

**Der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die  
Aktivität von Mersacidin und  
Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Tim Böttiger**

aus

Neuwied

Bonn 2009

Diese Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Sahl  
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christiane Dahl

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2009  
Erscheinungsjahr: 2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Antimikrobielle Peptide - ein kurzer Überblick . . . . .	1
1.2 Lantibiotika . . . . .	2
1.2.1 Klassifizierung der Lantibiotika . . . . .	3
1.2.2 Wirkungsmechanismen von Lantibiotika . . . . .	5
1.3 Die Peptidoglykanbiosynthese . . . . .	9
1.4 In dieser Arbeit untersuchte antimikrobielle Peptide . . . . .	11
1.4.1 Mersacidin . . . . .	11
1.4.2 Plantaricin C . . . . .	13
1.4.3 Lacticin 481 . . . . .	14
1.4.4 Lacticin 3147 . . . . .	15
1.4.5 Lactococcin 972 . . . . .	17
1.5 Ziel der Arbeit . . . . .	18
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Materialien . . . . .	19
2.1.1 Chemikaliennachweis . . . . .	19
2.1.2 Gerätenachweis . . . . .	20
2.1.3 Nährmedien . . . . .	24
2.1.4 Antibakterielle Substanzen . . . . .	26
2.1.5 Bakterienstämme und ihre Lagerungsbedingungen . . . . .	27
2.2 Mikrobiologische Methoden . . . . .	28
2.2.1 Sterilisationsverfahren . . . . .	28
2.2.2 Anzucht und Wachstumsbedingungen der einzelnen Bakterienstämme . . . . .	29
2.2.3 Agardiffusionstest . . . . .	29
2.2.4 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) . . . . .	30

2.2.5	Antagonisierungstest . . . . .	31
2.2.6	Kalium-Efflux-Experimente mit ganzen Bakterienzellen . . . . .	31
2.3	Biochemische Methoden . . . . .	32
2.3.1	Lantibiotika-Gewinnung . . . . .	32
2.3.2	Membranpräparation von <i>Micrococcus luteus</i> DSM 1790 . . . . .	34
2.3.3	Grobe Aufreinigung von UDP-MurNAc-Pentapeptid . . . . .	35
2.3.4	<i>In vitro</i> Lipid I- und Lipid II-Synthese und -Aufreinigung . . . . .	35
2.3.5	Synthese und Aufreinigung von radioaktiv markiertem Lipid II . . . . .	36
2.3.6	Lipidextraktion . . . . .	37
2.3.7	Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Lipiden . . . . .	37
2.3.8	Phosphat-Test . . . . .	37
2.3.9	Hemmung der MurG-katalysierten <i>in vitro</i> Lipid II-Biosynthese . . . . .	38
2.3.10	Hemmung der PBP2-katalysierten <i>in vitro</i> Peptidoglykanbiosynthese . . . . .	38
2.3.11	Hemmung der FemX-katalysierten <i>in vitro</i> Lipid II-Gly-Synthese . . . . .	39
2.3.12	tRNA-Aufreinigung . . . . .	39
2.3.13	Carboxyfluorescein-Efflux (CF)-Experimente . . . . .	39
2.3.14	Tryptophan-Fluoreszenzmessungen . . . . .	41
2.3.15	Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	42
2.3.16	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	42
2.4	Molekularbiologische Methoden . . . . .	44
2.4.1	Expression und Aufreinigung von rekombinantem PBP2-His <sub>6</sub> aus <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) . . . . .	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1	Peptidextraktion und -aufreinigung . . . . .	47
3.2	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) . . . . .	49
3.3	Untersuchungen zum Einfluss von Ca <sup>2+</sup> -Ionen auf die Aktivität von Lan- tibiotika, die über ein Mersacidin- Lipid II-Bindemotiv verfügen . . . . .	50
3.3.1	Die antimikrobielle Aktivität von Lantibiotika in der Gegenwart von 1,25 mM CaCl <sub>2</sub> . . . . .	50
3.3.2	Hemmung der <i>in vitro</i> Peptidoglykansynthese in Abhängigkeit von Ca <sup>2+</sup> -Ionen . . . . .	51
3.3.3	Tryptophan-Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	53
3.3.4	Einfluss von Ca <sup>2+</sup> -Ionen auf die Bindung von LtnA1 an ganze Zellen . . . . .	59
3.3.5	Der Einfluss von Ca <sup>2+</sup> -Ionen auf die porenbildende Aktivität von Lacticin 3147 in Liposomen . . . . .	60

---

3.4	Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Lantibiotikums Lacticin 481 . . . . .	61
3.4.1	Interaktion von Lacticin 481 mit den Lipid-Carriern C <sub>55</sub> -P und C <sub>55</sub> -PP und den Zellwandvorstufen Lipid I und Lipid II . . . . .	61
3.4.2	Hemmung der <i>in vitro</i> Lipid II-Biosynthese durch Lacticin 481 . . . . .	62
3.4.3	Der Einfluss von Lacticin 481 auf die Integrität von ganzen Zellen . . . . .	63
3.5	Untersuchungen zur Interaktion von Lactococcin 972 mit der Zellwandvorstufe Lipid II . . . . .	65
3.5.1	Antagonisierung der Lactococcin 972-Aktivität mit essentiellen Lipid-Zellwandvorläufern . . . . .	65
3.5.2	Die Inhibierung der <i>in vitro</i> der Lipid II-Gly-Synthese durch Lactococcin 972 . . . . .	66
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>68</b>
4.1	Der Einfluss von Ca <sup>2+</sup> -Ionen auf die spezifische Interaktion von Mersacidin und Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika mit der Zellwandvorstufe Lipid II . . . . .	68
4.2	Der Wirkungsmechanismus von Lacticin 481 . . . . .	70
4.3	Der Einfluss der positiven Netto-Gesamtladung auf die Aktivität Mersacidin-ähnlicher Lantibiotika . . . . .	72
4.4	Der Einfluss von Ca <sup>2+</sup> -Ionen im Porenbildungsprozess von Lacticin 3147 . . . . .	73
4.5	Eine Hypothese über die Funktion von Ca <sup>2+</sup> -Ionen im Wirkungsmechanismus einiger Mersacidin-ähnlicher Lantibiotika . . . . .	74
4.6	Die Interaktion von Lactococcin 972 mit der Zellwandvorstufe Lipid II . . . . .	77
4.7	Ausblick . . . . .	78
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>79</b>

# Tabellenverzeichnis

1.1	Klassifizierung von Bakteriozinen . . . . .	2
2.1	Verwendete Chemikalien . . . . .	19
2.2	Verwendete Geräte . . . . .	21
2.3	Verwendete Nährmedien . . . . .	24
2.4	Antibakterielle Substanzen . . . . .	27
2.5	Verwendete Bakterienstämme . . . . .	28
2.6	Wachstumsbedingungen der verwendeten Bakterienstämme . . . . .	29
2.7	Zusammensetzung von SDS-PAGE-Trenn- und Sammelgel . . . . .	43
2.8	Für SDS-PAGE-Proteingele verwendete Lösungen . . . . .	43
3.1	Elutionscharakteristika, Molekulargewicht und Ausbeute der in dieser Arbeit aufgereinigten Lantibiotika . . . . .	47
3.2	Minimale Hemmkonzentrationen der verwendeten Lantibiotika gegen die Indikatorstämme <i>Micrococcus luteus</i> DSM 1790 und <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> HP . . . . .	50
3.3	Einfluss von Ca <sup>2+</sup> -Ionen auf die antimikrobielle Aktivität von Mersacidin, Plantaricin C, Lacticin 481, Lacticin 3147 und dessen individuelle Peptide LtnA1 und LtnA2 . . . . .	51
3.4	Antagonistischer Einfluss von C <sub>55</sub> -P, C <sub>55</sub> -PP, Lipid I und Lipid II auf die antimikrobielle Aktivität von Lacticin 481 . . . . .	62
3.5	Aufhebung der antimikrobiellen Aktivität von Lactococcin 972 durch C <sub>55</sub> -P, C <sub>55</sub> -PP, Lipid I und Lipid II . . . . .	66

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturformel der charakteristischen Thioether-Ringstrukturen und anderer posttranslationaler Modifikationen der Lantibiotika . . . . .	3
1.2	Einbau von Lanthionin- bzw. Methyllanthioninresten in lantibiotische Präpeptide . . . . .	3
1.3	Primärstrukturen von Peptiden verschiedener Lantibiotika-Gruppen . . .	4
1.4	„Wedge model“ für die Wirkungsweise von Nisin . . . . .	6
1.5	Modell zur Lipid II-vermittelten Porenbildung von Nisin . . . . .	7
1.6	Modell zum Wirkmechanismus des Typ-B Lantibiotikums Mersacidin . . .	9
1.7	Schematische Darstellung der Zellwandbiosynthese in <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.8	Primärstruktur von Mersacidin . . . . .	11
1.9	Primärstruktur von Plantaricin C . . . . .	13
1.10	Primärstruktur von Lacticin 481 . . . . .	14
1.11	Primärstruktur von Lacticin 3147 . . . . .	16
3.1	MALDI-TOF-Massenspektren der einzelnen aufgereinigten Peptide LtnA1 und LtnA2 des Zwei-Komponenten Lantibiotikums Lacticin 3147 . . . . .	48
3.2	MALDI-TOF-Massenspektrum des aufgereinigten Lacticin 481 . . . . .	49
3.3	Hemmung der <i>in vitro</i> Peptidoglykansynthese durch Lantibiotika in der Abwesenheit und Gegenwart von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen . . . . .	52
3.4	Tryptophan-Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Plantaricin C . . . . .	54
3.5	Tryptophan-Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Lacticin 481 . . . . .	55
3.6	Tryptophan-Fluoreszenz-Emissionsspektrum von LtnA1 . . . . .	57
3.7	Tryptophan-Fluoreszenz-Emissionsspektrum von LtnA1A2 . . . . .	58
3.8	Lacticin 3147-induzierte $\text{K}^+$ -Freisetzung aus ganzen Zellen von <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> HP . . . . .	59
3.9	Lacticin 3147- und Nisin-induzierter CF-Efflux aus DOPC-Liposomen mit und ohne 0,1 mol% Lipid II . . . . .	61
3.10	Hemmung der <i>in vitro</i> Lipid II-Synthese durch diverse Lantibiotika . . . .	63

- 
- 3.11 Die Auswirkung von Lacticin 481 auf die Integrität der Zellmembran von  
*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP und *Micrococcus luteus* DSM 1790 . . 64
- 3.12 Hemmung der *in vitro* Lipid II-Gly-Synthese durch Lactococcin 972 . . 67
- 4.1 Hypothetisches Modell für die Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Wirkungs-  
mechanismus von Mersacidin, Plantaricin C, Lacticin 3147 und Lacticin 481 75

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abu	Aminobuttersäure
A. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AMP	antimikrobielles Peptid
AviMeCys	2-Aminovinyl-D-2-methylcystein
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
C <sub>55</sub>	Undecaprenyl
C <sub>55</sub> -P	Undecaprenyl-Phosphat
C <sub>55</sub> -PP	Undecaprenyl-Pyrophosphat
CF	Carboxyfluorescein
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
Dha	Didehydroalanin
Dhb	Didehydrobutyrin
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DTT	1,4-Dithiothreitol
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GBq	Gigabecquerel
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-Glucosamin
h	Stunde
HK	Hauptkultur
HMW	high molecular weight
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KBE	Koloniebildende Einheit
kBq	Kilobecquerel
kHz	Kilohertz

---

kV	Kilovolt
kDa	Kilodalton
l	Liter
Lan	Lanthionin
LII	Lipid II
Lsg.	Lösung
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight
MCS	Multiple cloning site
MeLan	Methyllanthionin
MES	(2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) Hydrate
MeOH	Methanol
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MurNAc	<i>N</i> -Acetyl-Muraminsäure
MW	Molekulargewicht
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PBP2	Penicillinbindeprotein 2
PEP	Phosphoenolpyruvat
pp	Pentapeptid
PP	Pyrophosphat
PSS	Phosphor storage screen
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP-GlucNAc	Uridinphosphat- <i>N</i> -Acetyl-Glucosamin
UDP-MurNAc	Uridinphosphat- <i>N</i> -Acetyl-Muraminsäure
µF	Mikrofarad
ÜN-Vk	Über-Nacht-Vorkultur

Vk	Vorkultur
(v/v)	Volumenprozent
W	Watt
(W/v)	Gewichtsprozent

Aminosäuren wurden nach den IUPAC-Regeln abgekürzt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Antimikrobielle Peptide - ein kurzer Überblick

Antimikrobielle Peptide (AMPs) werden als wichtiger Bestandteil des Immunsystems von fast allen Lebewesen dieser Erde produziert. Bisher wurden nahezu 1000 natürlich vorkommende AMPs von Bakterien, Pilzen und Pflanzen sowie Invertebraten, Amphibien und Säugetieren beschrieben. Die strukturell äußerst diversen AMPs, die in verschiedene Untergruppen eingeteilt sind, haben alle gemeinsam, dass sie zum einen sehr klein sind (10-50 Aminosäuren), dass sie ribosomal synthetisiert werden, dass sie größtenteils über eine positive Ladung verfügen und dass sie amphiphile Eigenschaften besitzen [46].

