromatogramm wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet.

B) Rechromatographie der antibakteriell wirksamen Fraktion in einem zweiten Reversed-Phase-HPLC Trennungsschritt.

Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 40 g

Säule: siehe A). Fließmittel A: 20 % MeOH / 10 mM HCl, B: Methanol / 10 mM HCl, Flußrate: 30 ml/min. Gradient: 10 - 50 % B in 57 min. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

C) Kationenaustausch-Chromatographie der antimikrobiell wirksamsten Fraktionen.

Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 100 g

Säule: Biotek PrepPak, 10 x 125 mm, 1000 Å, 7 µm, Fließmittel: A: 50 mM KH₂PO₄, B: 1,5 M KCl / 50 mM KH₂PO₄, Gradient: 10 – 60 % B in 50 min, Flußrate: 2 ml/min, Detektionswellenlänge: 230 nm.

D) Rechromatographie der antibakteriell wirksamen Fraktionen in einem Reversed-Phase-HPLC Trennungsschritt.

Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 200 g

Säule: Pharmacia Source RP-C15, 10 x 250 mm, 120 Å, 15 µm, Fließmittel A: 0,1 % TFA, B: 80 % ACN / 0,085 % TFA, Gradient: 20 - 50 % B in 60 min, Flußrate: 1,8 ml/min, Detektionswellenlänge: 214 nm.

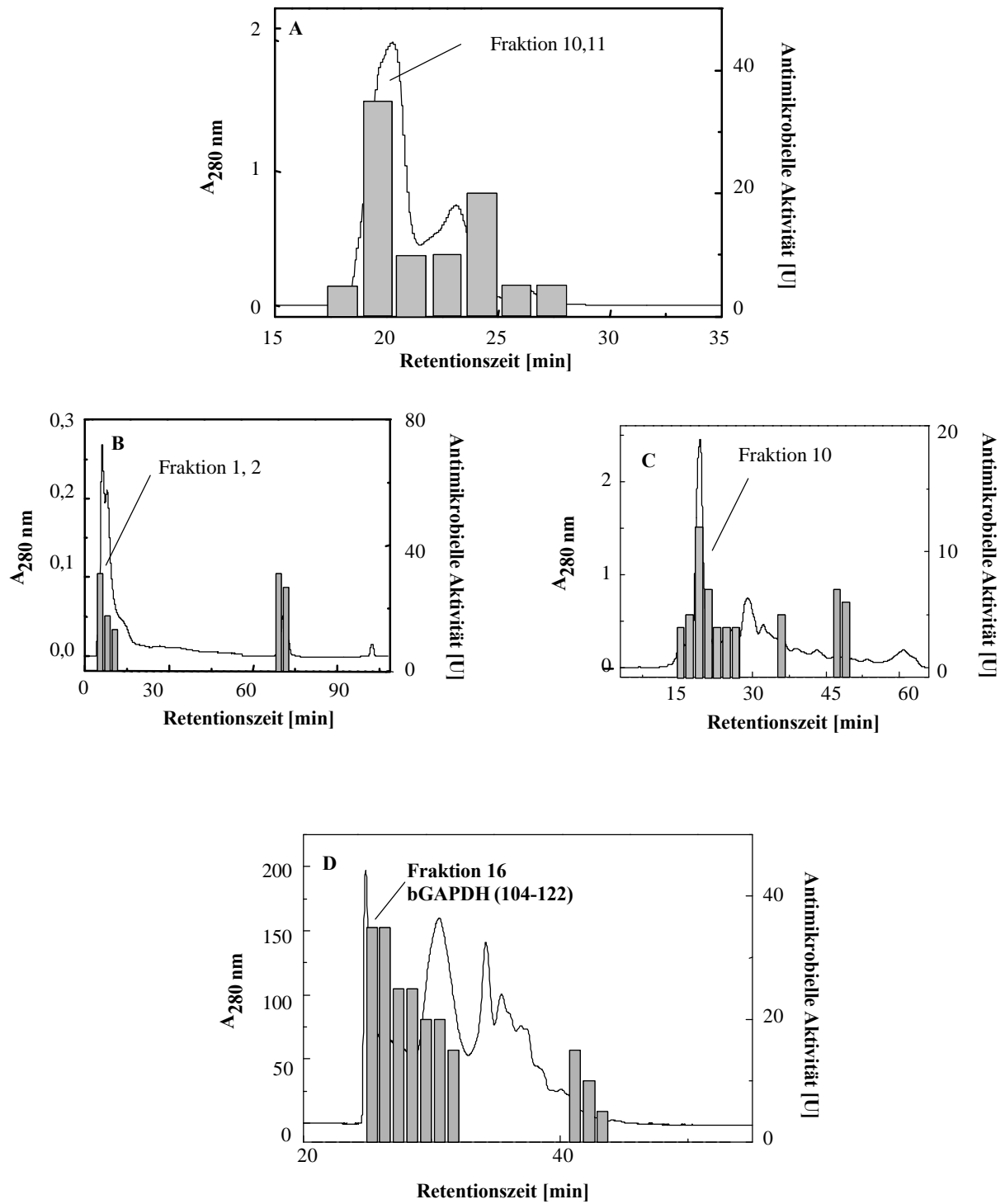
E) Kationenaustausch-Chromatographie der HPLC-Fractionen mit höchster antimikrobieller Aktivität.