Bei den AMPs von Gram-positiven Bakterien handelt es sich um antimikrobielle Peptide, die ein enges oder weites Wirkspektrum besitzen und auch an zellulären Signalmechanismen beteiligt sein können. Die Produzenten selbst sind aufgrund spezifischer Immunitätsproteine gegen ihre eigenen Bakteriozine resistent [32]. Die Bakteriozine stellen eine sehr heterogene Gruppe von Peptiden und Proteinen dar, deren Klassifizierung zuletzt von Cotter *et al.* überarbeitet wurde und eine Einteilung der Bakteriozine in drei verschiedenen Kategorien vorsieht (Tab. 1.1). Klasse I beinhaltet lanthionin-haltige Peptidantibiotika (Lantibiotika), Klasse II die nicht-lanthioninhaltige Bakteriozine und die Klasse der Bakteriolyse umfasst alle lytischen Nicht-Bakteriozin-Proteine.

Auch Gram-negative Bakterien sind in der Lage, antimikrobielle Peptide zu produzieren. Diese werden anhand ihres Molekulargewichts in zwei Gruppen unterteilt, die Microcine (<10 kDa) und die Colicine (25-80 kDa) [42]. Microcine bilden eine strukturell äußerst diverse Gruppe von Antibiotika, die eine Einteilung in Unterklassen schwer erlaubt [40]. Colicine sind Proteine, die an spezifische Zelloberflächenrezeptoren binden, in sensitive Bakterienzellen transloziert werden und dort ihre antibakterielle Wirkung über unterschiedliche Wirkungsweisen entfalten [26].

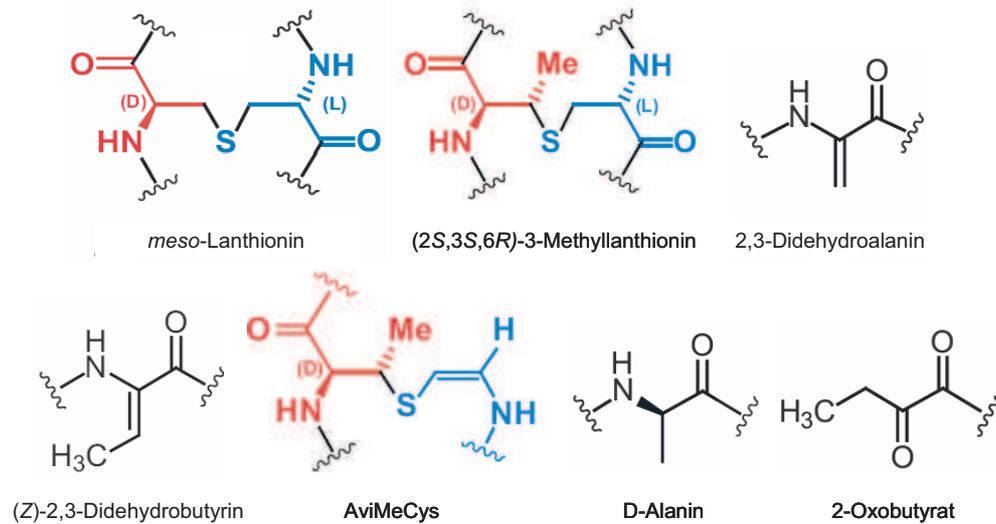
**Tabelle 1.1:** Klassifizierung von Bakteriozinen [32]

Klasse	Charakteristiken und Unterklassen
Klasse I: lanthioninhaltige Bakteriozine/Lantibiotika	sowohl einzelne als auch Zwei-Komponenten-Lantibiotika
Klasse II: nicht-lanthioninhaltige Bakteriozine	heterogene Klasse kleiner Peptide mit vier Unterklassen: a) Pediocin-ähnliche Bakteriozine b) Zwei-Peptid-Bakteriozine c) zyklische Peptide d) einzelne, lineare Nicht-Pediocin-Peptide
Bakteriolysine: lytische Proteine, deren Bakteriozincharakter umstritten ist	große, hitzelabile Proteine; oft Mureinhydrolasen

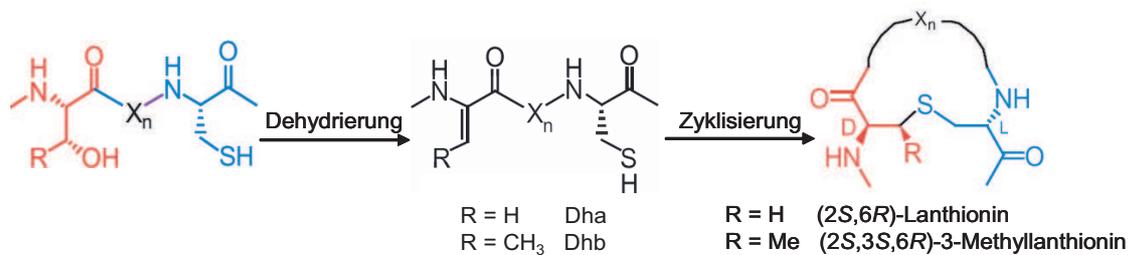
## 1.2 Lantibiotika

Lantibiotika (lanthioninhaltige Peptidantibiotika), eine Unterklasse der Bakteriozine, sind kleine (19-38 Aminosäuren), posttranslational modifizierte, antimikrobielle Peptide, die von Gram-positiven Bakterien produziert werden und die gegen ein breites Spektrum Gram-positiver Bakterien antimikrobiell aktiv sind. Charakteristisch für sie ist das Vorhandensein von Thioether-Ringstrukturen (Lanthionin bzw.  $\beta$ -Methyllanthionin) und anderen seltenen, nicht-proteinogenen Aminosäuren (z.B. 2,3-Didehydroalanin, 2,3-Didehydrobutyrin, 2-Aminovinyl-D-2-methylcystein, D-Alanin oder 2-Oxobutyrat) (Abb. 1.1).

Während ihrer Reifung werden die ribosomal synthetisierten Lantibiotika-Präpeptide, bestehend aus einer N-terminalen Leader-Sequenz und einem C-terminalen Propeptid, durch verschiedene Prozessierungsenzyme modifiziert, bis sie ihre volle antimikrobielle Aktivität erreichen. Im Propeptid werden Serin- und Threoninreste enzymatisch dehydriert, so dass 2,3-Didehydroalanin bzw. 2,3-Didehydrobutyrin entstehen. Diese ungesättigten Aminosäuren werden anschließend durch Modifikationsproteine mit benachbarten Cysteinresten zyklisiert, um die intramolekularen Ringstrukturen Lanthionin bzw. Methyllanthionin zu bilden (Abb. 1.2). Diese intramolekularen Thioether-Ringstrukturen sind für die dreidimensionale Struktur der Peptide verantwortlich und essentiell für ihre biologische Aktivität. Zusätzlich verleihen sie den Peptiden Schutz vor proteolytischem Abbau und Thermostabilität [56]. Nach Abschluss der Propeptidmodifikationen wird



**Abbildung 1.1:** Strukturformel der charakteristischen Thioetherringstrukturen und anderer posttranslatonaler Modifikationen der Lantibiotika [125].



**Abbildung 1.2:** Einbau von Lanthionin- bzw. Methylanthioninresten in lantibiotische Präpeptide [125].

das reife Bakteriozin durch die enzymatische Abspaltung der Leader-Sequenz an einer konservierten Proteaseschnittstelle und den Export aus der Zelle aktiviert (für aktuelle Reviews siehe [27, 125]).

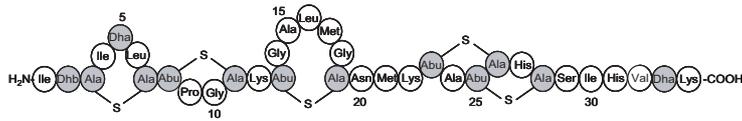
### 1.2.1 Klassifizierung der Lantibiotika

Die Gruppe der Lantibiotika umfasst mittlerweile mehr als 50 verschiedene Peptide, die bisher nach Jung *et al.* auf Grund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in zwei Gruppen, Typ-A und Typ-B, eingeteilt worden sind [60] (Abb. 1.3).

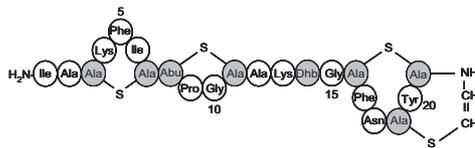
Bei den Typ-A Lantibiotika handelt es sich um langgestreckte, flexible und kationische Peptide, die primär durch die Zerstörung der Membranintegrität wirken [45]. Zu ihnen gehören Peptide wie z.B. Nisin, Epidermin oder Pep5.

(a) Typ-A Lantibiotika

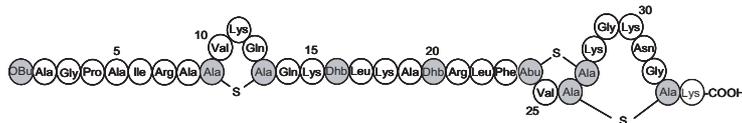
**Nisin**



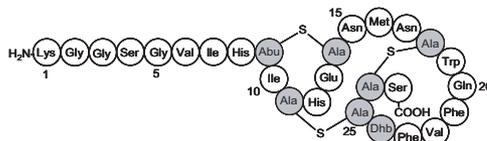
**Epidermin**



**Pep5**

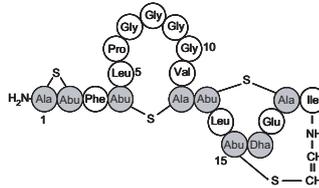


**Lacticin 481**

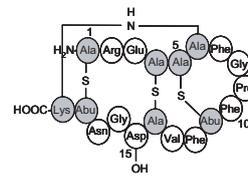


(b) Typ-B Lantibiotika

**Mersacidin**

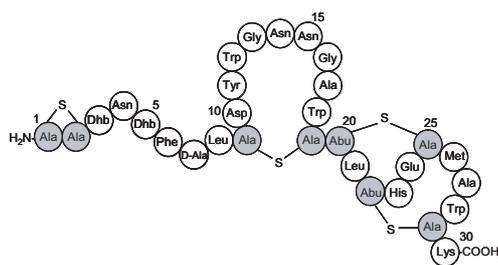


**Cinnamycin**



(c) Zwei-Komponenten-Lantibiotika

**Lacticin 3147 A1**



**Lacticin 3147 A2**

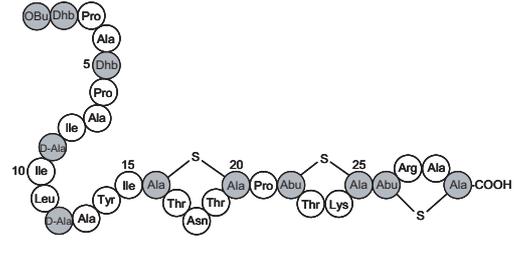


Abbildung 1.3: Primärstrukturen von Peptiden verschiedener Lantibiotika-Gruppen. Nicht proteinogene Aminosäuren sind grau unterlegt. Abu: Aminobuttersäure; Abu-S-Ala: Methyllanthionin; Ala-S-Ala: Lanthionin; Dha: Didehydroalanin; Dhb: Didehydrobutyrin; OBU: 2-Oxobutytrat.

Typ-B Lantibiotika sind dagegen auf Grund ihrer charakteristischen Kopf-zu-Schwanz-Verknüpfung von globulärer Struktur, bestehen aus bis zu 20 Aminosäuren, tragen eine negative oder gar keine Nettoladung und wirken primär durch Inhibierung enzymatischer Reaktionen. Sie beinhalten Peptide der Cinnamycin- und der Mersacidin-Gruppe. Letztere verfügen zwar nicht über die typische Kopf-Schwanz-Verknüpfung, werden aber auf Grund der hohen Ähnlichkeit ihrer Leader-Sequenz zu dieser Gruppe gezählt [45].

Zusätzlich zu den Typ-A und den Typ-B Lantibiotika gibt es noch die Gruppe der Zwei-Komponenten-Lantibiotika, die aus zwei posttranslational modifizierten Peptiden besteht, die individuell, wenn überhaupt, nur eine schwache, synergistisch jedoch eine starke antibakterielle Aktivität zeigen [27]. Diese Gruppe umfasst bis heute acht Mitglieder (BHT-A [57], Cytolysin [13], Haloduracin [80], Lacticin 3147 [79], Lichenicidin [36], Plantaricin W [51], Smb [128], Staphylococcin C55 [83]).