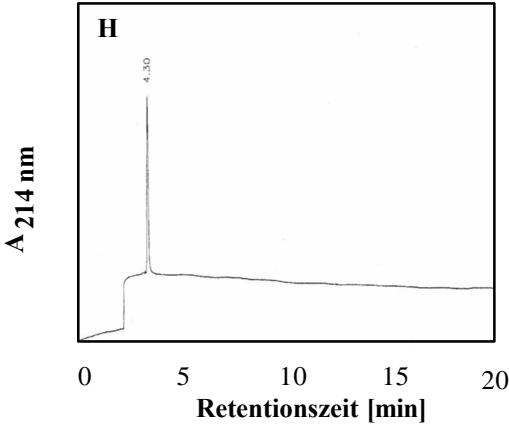
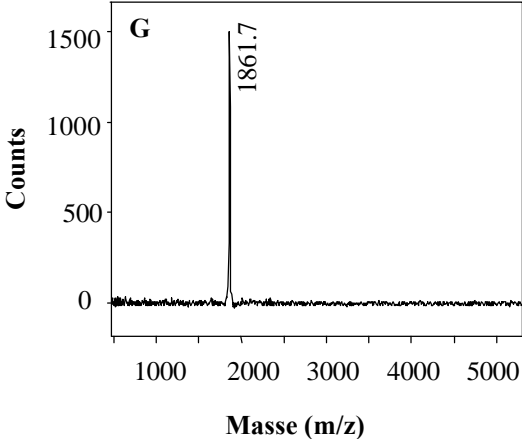
Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 800 g

Säule: Parcosil Pepkat, 4 mm x 50 mm, 300 Å, 5 µm, Fließmittel A: 10 mM NaH₂PO₄ pH 4,5, Fließmittel B: 1 M NaCl in Fließmittel A, Flußrate: 0,75 ml/min, Gradient: 0 - 60 % B in 60 min. Detektionswellenlänge: 214 nm.