Vor Kurzem wurde von Willey und van der Donk [125] eine alternative Einteilung der Lantibiotika vorgeschlagen, die auch Lantibiotika eingliedert, die vorher auf Grund von Eigenschaften beider Klassen oder komplett neuer Merkmale (z.B. Zwei-Komponenten-Lantibiotika) nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Diese Klassifizierung teilt die Lantibiotika auf der Basis ihrer posttranslationalen Reifungsprozesse und dem Vorhandensein oder Fehlen antimikrobieller Aktivität in drei Klassen ein:

- Klasse I: Präpeptide werden von zwei verschiedenen Enzymen (LanB, LanC) modifiziert; Peptide werden durch einen ABC-Transporter (LanT) exportiert; Abspaltung der Leader-Sequenz erfolgt extrazellulär durch eine subtilinähnlich Serinprotease (LanP) (z.B. Nisin, Subtilin, Epidermin und Pep5)
- Klasse II: posttranslationale Modifikation der Präpeptide erfolgt durch ein einzelnes Enzym (LanM); Sekretion und Prozessierung der Leader-Sequenz erfolgt durch ein einzelnes, multifunktionelles Protein mit einer konservierten N-terminalen Cystein-Protease-Domäne (LanT) (z.B. Lacticin 481, Mersacidin, Cinnamycin und Lacticin 3147)
- Klasse III: lanthioninhaltige Peptide ohne signifikante antimikrobielle Aktivität, aber mit einer anderen wichtigen biologischen Funktion für die produzierende Zelle (z.B. SapT, das bei der Ausbildung von Lufthyphen in Streptomyceten involviert ist [61])

### 1.2.2 Wirkungsmechanismen von Lantibiotika

Lantibiotika entfalten ihre antimikrobielle Aktivität ausschließlich gegen Gram-positive Bakterien. Gram-negative Bakterien sind durch ihre äußere Zellmembran, die von den

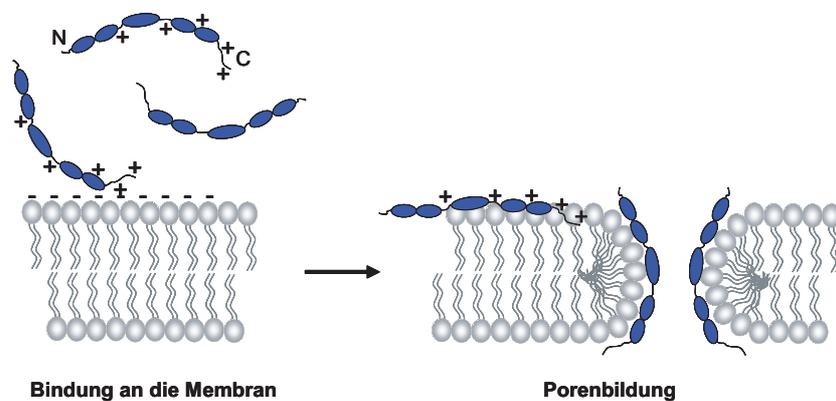
Lantibiotika auf Grund ihrer Größe nicht passiert werden kann, gegen diese Peptide resistent. Die Wirkspektren der verschiedenen Lantibiotika variieren stark (als Übersichtsartikel siehe [48, 27]).

### Wirkmechanismen der Typ-A Lantibiotika

Die amphiphilen kationischen Peptide der Typ-A Lantibiotika, mit Nisin als Prototyp, wirken auf verschiedene Arten gegen sensitive Bakterienstämme. Es konnte gezeigt werden, dass diese Peptide in hohen Konzentrationen die bakterielle Zellmembran destabilisieren, indem sie transiente, nicht-selektive Poren bilden, die zum Efflux von Ionen und Metaboliten führen. Dies hat den Verlust vitaler Ionengradienten sowie eine sofortige Einstellung aller zellulären Biosyntheseprozesse zur Folge [96, 99, 63, 6, 100].

Nisin bildet in mikromolarem Konzentrationsbereich membranpotenzialabhängig Poren nach dem „wedge model“ [37] in reinen Phospholipidmembranen. Das Peptid bindet über den stark positiv geladenen C-Terminus an die negativ geladene Membranoberfläche [17] und nimmt eine zur Membran parallele amphipatische Konformation ein, bei der die hydrophoben Seitenketten des Moleküls in die Membran eintauchen und die hydrophilen Seitenketten nach außen ragen [116]. Mehrere Nisinmoleküle aggregieren und tauchen membrangebunden mit dem C-Terminus [119] in die Membran ein, so dass die Lipidmoleküle zusammen mit Nisin eine kurzlebige Pore mit einem Durchmesser von 0,1-1 nm [6] bilden (Abb. 1.4).

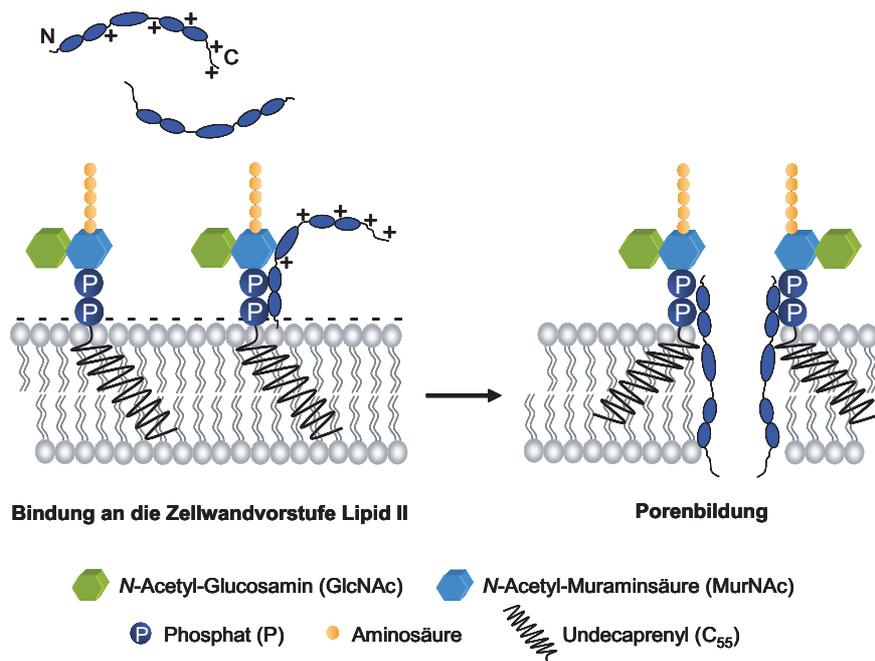
Zusätzlich zur Porenbildung in Phospholipidmembranen interagiert Nisin spezifisch



**Abbildung 1.4:** „Wedge model“ für die Wirkungsweise von Nisin nach Driessen *et al.* [37] und van den Hooven *et al.* [116]. Das Peptid (blau) bindet über den hochpositiven C-Terminus an die Membran, nimmt dort eine zur Membranoberfläche parallele Position ein und bildet eine transiente Pore, an deren Architektur auch die Phospholipide involviert sind.

mit der in der Zellmembran verankerten, Zellwandvorstufe Lipid II [20] und schon im nanomolaren Konzentrationsbereich Lipid II-vermittelte Poren zu bilden [19]. Diese Porenbildung ist unabhängig von Membranpotenzial und Membranzusammensetzung und resultiert in Poren mit einem Durchmesser von 2-2,5 nm und einer Lebensdauer von Sekunden [122]. Desweiteren unterscheidet sich die Struktur der Lipid II-vermittelten Nisinpore von der unspezifisch gebildeten Pore. Nisin bindet mit den drei N-terminalen Ringstrukturen an das Lipid II-Molekül, das selbst ein wesentlicher Bestandteil der Pore ist [16] und bildet mit dem Lipid einen 1:1 Komplex, während der C-Terminus des Peptids möglicherweise noch mit den negativ-geladenen Kopfgruppen der Membran interagiert [55]. Durch die Bindung an Lipid II gelangt das parallel zur Membran liegende Nisin in eine rechtwinkelige Position zur Membranoberfläche [118] und mehrere Lipid II:Nisin-Komplexe bilden eine Pore mit einer definierten einheitlichen Struktur (Abb. 1.5).

Ein Modell für die Porenstruktur wurde von Hasper *et al.* aufgestellt, nach dem die Stoichiometrie von Lipid II zu Nisin in der Pore 1:2 beträgt und die Pore aus insgesamt vier Lipid II- und acht Nisinmolekülen besteht [47]. Dieses Peptid-Lipid II-Verhältnis kommt zustande, indem während des Porenbildungsprozesses eine Rekrutierung zusätz-



**Abbildung 1.5:** Modell zur Lipid II-vermittelten Porenbildung von Nisin. Das Lantibiotikum (blau) bindet über den N-Terminus an die Zellwandvorstufe. Anschließend nimmt Nisin eine Position senkrecht zur Membranoberfläche ein und bildet eine Pore.

licher Nisin-Moleküle erfolgt.

Durch die spezifische Interaktion mit der Zellwandvorstufe ist Nisin nicht nur in der Lage, in 1000-fach geringerer Konzentration Poren zu bilden, sondern auch die Zellwandbiosynthese sensitiver Bakterien zu inhibieren [68, 90, 23]. Durch Komplexierung von Lipid II hemmt das Peptid die Peptidoglykanbiosynthese auf dem Level der Transglykosylierung (Kapitel 1.3).

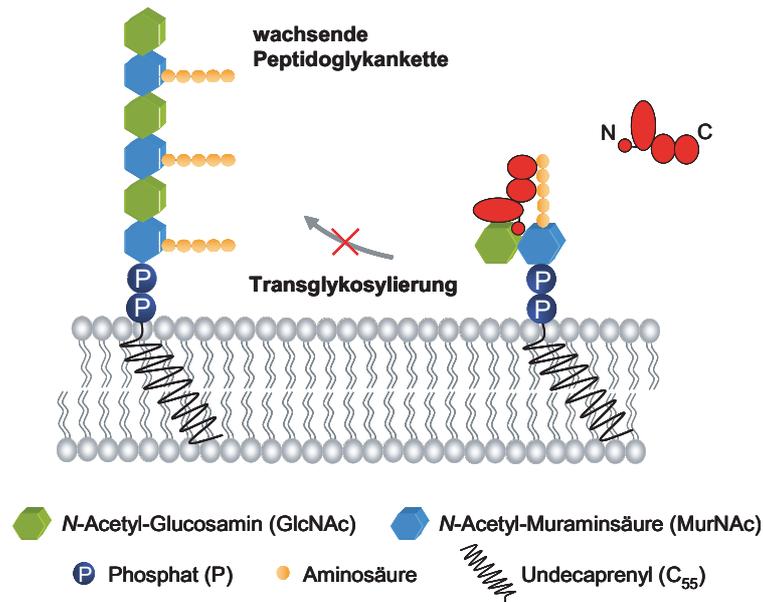
Ein weiterer Wirkmechanismus von Nisin ist die Induzierung der Autolyse bei bestimmten sensitiven Staphylokokkenstämmen [7, 8]. Durch Interaktion des kationischen Peptids mit den negativ geladenen Teichon- und Lipoteichonsäuren verdrängt Nisin dort gebundene kationischen Autolysine, die durch diese Freisetzung aktiviert werden. Dies führt zu einem Aufbrechen der Zellwand im Septum sich teilender Bakterienzellen.

Neben seiner antimikrobiellen Aktivität gegen vegetative Bakterienzellen unterdrückt Nisin auch die Keimung bakterieller Sporen [56]. Dha5 soll für diese Aktivität verantwortlich sein, indem die Aminosäure ein Ziel auf der Sporenhülle, das essentiell für das Auskeimen der Spore ist, kovalent durch einen elektrophilen Angriff modifiziert [69].

### **Wirkmechanismen der Typ-B Lantibiotika**

Typ-B Lantibiotika wirken durch Inhibierung von Enzymreaktionen, indem sie das entsprechende Substrat binden [98]. Peptide der Mersacidin-Gruppe erreichen ihre antimikrobielle Aktivität durch Hemmung der Peptidoglykanbiosynthese (Kapitel 1.3), die in einer Lyse der Bakterienzellen resultiert [21]. Mersacidin interagiert spezifisch mit der membrangebundenen ultimativen Zellwandvorstufe Lipid II, was eine Hemmung der Transglykosylierungsreaktion der Zellwandbiosynthese zur Folge hat, indem der Einbau des Zellwandbausteins in die wachsende Zellwand unterbunden wird [22, 20] (Abbildung 1.6).

Peptide der Cinnamycin-Gruppe komplexieren Phosphatidylethanolamin und besitzen nur eine schwache antimikrobielle Aktivität [53]. Allerdings beschränkt sich ihre Aktivität nicht nur auf prokaryotische Zellen. Cinnamycin lysiert Erythrozyten [29] und inhibiert Enzyme des menschlichen Immunsystems, z.B. Phospholipase A2 [82].



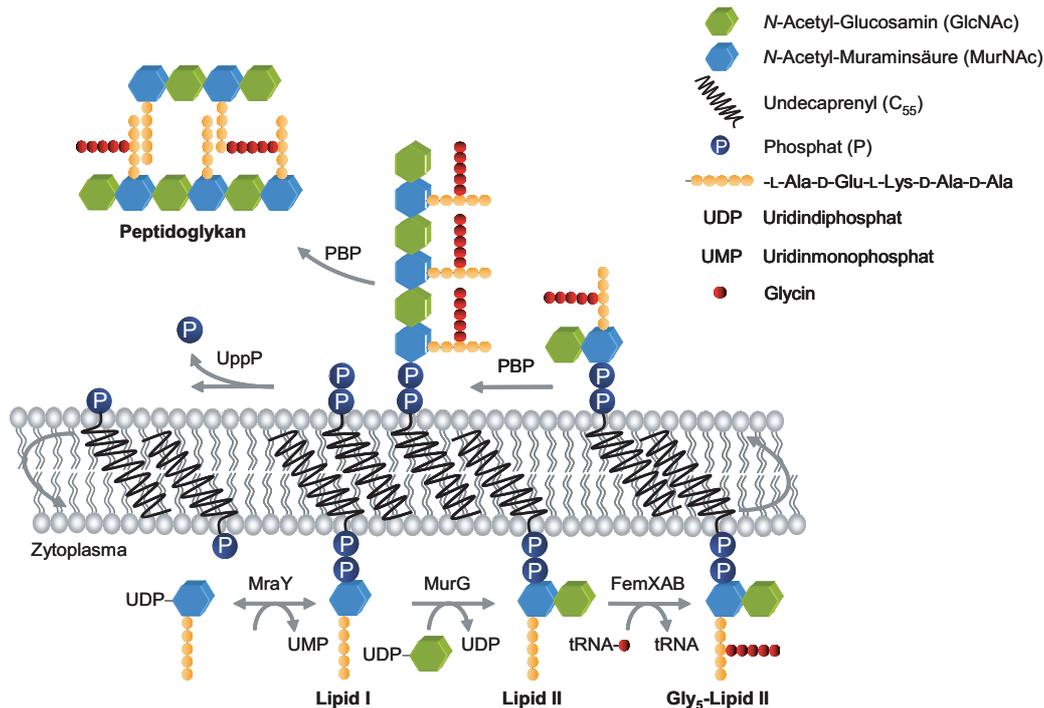
**Abbildung 1.6:** Modell zum Wirkmechanismus des Typ-B Lantibiotikums Mersacidin. Das Peptid (rot) bindet spezifisch an die Zellwandvorstufe Lipid II, welche nicht mehr in die wachsende Peptidoglykankette eingebaut werden kann, wodurch die Zellwand-Biosynthese blockiert wird.

### 1.3 Die Peptidoglykanbiosynthese

Peptidoglykan ist ein essentieller und spezifischer Bestandteil der bakteriellen Zellwand auf der Außenseite der Zellmembran fast aller Bakterien und dient der Aufrechterhaltung der Zellintegrität durch Widerstehung des Zelltugors. Zusätzlich verleiht dieses komplexe Heteropolymer, das aus langen Glykanketten besteht, die durch kurze Peptide miteinander quervernetzt sind [93], dem Bakterium seine charakteristische Zellform und dient als Gerüst für weitere Bestandteile der Zellhülle, wie z.B. Proteine und Teichonsäuren (als Übersichtsartikel über die Biosynthese, Funktion und Struktur des Peptidoglykans siehe [117, 121]).

Die Biosynthese des Peptidoglykans, die in allen Eubakterien ähnlich abläuft, beginnt intrazellulär mit der Herstellung des Peptidoglykanvorläufers Undecaprenyl-Pyrophosphoryl-*N*-Acetylmuramyl-(Pentapeptid)-*N*-Acetylglucosamin (C<sub>55</sub>-PP-MurNAc-(pp)-GlcNAc), dem sogenannten Lipid II, das über einen unbekanntem Mechanismus auf die Außenseite der Zellmembran transloziert und dort in die wachsende Peptidoglykanschicht eingebaut wird (Abbildung 1.7).

UDP-MurNAc wird im Zytoplasma aus UDP-GlcNAc und PEP durch die beiden Enzyme MurA und MurB synthetisiert. Anschließend erfolgt die Anheftung von fünf



**Abbildung 1.7:** Schematische Darstellung der Zellwandbiosynthese in *Staphylococcus aureus*. Die Synthese der Peptidoglykanvorläufer startet im Zytoplasma mit Bildung der UDP-aktivierten Vorstufen UDP-MurNac-(Pentapeptid) und UDP-GlcNac. UDP-MurNac-(Pentapeptid) wird an den membranverankerten Lipidträger C<sub>55</sub>-P gebunden, so dass membrangebundenes Lipid I entsteht. Die ultimative Zellwandvorstufe Lipid II wird durch die Anheftung von GlcNac an Lipid I gebildet und durch die Addition von fünf Glycinresten weiter modifiziert. Lipid II wird anschließend auf die Außenseite der Zellmembran transloziert und dort in das wachsende Peptidoglykan eingefügt. (Abb. von Dr. Tanja Schneider(modifiziert))

Aminosäuren an die D-Lactylgruppe des UDP-MurNac. MurC katalysiert die Addition von L-Alanin, MurD die von D-Glutamat, MurE addiert *meso*-Diaminopimelinsäure bzw. L-Lysin und MurF heftet das Dipeptid D-Alanin-D-Alanin an (als Übersichtsartikel siehe [4]). Anschließend wird der Phospho-MurNac-(pp)-Rest des zytoplasmatischen Vorläufers an den Membrananker C<sub>55</sub>-P transferiert, so dass C<sub>55</sub>-PP-MurNac-(pp) (Lipid I) entsteht. Diese Reaktion wird durch das Enzym MraY katalysiert. Im Anschluß katalysiert MurG den Transfer des GlcNac-Restes von UDP-GlcNac auf Lipid I und synthetisiert C<sub>55</sub>-PP-MurNac-(pp)-GlcNac. Lipid II wird von vielen Bakterien, insbesondere von Gram-positiven, durch Addition einer zusätzlichen Interpeptidbrücke, deren Struktur innerhalb der Bakterien stark variiert, modifiziert (für einen Review siehe [14]). In *Staphylococcus aureus* werden sequentiell fünf Glycinreste an die

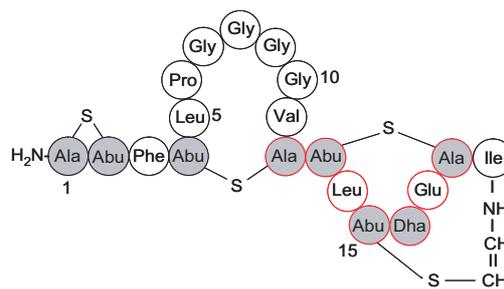
$\epsilon$ -Aminogruppe des L-Lysinrestes der Pentapeptid-Seitenkette addiert. Diese Reaktionen werden durch die sogenannten FemXAB-Enzyme katalysiert, die den ersten (FemX), die nächsten zwei (FemA) und die letzten beiden Glycinreste (FemB) anheften [94]. Anschließend wird der vollständig modifizierte Zellwandbaustein zur Außenseite der Zytoplasmamembran transloziert und dort in die wachsende Peptidoglykanschicht eingebaut. Penicillin-Bindeproteine katalysieren die Polymerisierung des Glykanstrangs (Transglykosylierung), bei der der MurNAc-(ppGly<sub>5</sub>)-GlcNAc-Rest des Lipid II in die wachsende Peptidoglykankette eingebaut wird, sowie die Quervernetzung zwischen den Glykanketten (Transpeptidierung). Der verbliebene Membrananker C<sub>55</sub>-PP wird durch eine membrangebundene Phosphatase (UppP) zu C<sub>55</sub>-P dephosphoryliert und wieder auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran transportiert, um dort für die Biosynthese neuer Peptidoglykanbausteine und anderer Zellwandpolysaccharidkomponenten wieder zur Verfügung zu stehen (als Übersichtsartikel siehe [103]). Nach ihrem Einbau in die Zellwand werden Glykanstränge in vielen Spezies noch weiter modifiziert, indem Oberflächenpolymere, wie z.B. Teichonsäuren oder Kapselpolysaccharide, angeheftet werden oder sekundäre Modifikationen, wie z.B. Acetylierungen und Deacetylierungen, erfolgen (als Übersichtsartikel siehe [120]).

## 1.4 In dieser Arbeit untersuchte antimikrobielle Peptide

### 1.4.1 Mersacidin

#### Struktur

Das von *Bacillus* species HIL Y-85,54728 produzierte [28] Typ-B Lantibiotikum Mersacidin besteht aus 20 Aminosäuren, von denen acht posttranslational modifiziert sind und es besitzt ein Molekulargewicht von 1824 Da (Abb. 1.8). Das kompakte Peptid enthält



**Abbildung 1.8:** Primärstruktur von Mersacidin [28]. Das Lipid II-Bindemotif ist rot hervorgehoben.

insgesamt drei Methylanthioninreste, einen Dehydroalaninrest und ein C-terminales 2-Aminovinyl-D-2-methylcystein und wird, basierend auf den Thioetherbindungen, in insgesamt drei Domänen eingeteilt: Domäne I (Aminosäuren 1-3) mit einer ungewöhnlich kurzen Thioetherbrücke zwischen den Aminosäuren eins und zwei, Domäne II (Aminosäuren 4-12) mit einer 4-12-Thioetherverknüpfung und Domäne III (Aminosäuren 13-20) mit einer Thioetherbrücke zwischen den Positionen 13 und 18 und dem C-terminalen 2-Aminovinyl-D-2-methylcystein [88]. In Lösung besitzt Mersacidin eine globuläre Struktur, bei der die neutralen Seitenketten aus der Struktur ragen und dem ungeladenen Molekül einen hydrophoben Charakter verleihen [88]. Der N-Terminus ragt dabei ins Zentrum des Peptids und die N-terminale  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Seitenkettencarboxylgruppe des Glutamats an Position 17 [88], die zusätzlich mit Gly7 interagiert. Diese polaren Interaktionen sind jedoch eher schwach und nicht die Hauptdeterminanten für das Einknicken des Moleküls [105]. Ermöglicht werden diese Interaktionen durch die hohe strukturelle Flexibilität der Domäne II und einer Hinge-Region (Ala12-Abu13) zwischen Domäne II und III [54].

Die kurze Hinge-Region und Glu17 sind beide Bestandteil einer konservierten Aminosäuresequenz (Ala12-Ala18), die als das Mersacidin:Lipid II-Bindemotiv bezeichnet wird und innerhalb der Lantibiotika weit verbreitet ist [11].

### Wirkenspektrum und Wirkmechanismus

Mersacidin besitzt antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien wie Staphylokokken, Streptokokken, Bacilli, Clostridien, Corynebakterien, Peptostreptokokken und gegen *Propionibacterium acnes* [50], einschließlich methicillinresistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) [28] und vancomycinresistenten Enterokokken (VRE) [22]. Die antibakterielle Wirkung des Peptids beruht auf einer Hemmung der Zellwandbiosynthese [21]. Mersacidin inhibiert die Peptidoglykanbiosynthese auf dem Level der Transglykosylierung [22], indem das Lantibiotikum spezifisch mit der Zellwandvorstufe Lipid II interagiert [20]. Essentiell für die antimikrobielle Aktivität von Mersacidin ist der negativ geladene Glutamatrest an Position 17, dessen Austausch mittels zielgerichteter Alanin-Mutagenese einen Verlust der gesamten antimikrobiellen Aktivität zur Folge hat [111]. Dieser Glutamatrest ist ein fundamentaler Bestandteil einer hydrophilen Bindungstasche, die mittels NMR-Spektroskopie zuerst in dem Typ-B Lantibiotikum Actagardine gefunden wurde [129]. Der Abschnitt Val11-Cys18 von Mersacidin, mit Ausnahme von Dha16, ist in der Sequenz identisch zum Abschnitt Val5-Cys12 in Actagardine, der die Bindungstasche enthält [105]. Von Kärcher wurde vorgeschlagen, dass das deprotonierte Glu17 in Mersacidin eine Bindungsstelle mit hoher Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen darstellt

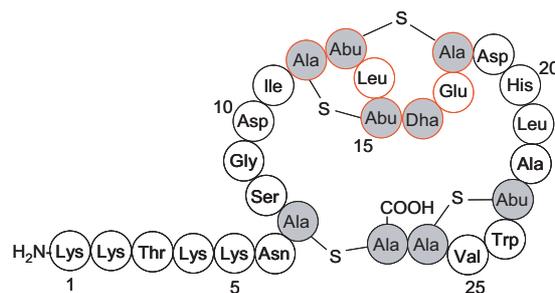
[64]. Er deutete damit eine wichtige Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei der Interaktion von Mersacidin und seiner Zielstruktur in der bakteriellen Membran an, nachdem schon früher ein die antimikrobielle Aktivität von Mersacidin verbessernder Effekt durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von Barret *et al.* gezeigt worden war. In mit  $\text{Ca}^{2+}$ -angereichertem Medium konnte eine verdoppelte antibakterielle Aktivität von Mersacidin beobachtet werden [5].

Bei der Interaktion von Mersacidin mit Lipid II verändert das Peptid über die Hinge-Region (Ala12Abu13) seine Gesamtstruktur, was eine Exposition der geladenen Gruppen (Ala1 und Glu17) bewirkt. Da es sich bei Lipid II auf Grund seiner Pyrophosphatgruppe und dem Glutamatrest in der Pentapeptidseitenkette um ein negativ geladenes Molekül handelt, ist es wahrscheinlich, dass das Calciumion dazu dient, die Glu17-Seitenkette zu den negativ geladenen Gruppen des Lipid II-Moleküls zu überbrücken, bis diese eine direkte Salzbrücke mit dem positiv geladenen Lysinrest der Pentapeptidseitenkette der Zellwandvorstufe ausbilden kann [54].

## 1.4.2 Plantaricin C

### Struktur

Das Lantibiotikum Plantaricin C wird von *Lactobacillus plantarum* LL441 produziert [43] und besitzt ein Molekulargewicht von 2880 Da. Es besteht aus insgesamt 27 Aminosäuren, von denen neun posttranslational modifiziert wurden (Abb. 1.9). Plantaricin C enthält einen Lanthionin-, zwei Methyllanthionin- und einen Dehydroalaninrest, die sich alle im globulären, negativ geladenen C-Terminus (Aminosäuren 7-27) befinden. Deswegen globuläre Struktur kommt durch eine Thioetherbindung zwischen den Aminosäuren 7 und 27 zu Stande. Die drei Methyllanthioninreste bilden weitere drei intramolekulare Ringe (Aminosäuren 12-15, 13-18 und 23-26) und verleihen dem C-Terminus eine



**Abbildung 1.9:** Primärstruktur von Plantaricin C [113]. Identische Aminosäuren des konservierten Lipid II-Bindemotivs im Vergleich zu Mersacidin sind rot hervorgehoben.