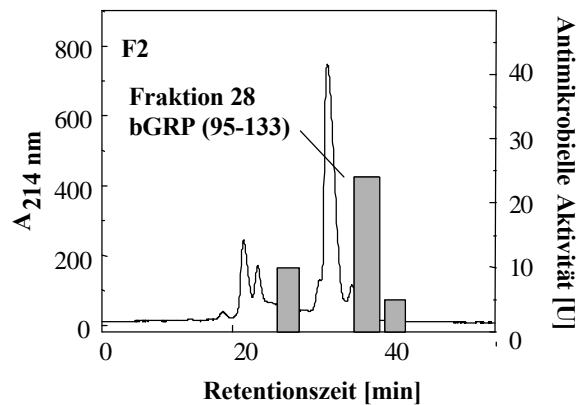
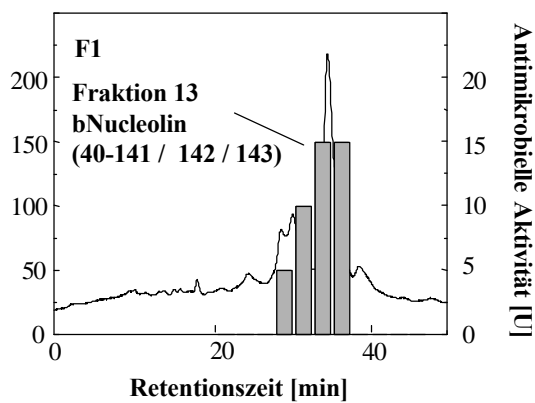
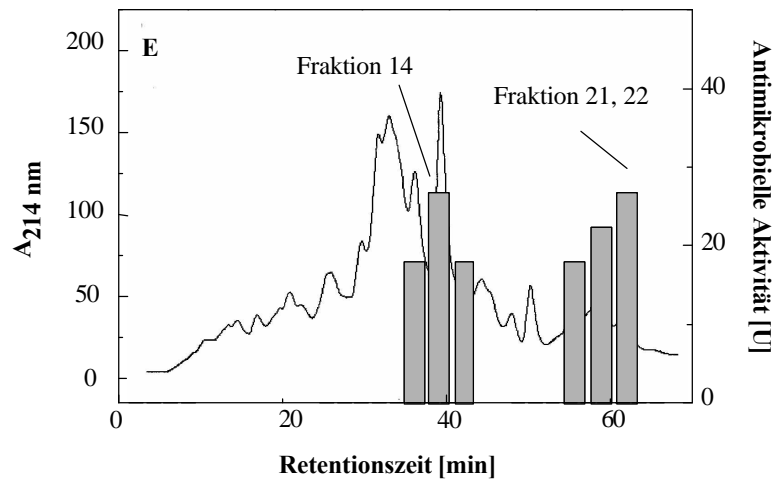
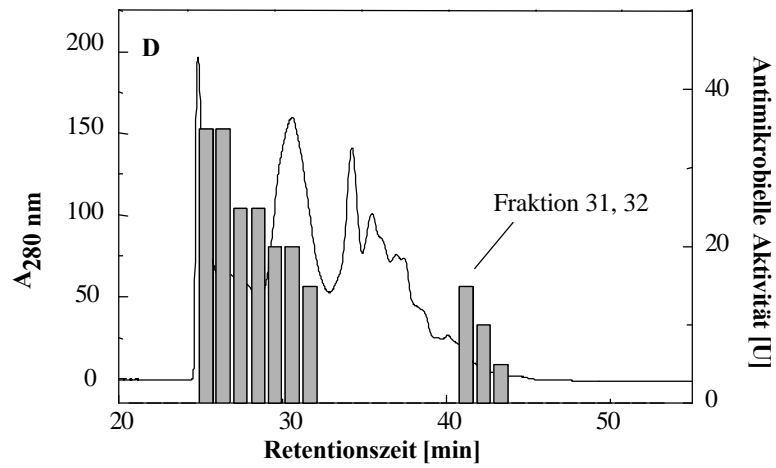
G) MALDI-Massenspektrum.**H) Analyse des Reinheitsgrades des antimikrobiell aktiven Peptides durch Kapillarzonenelektrophorese.**

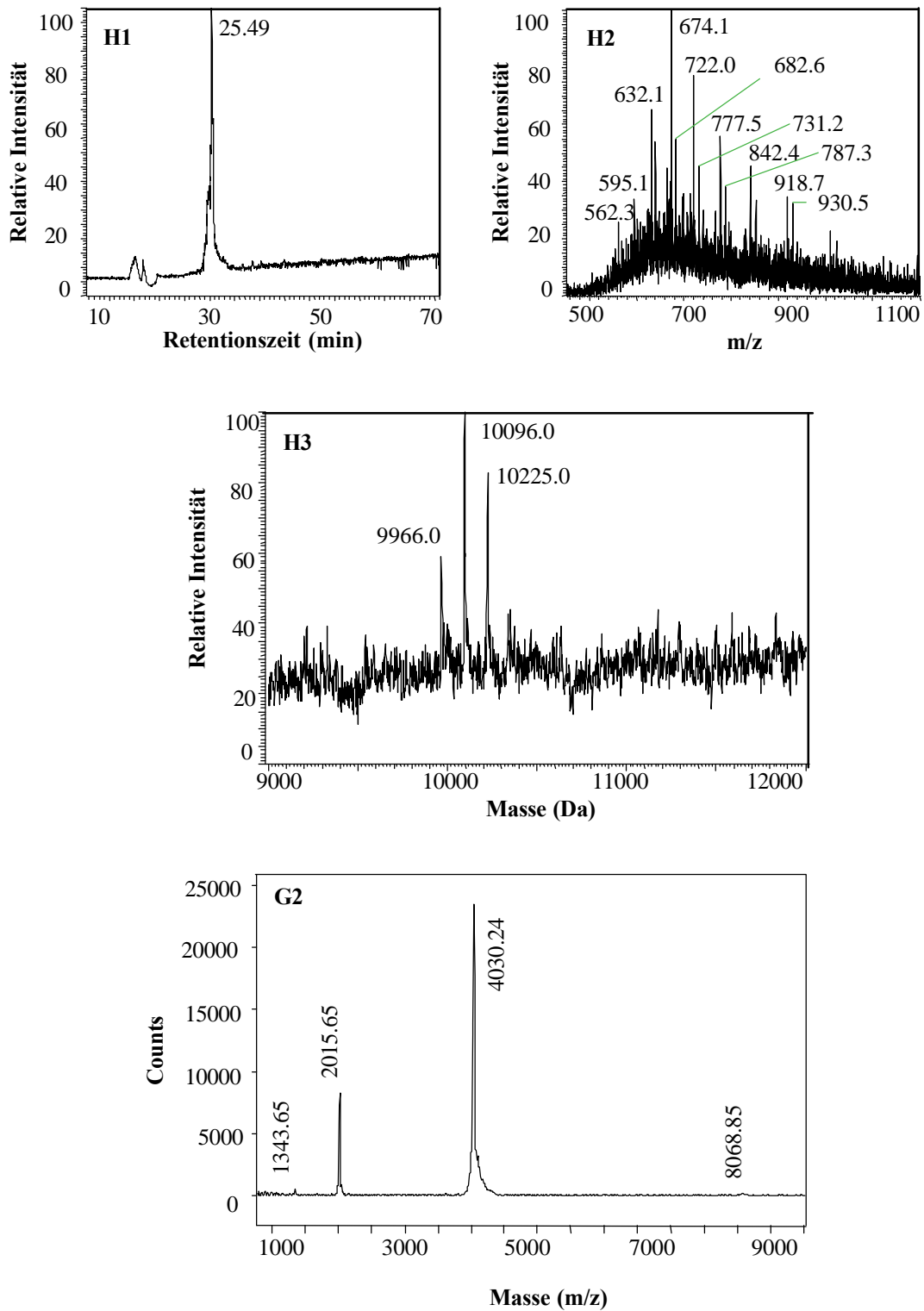
6.2.1 Reinigung von bGAPDH (104-122)





6.2.2 Reinigung von bGRP (95-133) und bNucleolin (40-141 / 142 / 143)





D) Rechromatographie der antibakteriell wirksamen Fraktionen in einem Reversed-Phase-HPLC Trennungsschritt.

Das Chromatogramm entspricht dem 4. Reinigungsschritt (vgl. Anhang 6.2.2). Die Fraktionen 31 und 32 wurden vereinigt und rechromatographiert.

F1) Rechromatographie der antimikrobiell wirksamen Fraktionen 21 und 22 zur Reindarstellung von bNucleolin (40-141 / 142 / 143).

Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 5000 g

Säule: Zorbax RP-C3, 4,6 mm x 250 mm, 100 Å, 5 µm,. Fließmittel A: 0,1 % TFA, Fließmittel B: 80 % ACN in 0,085 % TFA, Flußrate: 0,75 ml/min, Gradient: 15 - 50 % B in 75 min. Detektionswellenlänge: 214 nm.

F2) Rechromatographie der antimikrobiell wirksamen Fraktion 14 zur Reindarstellung von bGRP (95-133).