äußerst rigide und kompakte Struktur [113]. Mit drei anionischen (Asp10, Glu17 und Asp19) und nur einer kationischen Aminosäure (His20) besitzt der C-Terminus eine negative Ladung. Der N-terminale Abschnitt des Peptids (Aminosäuren 1-6) ist dagegen langgestreckt, flexibel und auf Grund von vier Lysinresten positiv geladen und verleiht Plantaricin C seine insgesamt positive Nettoladung.

Mit den Aminosäuren 12-18 verfügt das Peptid über ein konserviertes Mersacidin-Lipid II-Bindemotiv, bei dem jedoch die Aminosäuren 13 und 15 über eine Thioetherbrücke miteinander verbunden sind (MeLan12-15).

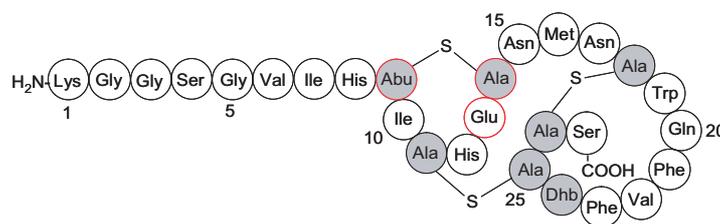
### Wirkenspektrum und Wirkmechanismus

Plantaricin C besitzt ein sehr breites Wirkspektrum gegen Gram-positive Bakterien, wie z.B. Bacilli, Laktobacilli, Leuconostoc, Streptokokken und Enterokokken. Das Lantibiotikum wirkt gegen diese hauptsächlich bakterizid, obwohl es bei einigen wenigen Bakterienarten, wie z.B. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LMG 13551 oder *Lactobacillus fermentum* LMB 13554, auch bakteriolytische Wirkung zeigt [43]. Diese zellytische Wirkung beruht wahrscheinlich auf einer Induzierung der Autolyse bei besonders sensiblen Bakterien [44]. Primär wirkt das Peptid durch Porenbildung in sensiblen Stämmen [44] und durch die Inhibierung der Zellwandbiosynthese, indem es die Zellwandvorstufe Lipid II komplexiert [123].

### 1.4.3 Lacticin 481

#### Struktur

Lacticin 481 wird von *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* produziert [87, 39, 92] und hat ein Molekulargewicht von 2901 Da. Sieben der insgesamt 27 Aminosäuren des Lantibiotikums sind postranslational modifiziert, so dass das Peptid über zwei Lanthionin-, einen Methyllanthionin- und einen Dehydrobutyrinrest verfügt (Abb. 1.10). Der N-Terminus



**Abbildung 1.10:** Primärstruktur von Lacticin 481 [115]. Identische Aminosäuren des konservierten Lipid II-Bindemotivs im Vergleich zu Mersacidin sind rot hervorgehoben.

von Lacticin 481 (Aminosäuren 1-8) ist langgestreckt und flexibel und durch die beiden Aminosäuren Lys1 und His8 positiv geladen. Dagegen ist der C-Terminus (Aminosäuren 9-27), der alle Thioetherbrücken (Aminosäuren 9-14 (MeLan), 11-25 (Lan) und 18-26 (Lan)) enthält, eher von globulärer Struktur und besitzt sowohl eine positive (His12) als auch eine negative Ladung (Glu13). Da der C-Terminus keine Nettoladung trägt, ist das Gesamtmolekül durch den kationischen N-Terminus insgesamt positiv geladen.

Mit den Aminosäuren 8-14 besitzt Lacticin 481 ein Mersacidin-Lipid II-Bindemotiv, das strukturell nahezu identisch ist und insgesamt drei gleiche Aminosäuren enthält (Abu9, Glu13, Ala14). Im Gegensatz zu Mersacidin enthält das Lipid II-Bindemotiv von Lacticin 481 insgesamt drei geladene Aminosäuren (His8, His12, Glu13).

### Wirkenspektrum und Wirkmechanismus

Lacticin 481 besitzt antibakterielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien wie z.B. Laktokokken, Laktobacilli, Leuconostoc und *Clostridium tyrobutyricum* [87, 112]. Über die Wirkungsweise des Peptids ist bisher nicht viel bekannt. Lipidmonolayerexperimente haben gezeigt, dass Lacticin 481 mit künstlichen Lipidmembranen interagiert und dabei eine höhere Affinität für zwitterionische als für anionische Lipide besitzt [35].

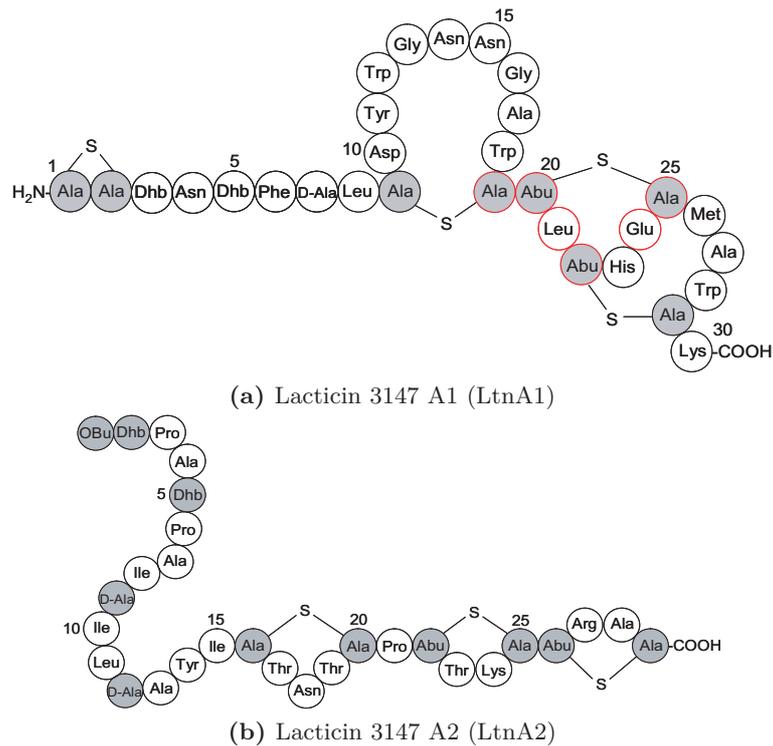
### 1.4.4 Lacticin 3147

#### Struktur

Bei Lacticin 3147 handelt es sich um ein Zwei-Komponenten-Lantibiotikum, das aus den beiden Peptiden LtnA1 und LtnA2 besteht [79] und von *Lactococcus lactis* DPC 3147 produziert wird [97]. Das A1-Peptid besteht aus 30 Aminosäuren, hat eine Größe von 3307 Da und besitzt in gelöster Form eine globuläre Konformation, wie es für Typ-B Lantibiotika charakteristisch ist (Abb. 1.11a). Insgesamt elf Aminosäuren sind posttranslational modifiziert und bilden zwei Lanthionin-, zwei Methyllanthionin-, zwei Dehydrobutyrin- und einen D-Alaninrest.

Das 29 Aminosäuren umfassende A2-Peptid besitzt ein Molekulargewicht von 2847 Da und ist gelöst von gestreckter Konformation, wie es typisch für die Typ-A Lantibiotika ist (Abbildung 1.11b). Es verfügt über elf posttranslational veränderte Aminosäuren die einen Lanthionin-, zwei Methyllanthionin-, zwei Dehydroalanin, zwei Dehydrobutyrin- und einen 2-Oxobutytratrest bilden.

Lacticin 3147 A1 besitzt mit seinen Aminosäuren 1-8 einen ungeladenen, flexiblen und langgestreckten N-terminalen Bereich, der einen Lanthionin- (Aminosäuren 1-2), die beiden Dehydrobutyrin- (Aminosäuren 3 und 5) und den D-Alaninrest (Position 7) ent-



**Abbildung 1.11:** Primärstruktur des Zwei-Komponenten Lantibiotikums Lacticin-3147 [70]. Identische Aminosäuren des konservierten Lipid II-Bindemotivs im Vergleich zu Mersacidin sind rot hervorgehoben.

hält. Der C-terminale Abschnitt des Peptids (Aminosäuren 9-30) ist dagegen auf Grund der beiden Methyllanthionin- (Aminosäuren 20-25 und 22-29) und des Lanthioninrestes (Aminosäuren 9-19) von globulärer Struktur. Die Aminosäuren His23 und Glu24 verleihen dem Lantibiotikum eine ausgeglichene Ladung.

Die Aminosäuresequenz von Ala19-Ala25 entspricht mit nur einer unterschiedlichen Aminosäure (His23) dem Lipid II-Bindemotiv von Mersacidin. Durch diesen Aminosäureaustausch verliert das Bindemotiv jedoch seinen kationischen Charakter, da der positiv geladene Histidinrest die negative Ladung des konservierten Glutamatrests kompensiert.

Das kationische A2-Peptid besitzt einen langgestreckten N-Terminus (Aminosäuren 1-15) mit einem N-terminalen 2-Oxobutyryl-, den beiden D-Alanin- (Aminosäuren 9 und 12) und den beiden Dehydrobutyrinresten (Position 2 und 5). Der C-terminale Teil von LtnA2 enthält alle Thioetherbrücken (Lan16-20, MeLan22-25, MeLan26-29) und zwei positiv geladene Aminosäuren (Lys24, Arg27), die dem Peptid seine positive Nettoladung vermitteln.

### Wirkenspektrum und Wirkmechanismus

Lacticin 3147 besitzt ein sehr breites Wirkenspektrum gegen Gram-positive Bakterien, wie z.B. Laktokokken, Laktobacilli, Enterokokken, Bacilli, Leuconostoc, Pediokokken, Clostridien, Listerien, Staphylo- und Streptokokken [97]. Um die antimikrobielle Aktivität zu entfalten, wirken beide Peptide, die alleine nur eine marginale (LtnA1) bzw. keine (LtnA2) Aktivität besitzen, synergistisch [81]. Das Lantibiotikum besitzt einen dualen Wirkmechanismus, indem es zum einen Poren in der bakteriellen Zellmembran bildet [79, 124] und zum anderen die Zellwandbiosynthese inhibiert, indem es spezifisch mit der Zellwandvorstufe Lipid II interagiert [124]. Nach einem Modell von Wiedemann *et al.* [124] interagiert das A1-Peptid mit der Lipid II-haltigen Zellmembran und bindet an die Zellwandvorstufe, was eine Konformationsänderung des Peptids bewirkt. Der entstandene Lipid II:LtnA1-Komplex wird anschließend von dem A2-Peptid gebunden. Durch spezifische Interaktion mit diesem Komplex nimmt LtnA2 eine Transmembranorientierung ein, die zur Ausbildung einer Pore führt.

#### 1.4.5 Lactococcin 972

Lactococcin 972 ist ein nicht-lanthioninhaltiges, kationisches Bakteriozin, das von *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 972 produziert wird und ein Molekulargewicht von ca. 7500 Da besitzt [76]. Das plasmidcodierte, hydrophile Peptid wird als Präbakteriozin (91 Aminosäuren) exprimiert, das nach dem Export, höchstwahrscheinlich durch das sec-Sekretionssystem, beim Erreichen des externen Mediums prozessiert wird und das reife Lactococcin 972 (66 Aminosäuren) ergibt [73]. Obwohl Lactococcin 972 erstmalig 1996 von Martínez *et al.* beschrieben wurde, ist die genaue Struktur des Bakteriozins noch nicht aufgeklärt.

### Wirkenspektrum und Wirkungsmechanismus

Lactococcin 972 besitzt ein sehr enges Wirkenspektrum und ist nur gegen Laktokokken-Stämme und *Lactobacillus sake* LMG 13558 aktiv [75]. Das Bakteriozin entfaltet seine antimikrobielle Aktivität ausschließlich als Homodimer [76] indem es die Septumbildung in empfindlichen Laktokokkenstämmen inhibiert [74]. Es konnte beobachtet werden, dass mit Lactococcin 972 behandelte Zellen weiter Makromolekül-Synthese betreiben und bis zu Beginn eines neuen Zellteilungsprozesses wachsen. Ab diesem Moment scheint der Zellzyklus einzufrieren, die Zellteilung wird unterbrochen und es werden anscheinend sekundäre Effekte, wie z.B. die Verlängerung der Zellen, der Verlust der Membranintegrität und Zellyse, ausgelöst [74]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das Peptid die

Zellwandbiosynthese am Septum inhibiert und dadurch die Zellteilung blockiert [77].

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die antimikrobielle Aktivität von Mersacidin, die auf der Hemmung der Zellwand-Biosynthese durch spezifische Interaktion mit Lipid II beruht [21, 22], wird durch die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen deutlich gesteigert [5].

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob auch die Aktivität von Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika, d.h. Lantibiotika, die über ein strukturell konserviertes Mersacidin-Lipid II-Bindemotif verfügen (Aminosäuren 12-18) (Abb. 1.8), von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beeinflusst wird. Verschiede *in vitro* und *in vivo* Methoden wurden eingesetzt, um die Rolle der divalenten Ionen im Wirkungsmechanismus der Peptide genauer zu charakterisieren.

Im Detail wurde der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die antimikrobielle Aktivität, auf die spezifische Interaktion mit der Zellwandvorstufe Lipid II und auf die porenbildende Aktivität in künstlichen und bakteriellen Membranen untersucht.

Zusätzlich wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um die bisher unbekanntem Wirkungsmechanismen der Bakteriozine Lacticin 481 und Lactococcin 972 näher zu charakterisieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen weitere Einblicke in die komplexe und diverse Natur der Wirkungsmechanismen der Bakteriozine ermöglichen, deren Aufklärung ein wichtiger Schritt für die Entwicklung neuer, hochwirksamer antimikrobieller Wirkstoffe ist, um auch in Zukunft bakterielle Infektionen effektiv bekämpfen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikaliennachweis

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien entsprachen mindestens dem analytischen Reinheitsgrad und wurden bei den in Tabelle 2.1 aufgelisteten Firmen erworben. Alle übrigen, nicht in dieser Liste aufgezählten Chemikalien wurden von der Firma Merk KGaA (Darmstadt, D) bezogen. UDP-MurNAc-Pentapeptid, aufgereinigt aus dem Cytoplasma von *Staphylococcus simulans* 22 wurde freundlicherweise von Dr. Tanja Schneider<sup>1</sup> zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2.1:** Verwendete Chemikalien

Hersteller	Chemikalien
Amersham (Braunschweig, D)	Sephadex™ G-50 Medium, Uridin Diphospho- <i>N</i> -Acetyl-D-[U- <sup>14</sup> C]-Glucosamin [9,69 GBq/mmol und 11,2 GBq/mmol; 1,85 MBq/2 ml], [U- <sup>14</sup> C]-Glycin [3,7 GBq/mmol]
Avanti Polar Lipids Inc. (Birmingham, GB)	DOPC
Baker (Griesheim, D)	Acetonitril, Chloroform, Isopropanol, Methanol, Wasser (HPLC-Grade)
Bio-Rad Laboratories, GmbH (München, D)	TEMED
Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, D)	2-Mercaptoethanol, IPTG, SDS

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<sup>1</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie – Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn, 53115 Bonn, Deutschland.

Tabelle 2.1 – Fortsetzung

Hersteller	Chemikalien
Difco (USA)	Pepton
Fluka (Buchs, CH)	SDS
ICN Biomedicals Inc. (Frankfurt, D)	Glycerin
KMF Laborchemie Handels GmbH (Lohmar, D)	NaCl, 1 N Natronlauge, 1 N Salzsäure, Schwefelsäure
Larodan Fine Chemicals (Malmö, S)	Undecaprenyl-Phosphat, Undecaprenyl-Pyrophosphat
MP Biomedicals Inc. (Irvine, USA)	Glycin
New England Biolabs GmbH (Frankfurt, D)	Coomassie Brilliant Blue R 250, Prestained Protein Marker (Broad Range (6-175 kDa))
Oxoid (Basingstoke, GB)	Hefeextrakt, M17-Broth
Pharmacia (Uppsala, S)	Ammoniumsulfat, DTT
Qiagen GmbH (Hilden, D)	DNA/RNA Maxi Kit, Ni-NTA-Agarose
Ratiopharm GmbH (Ulm, D)	Vancomycin
Riedel-de Haën (Seelze, D)	CerIV-sulfat-4-hydrat
Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)	Acrylamid/Bisacrylamid, Ammoniumheptamolybdat, SDS
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)	Ammoniumhydroxid, Ammoniumoxoperdisulfat, Ampicillin, L(+)-Ascorbinsäure, ATP, Carboxyfluorescein, Cholin Chlorid, $\beta$ -Glycerophosphat, MES, MOPS, D-/L-Methionin, Deoxyribonuclease I, Kaliumsulfat, Lysozym, Trifluoressigsäure, Tris-HCl, Triton X-100

### 2.1.2 Gerätenachweis

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.2 angegeben.

**Tabelle 2.2:** Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Anaerobentopf IQ	BBL Microbiology Systems (Cockeysville, USA)
<u>Elektroporationsgerät:</u>	
Pulse Controller Plus; Gene Pulser <sup>®</sup> II; Elektroporationsküvette	Bio-Rad Laboratories, GmbH (München, D)
Exsikkator	Glaswerk Wertheim (Wertheim, D)
<u>Fluoreszenzmessungen:</u>	
RF-5301PC Spectrifluorophotometer	Shimadzu (Duisburg, D)
Präzisions-Küvetten 101-QS; Magnetrührer Cuv-O-sir Modell 333	Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim, D)
<u>Gefriertrocknungsanlage:</u>	
Beta	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode, D)
Vacuum Duo 5	Pfeiffer (Asslar, D)
<u>Gel-Elektrophorese:</u>	
Gelkammer Mini-Protean <sup>®</sup> 3; Stromversorgung Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories, GmbH (München, D)
Heizblock	Stuart Scientific, GmbH (München, D)
<u>HPLC:</u>	
HPLC-Anlage; Holochrome Detector Zweikanalschreiber	Gilson (Villiers-le-Bel, F) Kipp & Zonen BV (Delft, NL)
<u>Inkubatoren:</u>	
30°C; 37°C; Rotationsinkubator	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.2 – Fortsetzung

Gerät	Hersteller
Schüttelinkubator Series 25 (37°C)	New Brunswick Scientific Co., Inc. (Edison, USA)
<u>Kalium-Elektrode:</u>	
MI-409 Micro-Reference Electrode;	Microelectrodes, Inc. (Bedford, USA)
MI-442 Potassium Electrode	
pH 213 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments (Kehl am Rhein, D)
<u>Liposomenpräparation:</u>	
Swinnex-Gewinde; Isopore™ 0.4 µm	Millipore GmbH (Billerica, USA)
HTTP Polycarbonat Membranfilter	
<u>Magnetrührer:</u>	
Hotplate Stirrer LMS-1003	IDL GmbH & Co.KG (Nidderau, D)
R-10	C. Gerhardt GmbH & Co.KG (Königswinter, D)
Membranpumpe	Rudolf Brand GmbH & Co. (Wertheim, D)
Mikrowelle Micromat 175 Z	AEG (Berlin, D)
<u>pH-Meter:</u>	
pH-Meter CG810	Schott Geräte GmbH (Hofheim, D)
Inlab Routine®	Mettler-Toledo (Giessen, D)
<u>Photometer:</u>	
Novaspec® II Photometer	Pharmacia (Uppsala, S)
Spectrophotometer 150-20(UV/Visible)	Hitachi Ltd., (Tokyo, J)
UV-160 Photometer	Shimadzu (Duisburg, D)
Reinstwasseranlage Easy Pure LF®	Barnstead International (Dubuque, USA)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.2 – Fortsetzung

Gerät	Hersteller
<u>Rotationsverdampfer:</u>	
Rotary Evaporator RE 100; Water Bath RE 100 B	Bibby Sterlin Ltd. (Stone Staffordshire, GB)
vacUUbrand CVC-24	Rudolf Brand GmbH & Co. (Wertheim, D)
Sterilisator	Memmert GmbH & Co.KG (Schwabach, D)
Ultraschallbad Branson <sup>®</sup> 1510 E-MT	Branson (Danbury, USA)
Ultraschallgerät UP50H	Dr. Hielscher GmbH (Teltow, D)
Varioklav Dampfsterilisator	H + P Labortechnik GmbH (Oberschleiß- heim, D)
Vakuumpumpe vacUUbrand	Rudolf Brand GmbH & Co. (Wertheim, D)
<u>Visualisierung und Quantifizierung radioaktiver Substanzen:</u>	
Storm 820; Image Eraser; Phosphor Storage Screen	Amersham Bioscience (Buckinghamshire, GB)
Szintillationszähler LS 6500 Multi Purpose	Beckman Coulter Inc. (Fullerton, USA)
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
<u>Waagen:</u>	
Analysenwaage A 200 S; Laborwaage; Microwaage MP3	Sartorius GmbH (Göttingen, D)
<u>Wasserbäder:</u>	
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik m.b.H. & Co. (Burgwedel, D)
Schüttelwasserbad	Kottermann KG (Hänigsen, D)
Schüttelwasserbad SW-20	Julabo Labortechnik GmbH (Selbach, D)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

**Tabelle 2.2** – Fortsetzung

Gerät	Hersteller
Wasservollentsalzer AQUADEM®	Wilhelm Werner GmbH (Leverkusen, D)
<u>Zentrifugen:</u>	
Biofuge 28 RS; Biofuge A	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)
Model J2-21 Centrifuge	Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, USA)
Sigma 2K15	B. Braun Biotech International GmbH (Melsungen, D)
Zinnkartuschen	HEKAtech GmbH (Wegberg, D)

### 2.1.3 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 2.3 aufgelistet und wurden den Herstellerangaben entsprechend angesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten bzw. Weichagar wurde die Nährbouillon zusätzlich mit 15 g/l bzw. 0,3 % Agar-Agar versetzt.

**Tabelle 2.3:** Verwendete Nährmedien

Nährmedium und Hersteller	Zusammensetzung
Blutagar (Blutagar Basis Nr. 2), Oxoid	15 g/l Pepton 2,5 g/l Leberextrakt 5,0 g/l Hefeextrakt 5,0 g/l Natriumchlorid 12 g/l Agar-Agar pH 7,4 Nach dem Autoklavieren wurden bei einer Temperatur von 45-50°C 5 % steriles, defibriniertes Schafsblut zugegeben und anschließend die Agarplatten gegossen.
Lacticin 481-Produktionsmedium: (entspricht dem Nisin-Produktionsmedium [66])	10 g/l Hefeextrakt 10 g/l Pepton (Difco) 10 g/l Saccharose

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.3 – Fortsetzung

Nährmedium und Hersteller	Zusammensetzung
	10 g/l Kaliumdihydrogenphosphat 2 g/l Natriumchlorid 20 mg/l Magnesiumsulfat pH 7,5
Lacticin 3147-Produktionsmedium [70]:	
a) Grundmedium	3,125 g/l Trypton 6,25 g/l Hefeextrakt 1,875 g/l D-/L-Methionin 62,5 mg/l Mangansulfat 156,25 mg/l Magnesiumsulfat
b) Glucose-Lösung	100 g/l D-Glucose
c) $\beta$ -Glycerophosphat-Lösung	190 g/l $\beta$ -Glycerophosphat
	Für 1 l Produktionsmedium wurden 800 ml Lösung a und jeweils 100 ml der Lösungen b und c angesetzt, autoklaviert und anschließend der Reihe nach steril zusammengegeben.
Luria-Bertani (LB)-Bouillon	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid pH 7,5
GM17-Bouillon, Oxoid	M17 Bouillon mit zusätzlich 0,5 % D-Glucose (5 g/l)
GM17-Agar, Oxoid	M17 Agar mit zusätzlich 0,5 % D-Glucose (5 g/l)
M17-Bouillon, Oxoid	5 g/l Caseinpepton 5 g/l Sojamehlpepton 5 g/l Fleischextrakt 'Lab-Lemco' 2,5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l Ascorbinsäure 0,2 g/l Magnesiumsulfat 19 g/l Dinatrium- $\beta$ -glycerophosphat

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.3 – Fortsetzung

Nährmedium und Hersteller	Zusammensetzung
M17-Agar, Oxoid	pH 6,9 M17 Bouillon mit zusätzlich 11 g/l Agar-Agar
1/2 Mueller-Hinton Bouillon	halbkonzentrierte Mueller-Hinton Bouillon
Mueller-Hinton-Bouillon (cation adjusted), Oxoid	30 g/l Fleischextrakt 17,5 g/l Caseinhydrolysat 1,5 g/l Stärke
MRS-Bouillon, Merck	pH 7,3 10 g/l Caseinpepton 8 g/l Fleischextrakt 4 g/l Hefeextrakt 20 g/l D-Glucose 2 g/l di-Kaliumhydrogenphosphat 1 g/l Tween <sup>®</sup> 80 2 g/l di-Ammoniumhydrogencitrat 5 g/l Natriumacetat 0,2 g/l Magnesiumacetat 0,04 g/l Mangansulfat
MRS-Agar, Merk	pH 5,7 MRS-Bouillon mit zusätzlich 14 g/l Agar-Agar
CASO (TSB)-Bouillon, Merk	20 g/l Pepton (nicht tierischen Ursprungs) 2,5 g/l D(+)-Glucose 5 Natriumchlorid 2,5 g/l di-Kaliumhydrogenphosphat pH 7,3

#### 2.1.4 Antibakterielle Substanzen

Antibiotika, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Ihre Lagerung erfolgte lyophilisiert oder als Stocklösung bei -20°C.