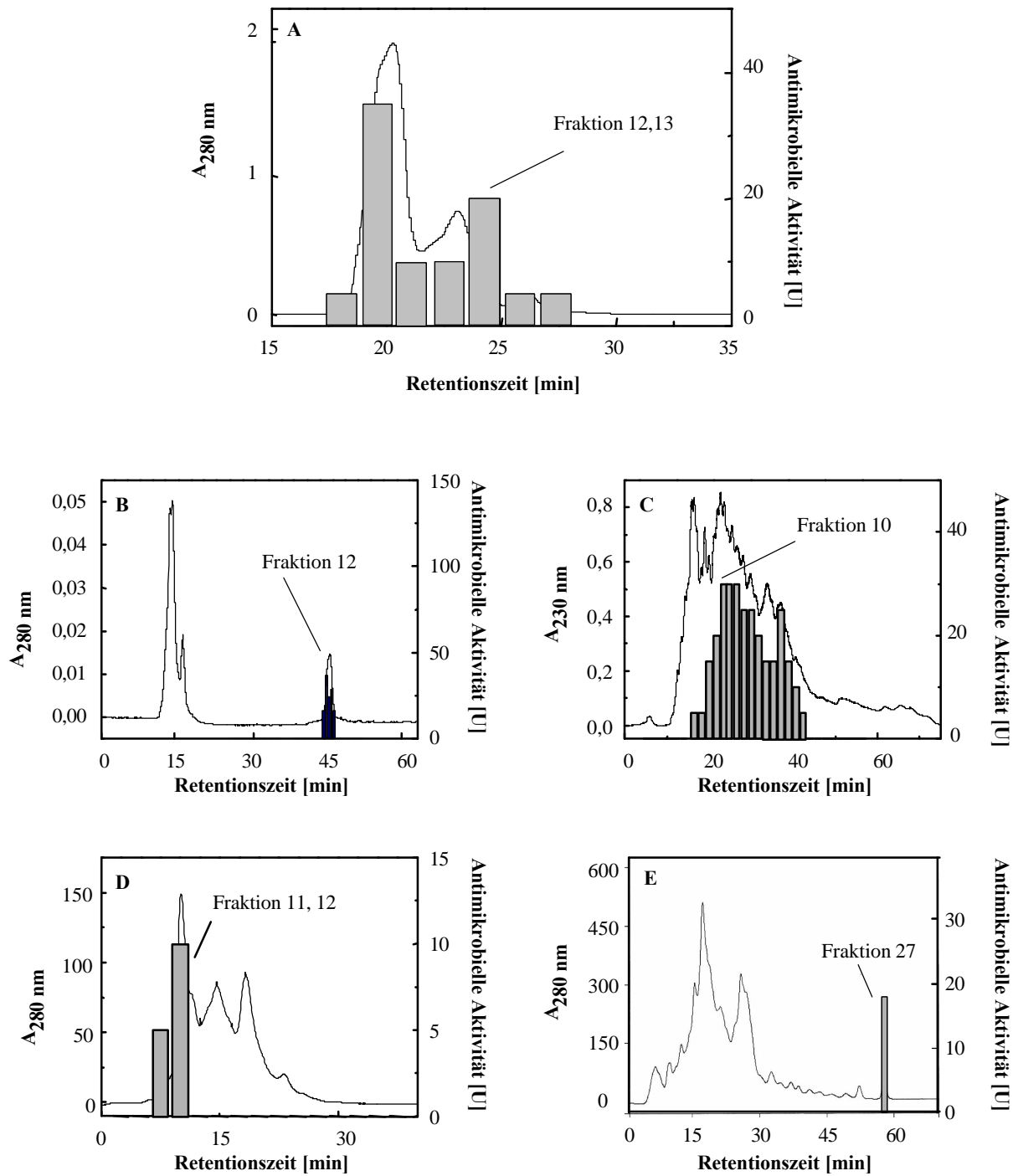
Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 5000 g

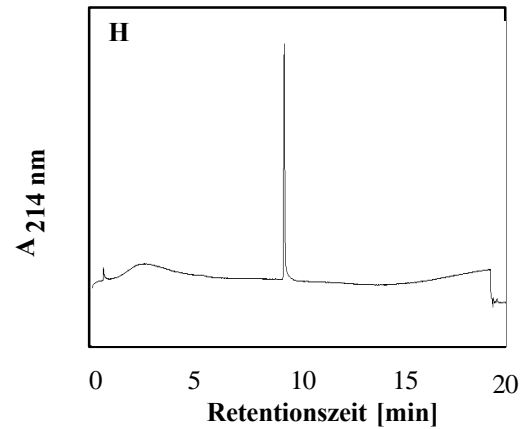
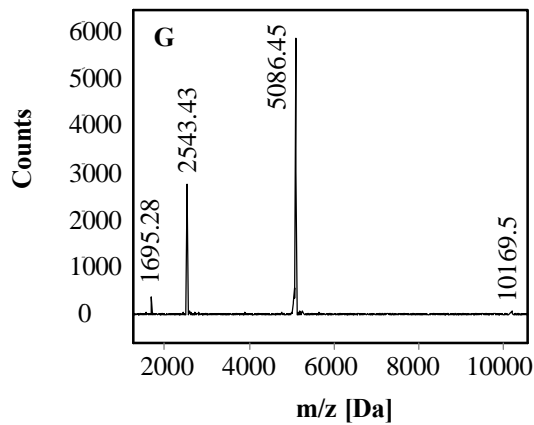
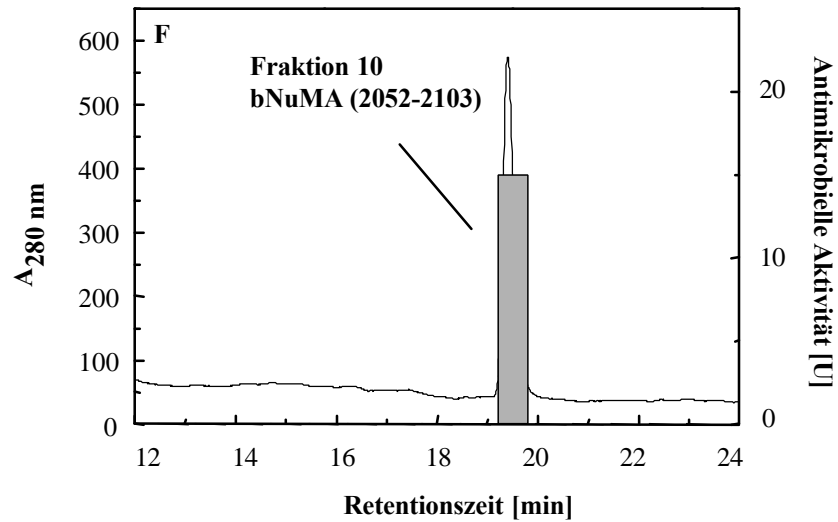
Säule: Zorbax RP-C3, 4,6 mm x 250 mm, 100 Å, 5 µm,. Fließmittel A: 0,1 % TFA, Fließmittel B: 80 % ACN in 0,085 % TFA, Flußrate: 0,75 ml/min, Gradient: 20 - 40 % B in 67 min. Detektionswellenlänge: 214 nm.