Tabelle 2.4: Antibakterielle Substanzen

Lantibiotika	Stocklösung	Herkunft
Lacticin 481	1 µg/µl, 2 µg/µl, 5 µg/µl; in 30 % Isopropanol gelöst	wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigt
Lacticin 3147	1 µg/µl, 2 µg/µl, 5 µg/µl; beide Lacticin 3147-Peptide wurde einzeln in 30% Isopropanol gelöst	wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigt
Mersacidin	10 µg/µl; in Methanol gelöst; geringer konzentrierte Stocklösungen [1 µg/µl] wurden durch 1:10 Verdünnung mit A. dest. erzielt	Hoechst AG, D
Nisin	1 µg/µl, 2 µg/µl, 5 µg/µl; gelöst in 0.05 % Essigsäure	wurde freundlicherweise von Dr. Imke Wiedemann <sup>a</sup> zur Verfügung gestellt
Plantaricin C	1 µg/µl, 2 µg/µl, 5 µg/µl; gelöst in A. dest.	wurde freundlicherweise von Dr. Beatriz Martínez <sup>b</sup> zur Verfügung gestellt
Lactococcin 972	275 µg/ml	wurde freundlicherweise von Dr. Beatriz Martínez <sup>b</sup> zur Verfügung gestellt

<sup>a</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie – Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn, 53115 Bonn, Deutschland.

<sup>b</sup>Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC, 33300 Villaviciosa, Asturien, Spanien.

### 2.1.5 Bakterienstämme und ihre Lagerungsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 2.5 angegeben. Alle Stämme wurden als Glycerinkulturen (50 % v/v) bei -70°C aufbewahrt. Für eine häufige Verwendung wurden *Micrococcus luteus* DSM 1790- und *Staphylococcus simulans* 22-Kulturen zusätzlich bei 4°C auf Blut- oder TSB-Agar gelagert und regelmäßig neu überimpft. Eine *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP-Glycerinkultur wurde zu diesem Zweck bei -20°C verwahrt.

Der Lacticin 481-produzierende Stamm *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C270 wurde

Tabelle 2.5: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Herkunft/Literatur
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Expressionsstamm	Promega GmbH, Mannheim, D
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	Indikatorstamm für Plantaricin C	ATCC <sup>a</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	Indikatorstamm für Lactococcin 972	Gasson (1983) [41]
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 pMRC01 pOM02	Lacticin 3147-Überproduzent	Cotter <i>et al.</i> (2006)[31]
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C270	Lacticin 481-Produzent	Rilla-Villa <i>et al.</i> (2003)[92]
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> HP	Indikatorstamm für Lacticin 481 und 3147	DPC culture collection <sup>b</sup>
<i>Micrococcus luteus</i> DSM 1790	Indikatorstamm und Membranpräparation	DSMZ <sup>c</sup>
<i>Staphylococcus simulans</i> 22	Indikatorstamm und UDP-MurNAc-Präparation	Sahl <i>et al.</i> (1981)[101]

<sup>a</sup>ATCC, American Type Culture Collection.

<sup>b</sup>DPC, Dairy Products Research Centre, Teagasc, Moorepark, Fermoy, Co. Cork, Irland.

<sup>c</sup>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

freundlicherweise von Dr. Beatriz Martínez<sup>2</sup>, der Lacticin 3147-Produzent *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 pMRC01 pOM02 von Dr. Paul Cotter<sup>3</sup> zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Sterilisationsverfahren

Die Sterilisation von Nährmedien, Lösungen und Pipettenspitzen erfolgte durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C. Glaswaren wurden für vier Stunden bei 200°C in

<sup>2</sup>Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC, 33300 Villaviciosa, Asturien, Spain.

<sup>3</sup>Departement of Microbiology, University College Cork, Cork, Irland.

einem Ofen sterilisiert.

### 2.2.2 Anzucht und Wachstumsbedingungen der einzelnen Bakterienstämme

Alle Bakterienhauptkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, aus 5 ml Über-Nacht-Vorkulturen (ÜN-Vk) angeimpft. Diese ÜN-Vks wurden mit Zellmaterial entsprechender, auf Agarplatten ausgestrichener Bakterienkulturen inokuliert und im entsprechenden Brutschrank inkubiert. Die Anzucht- und Wachstumsbedingungen sind in Tabelle 2.6 aufgelistet. Im Falle von *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP wurde GM17-Bouillon mit 50 µl der bei -20°C gelagerten Glycerinkultur angeimpft und inkubiert.

Transformierte *E. coli* BL21 (DE3)-Kulturen, die ein Resistenzplasmid gegen Ampicillin trugen, wurden unter Selektionsdruck kultiviert und aufbewahrt. Hierzu wurde dem Nährmedium Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

**Tabelle 2.6:** Wachstumsbedingungen der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Wachstumsbedingungen
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	LB-Bouillon; aerob bei 37°C im Rotationsinkubator oder Schüttelwasserbad
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	MRS-Bouillon; anaerob (mittels Anaeroben-Topf) bei 37°C
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363	GM17-Bouillon; aerob bei 30°C
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 pMRC01 pOM02	GM17-Bouillon bzw. Lacticin 3147-Produktionsmedium; aerob bei 30°C
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> C270	GM17-Bouillon bzw. Lacticin 481-Produktionsmedium; aerob bei 30°C
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> HP	GM17-Bouillon; aerob bei 30°C
<i>Micrococcus luteus</i> DSM 1790	CASO-Bouillon; aerob bei 37°C im Rotationsinkubator oder Schüttelwasserbad
<i>Staphylococcus simulans</i> 22	CASO-Bouillon; aerob bei 37°C im Rotationsinkubator oder Schüttelwasserbad

### 2.2.3 Agardiffusionstest

Während den verschiedenen Schritten der Peptidaufreinigung wurden die aufzureinigenden Lantibiotika über ihre antimikrobielle Aktivität im Agardiffusionstest nachgewiesen.

100 µl-Proben wurden für 1 h in einen Exsikkator gestellt, um Lösungsmittel zu entfernen. Zur Herstellung von Indikatoragarplatten wurde GM17-Weichagar in Glasröhrchen (3 ml/Röhrchen) in einer Mikrowelle aufgeköcht und anschließend im Wasserbad auf 50-60°C abgekühlt. Der noch flüssige Weichagar wurde anschließend mit 15 µl einer *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP-ÜN-Vk ( $OD_{600} \approx 0,5$ ) beimpft, gevortext und auf einer GM17-Agarplatte als dünne Agarschicht gleichmäßig verteilt. Nach Erstarren des Weichagars wurden Löcher mit einem Durchmesser von 0.5 cm in den überschichteten GM17-Agar gestanzt und 5-10 µl Probenvolumen in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 30°C konnten die peptidhaltigen Fraktionen durch einen Hemmhof im gewachsenen Bakterienrasen identifiziert werden.

#### 2.2.4 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die MHK ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, die kein sichtbares Bakterienwachstum mehr erlaubt.

Im Mikrobouillondilutionstest wurden Verdünnungsreihen (1:2 Verdünnungen) der zu testenden antibakteriellen Substanzen in 100 µl Medium (GM17-Bouillon bei *L. lactis* ssp. *cremoris* HP und 1/2 MH-Bouillon bei *M. luteus* DSM 1790 als verwendeter Indikatorstamm) in Mikrotiterplatten (U-Form, unbeschichtet, Greiner, Frickenhausen, D) angelegt. Die Indikatorstämme wurden im selben Medium bis zu einer  $OD_{600} = 1$  angezogen und mit der Bouillon auf eine Zelldichte von  $2 \times 10^5$  KBE/ml verdünnt. Als Berechnungsgrundlage diente der für *S. simulans* 22 ermittelte Wert von  $2 \times 10^9$  KBE/ml bei einer  $OD_{600}$  von 1 (H.-G. Sahl, pers. Mitteilung). Diese Beziehung wurde für alle anderen Spezies in der Näherung übernommen. 100 µl der Bakteriensuspension wurden mit der Antibiotikallösung vermischt (200 µl Endvolumen) und inkubiert (18 Stunden bei 30°C für *L. lactis* ssp. *cremoris* HP bzw. 24 Stunden bei 37°C für *M. luteus* DSM 1790).

Um den Einfluss von Calciumionen auf die antibakterielle Aktivität von Lacticin 481, Lacticin 3137, Mersacidin und Plantaricin C zu testen, wurde die MHK der Peptide gegen den gemeinsamen Indikatorstamm *Micrococcus luteus* DSM 1790 in mit 1,25 mM  $CaCl_2$  supplementierter 1/2 MH-Bouillon bestimmt. Bei MH-Bouillon handelt es sich um ein Minimalmedium mit einem definierten Gehalt an divalenten Ionen ( $Ca^{2+}$  4,652 mg/l,  $Mg^{2+}$  5,639 mg/l (Angaben des Herstellers)). Es wurden zusätzlich zu den seriellen 1:2 Verdünnungen Zwischenschritte (1:2) beginnend mit 3/4 der höchsten verwendeten Konzentration durchgeführt.

Die MHKs der untersuchten Peptide wurden mindestens doppelt bestimmt.

### 2.2.5 Antagonisierungstest

Die spezifische Interaktion des Lantibiotikums Lacticin 481 mit den Zellwandvorstufen Lipid I und Lipid II, dem Membrananker C<sub>55</sub>-P und C<sub>55</sub>-PP wurde im Antagonisierungstest untersucht. Das Peptid wurde mit jeweils einem dieser Lipide vorinkubiert (molares Verhältnis Lipid:Lacticin 481 2:1) und anschließend als höchste Konzentration in die MHK-Bestimmung eingesetzt. Dazu wurde die entsprechende Menge Lipid im Exsikkator eingetrocknet und in 5 µl Methanol resuspendiert, bevor es in einem Endvolumen von 100 µl 1/2 MH-Bouillon mit dem Lantibiotikum 15 min bei RT inkubiert wurde.

Ein Ausbleiben der sichtbaren Wachstumshemmung durch Lacticin 481 deutet eine spezifische Interaktion zwischen Peptid und Lipid an, welche eine Antagonisierung der antimikrobiellen Aktivität zur Folge hatte.

### 2.2.6 Kalium-Efflux-Experimente mit ganzen Bakterienzellen

Kalium-Efflux-Experimente wurden mit Hilfe einer Kalium-selektiven Elektrode (MI-441 Potassium microelectrode), einer Referenzelektrode (MI-409 Micro-Reference electrode) und eines Mikroprozessor pH-Meters (pH 213) durchgeführt [84]. Um stabile Messungen zu gewährleisten, wurden beide Elektroden vor Durchführung der Messungen mindestens eine Stunde lang in Cholinchlorid-Puffer [300 mM Cholinchlorid, 30 mM Mes, 20 mM Tris, pH 6,5] äquilibriert. Vor jeder einzelnen Messung wurden Kalibrierungsmessungen mit Kalium-Standardlösungen durchgeführt, die 0,01, 0,1 und 1 mM KCl in Cholinchlorid-Puffer enthielten.

Der peptidinduzierte Kaliumausstrom wurde aus ganzen Bakterienzellen von *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP bzw. *Micrococcus luteus* DSM 1790 bestimmt. 100 ml Nährbouillon mit 2 ml einer entsprechenden ÜN-VK angeimpft und wie in Tabelle 2.6 beschrieben, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1-1,5 angezogen. Anschließend wurden die Bakterienzellen abgeerntet (Heraeus Biofuge 28 RS, 3000 × g, 4°C, 3 min), mit Cholinchlorid-Puffer gewaschen und anschließend mit einer OD<sub>600</sub> = 30 in Cholinchlorid-Puffer resuspendiert, auf Eis gehalten und so schnell wie möglich verwendet.

Messungen wurden in 2 ml Zellsuspension, mit Cholinechlorid-Puffer auf eine OD<sub>600</sub> von 3 verdünnt, über einen Zeitraum von 5 min bei kontinuierlichem Umrühren der Bakteriensuspension mittels eines Magnetrührers durchgeführt. Messwerte wurden alle 10 s genommen und der peptidinduzierte Kalium-Efflux wurde relativ zur Gesamtmenge an freigesetztem Kalium nach Zugabe von 1 µM Nisin dargestellt. Die Berechnung des Kalium-Efflux in Prozent erfolgte mit Hilfe der von Orlov *et al.* aufgestellten Gleichungen [84].

Um den Einfluss von Calcium auf die porenbildende Aktivität von Lacticin 3147 zu untersuchen, wurden die Messungen auch in calciumfreiem Puffer durchgeführt. Der Cholinchlorid-Puffer wurde zusätzlich mit 10 mM Titriplex VI, einem Chelator mit sehr hoher Affinität für divalente Ionen insbesondere für  $\text{Ca}^{2+}$ , versetzt.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Lantibiotika-Gewinnung

#### Lacticin 481-Produktion und Chloroform-Extraktion

Die Aufreinigung erfolgte aus insgesamt 2 l *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C270-Kultur. Jeweils 1 l Lacticin 481-Produktionsmedium wurde in einem 2 l-Erlenmeyerkolben mit 50 ml einer ÜN-Vk des Produzentenstammes inokuliert und für 8 h bei 30°C inkubiert. Der pH-Wert der Hauptkultur wurde regelmäßig kontrolliert und mit 1 N NaOH justiert, damit er nicht unter pH 6 sank. Anschließend wurden die Bakterienzellen abgeerntet (Beckman Model J2-21 Zentrifuge,  $10.000 \times g$ , 10 min, 4°C) und Lacticin 481 nach einer von Bonelli *et al.* beschriebenen Methode [9] aufgereinigt. Der zellfreie, bakteriozinhaltige Kulturüberstand wurde mit Chloroform versetzt (0,1:1 v/v) und für 1 h bei 4°C stark gerührt. Zur Phasentrennung wurde der lösungsmittelhaltige Kulturüberstand zentrifugiert (Beckman Model J2-21 Zentrifuge,  $10.000 \times g$ , 10 min, 4°C). Anschließend wurden die obere wässrige (Kulturüberstand) und die untere Lösungsmittelephase (Chloroform) vorsichtig abgenommen, um die Interphase, welche das Peptid enthält, zu isolieren. Dieser Zentrifugationsvorgang wurde 3-4-mal wiederholt, bis ein nahezu trockenes Interphasepellet vorhanden war. Dieses wurde bei 4°C gelagert, während mit der wässrigen Phase (Kulturüberstand) eine zweite Chloroform-Extraktion durchgeführt wurde. Die Interphase-Pellets beider Extraktionen wurden vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert.