G2) MALDI-Massenspektrum von bGRP (95-133).

H1-H3) LC-MS zur Reinheitsüberprüfung und Massebestimmung von bNucleolin (40-141 / 142 / 143).

6.2.3 Reinigung von bNuMA (2052-2103)



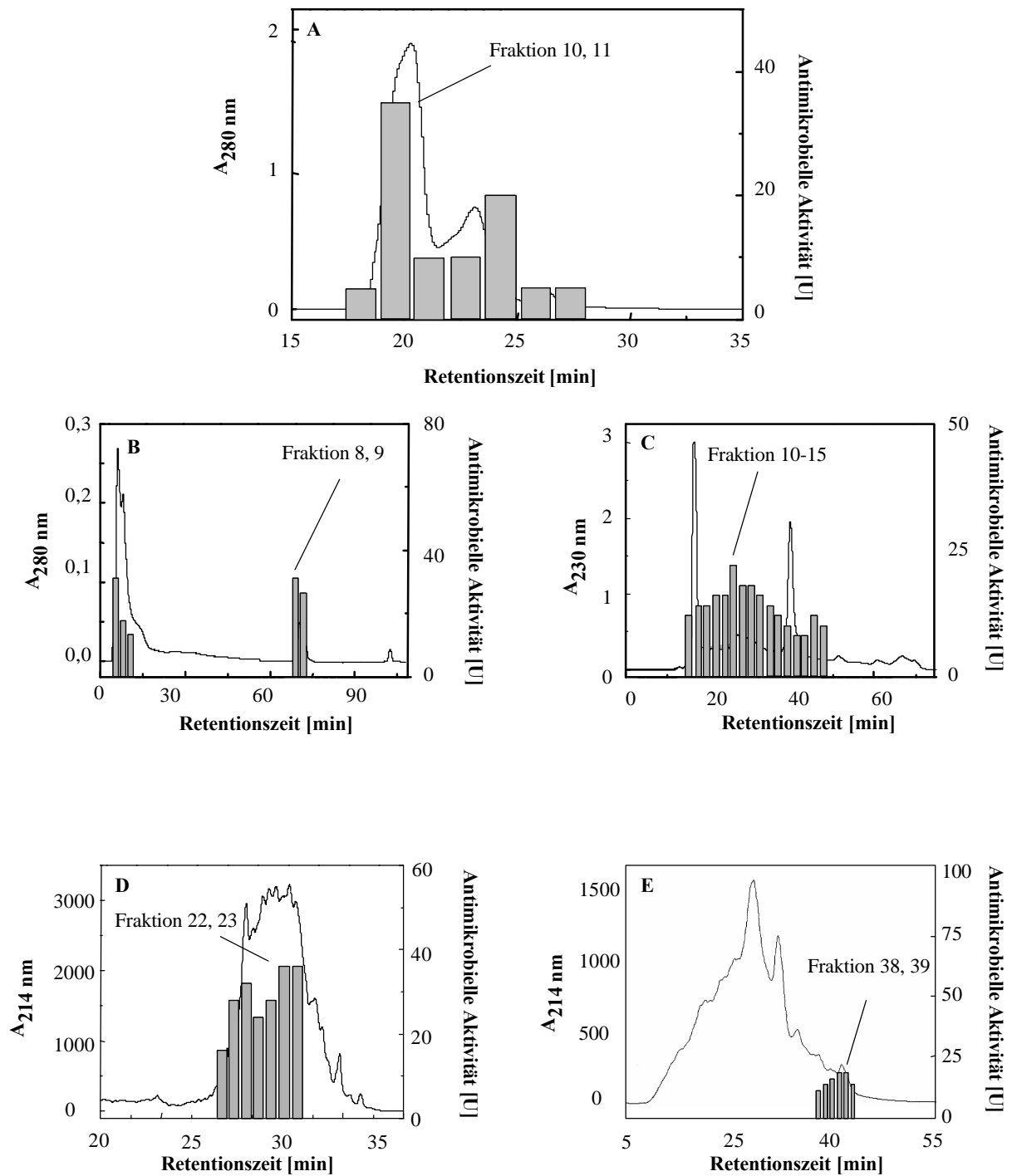


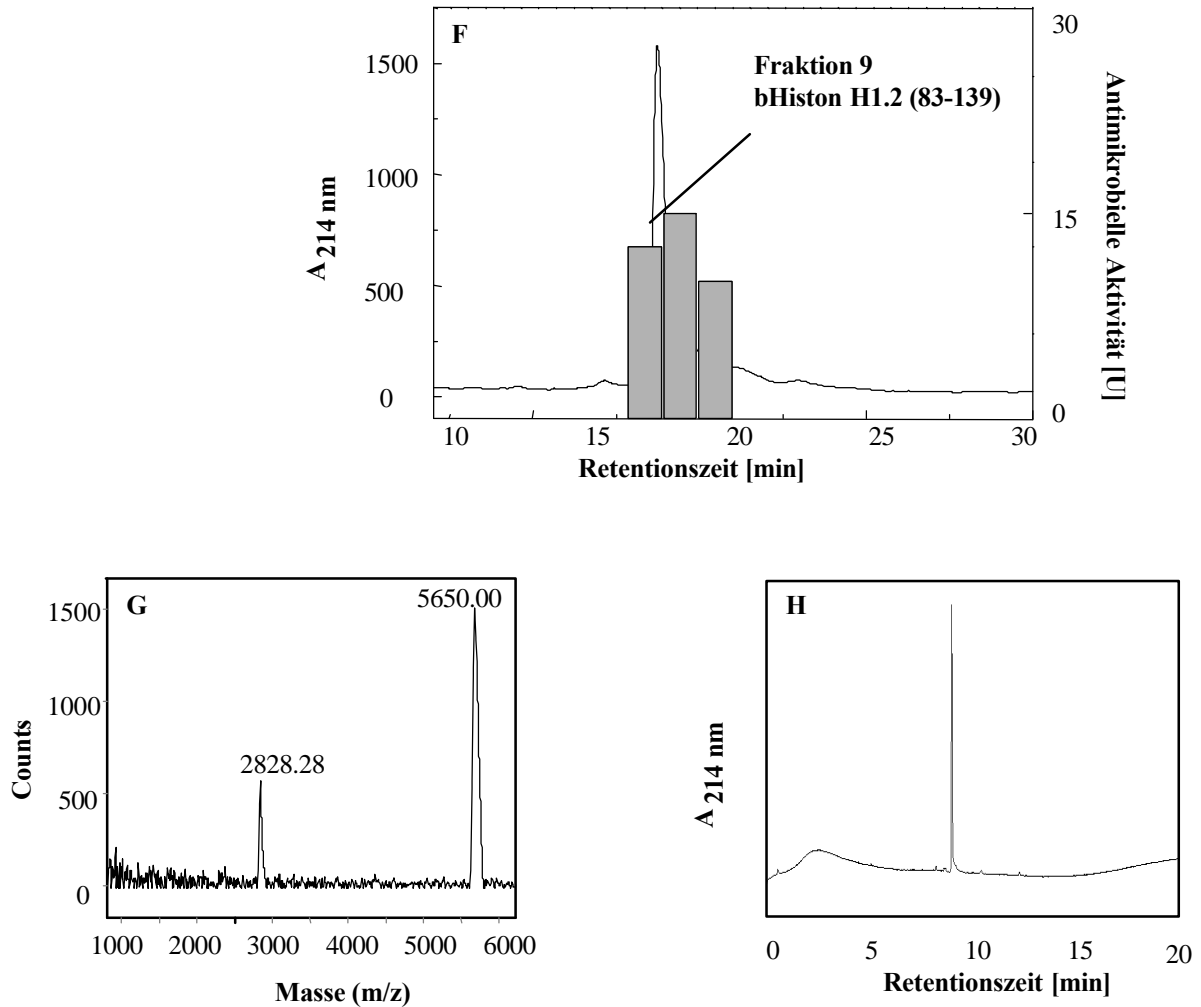
F) Rechromatographie der antimikrobiell wirksamen Fraktion 27 zur Reindarstellung von bNuMA (2052-2103).

Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 2000 g

Säule: VYDAC RP-C18, 4,6 mm x 250 mm, 100 Å, 5 µm, Fließmittel A: 0,1 % TFA, Fließmittel B: 80 % ACN in 0,085 % TFA, Flußrate: 0,7 ml/min, Gradient: 25 - 40 % B in 45 min. Detektionswellenlänge: 214 nm.

6.2.4 Reinigung von bHiston H1.2 (83-139)





F) Rechromatographie der antimikrobiell wirksamen Fraktionen 38 und 39 zur Reindarstellung von bHiston H1.2 (83-139).

Eingesetzte Gewebeäquivalentmenge im Radial-Diffusionshemmtest: 1600 g

Säule: ReprosilPur RP-C18, 4,6 mm x 250 mm, 100 Å, 5 µm, Fließmittel A: 0,1 % TFA, Fließmittel B: 80 % ACN in 0,085 % TFA, Flußrate: 0,75 ml/min, Gradient: 20 - 35 % B in 45 min. Detektionswellenlänge: 214 nm.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Wolf-Georg Forssmann für die Möglichkeit, diese Arbeit in den IPF-Forschungslaboratorien in Hannover anfertigen zu können sowie seine freundliche Unterstützung.

Frau PD Dr. Gerlinde Kretzmer danke ich für die Übernahme des Referates sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Karl Schügerl für die Übernahme des Korreferates.

Für die kompetente Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit möchte ich vor allem Frau Dr. Cornelia Liepke danken, die mir bei allen Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Herrn Prof. Dr. Markus Meyer danke ich für die Betreuung und Motivation zu Beginn der Arbeit.

Desweiteren möchte ich Herrn Michael Walden für die Durchführung der LC-MS-Messungen, Frau Jutta Barras-Akhnoukh für die ASA- und CE-Messungen und den Mitarbeitern der Abteilung 2 des IPFs für die nette und freundliche Zusammenarbeit danken.

Herrn Dr. Dirk Motzkus danke ich für die fachliche Unterstützung und Einarbeitung in Fragen der Molekularbiologie und die Durchsicht dieser Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. Knut Adermann und Herrn Andreas Zgraja danke ich für die synthetische Herstellung der Peptide.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des IPFs, besonders Frau Dr. Petra Seiler, Herrn Dr. Harald John, Herrn Dr. Erik Maronde, Frau Janna Heide und den Mädels und Jungs der Abteilungen 1 und 4 für die gute Zusammenarbeit sowie das gute Arbeitsklima.

Für die ständige Diskussionsbereitschaft und aufmunternden Abende danke ich meiner „Bezugsgruppe“, Conny, Michel, Mozi, Petra und Harry.

Recht herzlich danken möchte ich auch meinen Eltern sowie Heinrich Baxmann und Martina Regier, die mir in allen Situationen jederzeit zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Susann Arndt
Geburtsdatum / -ort: 29.05.1970 in Borna
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1976 - 1986 POS „Karl Liebknecht“, Kitzscher
1986 – 1988 EOS „Wilhelm Pieck“, Borna
Schulabschluß: Abitur

Universitäre Ausbildung

Sept. 1988 - Sept. 1990 Lehramtsstudium für Mathematik und Chemie an der Pädagogischen Hochschule Halle/Saale
Okt. 1990 - März 1998 Diplomstudium der Chemie an der Technischen Universität Hannover
April 1998 - Nov. 1998 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der TU Hannover
Studienabschluß: Diplom der Chemie

Promotion

seit Jan. 1999 Promotion am IPF PharmaCeuticals GmbH Hannover
(Aninstitut der Medizinischen Hochschule Hannover)