#### Aufreinigung von Lacticin 481 mittels HPLC

Zur Aufreinigung von Lacticin 481 wurde eine präparative HPLC-Säule (Nucleosil-100-C18 10  $\mu\text{m}$ ,  $250 \times 20$  mm ID) der Firma Schambeck SFD GmbH (Bad Honnef, D) verwendet. Die lyophilisierte Probe der Chloroform-Extraktion wurde in 10 ml 30% Isopropanol 0,1% TFA aufgenommen und unlösliches Material durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge A, ca.  $2.500 \times g$ , 3 min) abgetrennt. Der Überstand der Probe wurde mit Hilfe eines Gradienten aus Puffer A [HPLC-Wasser 0,1 % TFA] und Puffer B [Isopropanol 0,1 % TFA] aufgetrennt. Folgender Gradient wurde verwendet: 0-25 % Puffer B in 3 min,

25-42 % B in 22 min, von 42-50 % Puffer B in 15 min, von 50-100 % B in 2 min, 3 min bei 100 % Puffer B spülen und zurück auf 0 % Puffer B in 2 min bei einer Flussrate von 8 ml/min. Die Elution des Peptids wurde bei 220 nm OD = 2 detektiert und die Lacticin 481-haltigen Fraktionen mittels Agardiffusionstest (siehe Kapitel 2.2.3) identifiziert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert und anschließend bei -20°C gelagert.

Für eine weitere Aufreinigung wurde eine Rechromatographie unter gleichen Bedingungen, aber einem modifizierten Gradienten durchgeführt. Das Lyophilisat wurde in 10 ml 30 % Isopropanol 0,1 % TFA resuspendiert, auf die Säule aufgetragen und in einem einzelnen Lauf mit folgendem Gradienten aufgetrennt: 30-40 % Puffer B in 2 min, 8 min bei 40 % B spülen, 40-50 % Puffer B in 30 min, 50-100 % B in 2 min, 3 min bei 100 % B spülen und in 2 min wieder auf 0 % Puffer B bei einer Flussrate von 8 ml/min. Die peptidhaltigen Fraktionen wurden erneut mittels Agardiffusionstest (siehe Kapitel 2.2.3) identifiziert, vereinigt und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bei -20°C gelagert. Stocklösungen wurden in 30% Isopropanol angesetzt und bei -20°C aufbewahrt (siehe Kapitel 2.1.4).

### **Lacticin-3147-Produktion und Aufreinigung**

Die Lacticin 3147-Aufreinigung wurde mit einigen Modifikationen, wie bereits von Martin *et al.* beschrieben [70], durchgeführt.

### **Lacticin 3147-Extraktion**

Die Aufreinigung erfolgte aus insgesamt 4 l *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 pMRC01 pOM02-Kultur, verteilt auf vier 2 l Erlenmeyerkolben. Jeweils 1 l Lacticin 3147-Produktionsmedium wurden mit 10 ml einer Produzentenstamm-ÜN-Vk angeimpft und für ca. 20 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde jeder 1 l-Kultur 50 g Ammoniumsulfat und 75 mg DTT zugegeben und die Zellen abgeerntet (Beckman Model J2-21 Centrifuge, 10.000 × g, 20 min, 4°C). Die Zellen wurden in 250 ml 70 % Isopropanol 0,1 M DTT resuspendiert, die Zellsuspension für 5 min im Ultraschallbad entgast und anschließend für 3,5 h bei 4°C stark gerührt. Nach einer weiteren Zentrifugation (Beckman Model J2-21 Centrifuge, 10.000 × g, 20 min, 4°C) wurde der zellfreie Überstand (erster Extrakt) bei 4°C aufbewahrt. Das Zellpellet wurde erneut in 250 ml 70 % Isopropanol 0,1 M DTT resuspendiert, für 5 min im Ultraschallbad entgast und anschließend wieder für 3,5 h bei 4°C gerührt. Nach dem Abzentrifugieren der Suspension (Beckman Model J2-21 Centrifuge, 10.000 × g, 20 min, 4°C) wurde der zellfreie Überstand (zweiter

Extrakt) mit dem ersten Extrakt vereinigt, das Volumen in einem Rotationsverdampfer reduziert (35-40°C, 80 mbar), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert.

### **Auftrennung und Isolierung der einzelnen Lacticin 3147-Peptide mittels HPLC**

Die Auftrennung und Isolierung der beiden Lacticin 3147-Komponenten erfolgte über eine präparative HPLC-Säule (Nucleosil-100-C18 10 µm, 250 × 20 mm ID) der Firma Schambeck SFD GmbH (Bad Honnef, D). Der lyophilisierte Extrakt wurde in 20 ml 24 % Isopropanol 0,1 % TFA aufgenommen und unlösliches Material durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge A, ca. 2500 × g, 3 min) entfernt. Der Überstand wurde in einem Gradienten aus Puffer A [HPLC-Wasser 0,1% TFA] und Puffer B [Isopropanol 0,1 % TFA] aufgetrennt und in zwei Läufen auf die Säule aufgetragen. Folgender Gradient wurde verwendet: in 45 min von 24 % B auf 50 % B und in 1 min wieder auf 24 % B bei einer Flussrate von 8 ml/min. Die Elution der Peptide wurde bei 220 nm OD = 2 detektiert.

Das nicht gelöste Material wurde erneut in 10 ml 24 % Isopropanol 0,1 % TFA re-suspendiert und abzentrifugiert (Heraeus Biofuge A, 2500 × g, 5 min). Der Überstand wurde auf die Säule gegeben und mit dem gleichen Gradienten aufgetrennt.

Die Lacticin 3147 A1- und A2-haltigen Fraktionen wurde mittels Agardiffusionstest (siehe Kapitel 2.2.3) identifiziert. Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden entsprechend vereinigt, lyophilisiert und bei -20°C gelagert. Stocklösungen wurden in 30% Isopropanol angesetzt und bei -20°C aufbewahrt (siehe Kapitel 2.1.4).

### **Massenspektrometrie**

Die Massen des aufgereinigten Lacticin 481 und der isolierten Lacticin 3147-Peptide wurden von Michael Josten<sup>4</sup> mittels eines Biflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonic GmbH, Bremen/Leipzig, D) bestimmt.

### **2.3.2 Membranpräparation von *Micrococcus luteus* DSM 1790**

*Micrococcus luteus* DSM 1790 wurde in 2 l CASO-Bouillon bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 angezogen und abgeerntet (Beckman Model J2-21 Centrifuge, 10.000 × g, 10 min, 4°C). Die Zellen wurden nach einem Waschschrift in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 in Puffer [50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5] mit Lysozym [100 mg/ml] und DNase [10 mg/ml] für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 35°C

---

<sup>4</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie, Universitätsklinikum Bonn, 53127 Bonn, Deutschland.

erwärmt und wieder auf Eis abgekühlt. Die Membranen wurden durch Zentrifugation (Beckman Model J2-21 Centrifuge,  $40.000 \times g$ , 20 min,  $4^\circ\text{C}$ ) isoliert, in 8 ml Puffer resuspendiert und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.3.3 Grobe Aufreinigung von UDP-MurNAc-Pentapeptid

UDP-MurNAc-Pentapeptid wurde aus dem Cytoplasma von *Staphylococcus simulans* 22, wie von Kohlrausch und Höltje beschrieben [62], aufgereinigt. Exponentiell wachsenden Zellen ( $\text{OD}_{600} = 0,75$ ) wurde, um die lösliche Zellwandvorstufe in den Bakterienzellen zu akkumulieren, Chloramphenicol [ $130 \mu\text{g/ml}$ ] und nach 15-minütiger Inkubation Vancomycin [ $5 \mu\text{g/ml}$ ] zugegeben. Nach weiteren 60 min wurden die Bakterienzellen abgeerntet (Beckman Model J2-21 Centrifuge,  $12.000 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) und in A. dest. aufgenommen. Die Zellsuspension wurde langsam unter Rühren in das 2,5-fache Volumen kochenden A. dest. gegeben und 15 min gekocht. Durch Zentrifugation (Beckman Model J2-21 Centrifuge,  $48.000 \times g$ , 30 min,  $4^\circ\text{C}$ ) der abgekühlten Suspension wurden Zelltrümmer entfernt und der Überstand anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat (grobes Substrat) wurde in A. dest. gelöst und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.3.4 *In vitro* Lipid I- und Lipid II-Synthese und -Aufreinigung

Die *in vitro* Synthese und Aufreinigung der Zellwandvorstufen Lipid I und Lipid II wurden durchgeführt wie von Schneider *et al.* [106] beschrieben.

#### *In vitro* Lipid I-Synthese

Die *in vitro* Lipid I-Synthese erfolgte durch eine Membranpräparation aus *Micrococcus luteus* DSM 1790 (siehe Kapitel 2.3.2). Als Substrat diente der Lipid-Carrier  $\text{C}_{55}\text{-P}$  und aus *Staphylococcus simulans* 22 grob aufgereinigtes UDP-MurNAc-Pentapeptid (grobes Substrat) (siehe Kapitel 2.3.3). Da die Syntheseleistung der unterschiedlichen Membranpräparationen variiert, wurde die optimale Membrankonzentration durch Titration bestimmt. Ein analytischer Ansatz enthielt 400-800  $\mu\text{g}$  Membranprotein, 10 nmol  $\text{C}_{55}\text{-P}$ , 100 nmol UDP-MurNAc-Pentapeptid (grob aufgereinigt), 5 mM  $\text{MgCl}_2$  in 60 mM Tris/HCl, pH 7,5 and 0,5 % Triton X-100 (v/v) in einem Gesamtvolumen von 150  $\mu\text{l}$ . Das Undecaprenylphosphat wurde 20 min im Exsikkator eingetrocknet, um organische Lösungsmittel zu entfernen. Nach Zugabe der Detergenzlösung wurden die Proben 1 min gevortext, UDP-GlcNAc und  $\text{MgCl}_2$  in Tris/HCl-Puffer und zuletzt die präparierten Membranen zugegeben. Die Inkubation erfolgte 1 h bei  $30^\circ\text{C}$ . Die Extraktion der Lipide

erfolgte wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben. Anschließend wurden die Extrakte dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben, analysiert.

Für eine Aufreinigung größerer Lipidmengen (mg-Bereich) wurde der analytische Ansatz mit der optimalen Umsetzung 250-fach gesteigert. Bei der Lipidextraktion wurde die gesamte obere Phase abgenommen und diese mit dem gleichen Volumen 4°C kaltem A. dest. (pH 4,2) gewaschen und über eine DEAE-Agarose-Säule (HiTrap DEAE FF, 5 ml BV, Amersham Biosciences, D) durch Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Es wurde ein linearer Ammoniumcarbonat-Gradient (Puffer A: Chloroform, Methanol, HPLC-Wasser (2:3:1 v/v/v); Puffer B: Chloroform, Methanol, 300 mM Ammoniumbicarbonat (2:3:1 v/v/v); in 180 min von 0 auf 25 % B mit einer Flussrate von 5 ml/min) für die Elution des Lipid I verwendet. Lipid I-haltige Fraktionen wurden, wie oben beschrieben, dünnschichtchromatographisch identifiziert, vereinigt und das enthaltene Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer entfernt. Die wässrige Lipidlösung wurde lyophilisiert, in Chloroform/Methanol (1:1 v/v) gelöst und bei -20°C gelagert. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte, wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben.

### ***In vitro* Lipid II-Synthese**

Die *in vitro* Lipid II-Synthese wurde, wie für Lipid I beschrieben, durchgeführt, mit der Ausnahme, dass der analytische Ansatz als zusätzliches Substrat 100 mmol UDP-GlcNAc enthielt.

### **2.3.5 Synthese und Aufreinigung von radioaktiv markiertem Lipid II**

Die Synthese von radioaktiv markiertem Lipid II wurde prinzipiell, wie für unmarkiertes Lipid II beschrieben (siehe Kapitel 2.3.4), durchgeführt. Der präparative Ansatz (13-facher analytischer Ansatz) enthielt aufgereinigtes UDP-MurNAc-Pentapeptid (kein grobes Substrat) und 2 % des eingesetzten UDP-GlcNAc wurden durch radioaktives [<sup>14</sup>C]-UDP-GlcNAc [9,69 GBq/mmol] ersetzt. Die Aufreinigung von radiomarkiertem Lipid II erfolgte über eine DEAE-Agarose-Säule (HiTrap DEAE FF, 1 ml BV, Amersham Biosciences, D) unter Verwendung des folgenden Stufengradienten: 0-5 min 5 % Puffer B, 5-10 min 10% B, 10-15 min 15% Puffer B, 15-20 min 20% B, 20-25 min 25 % Puffer B, 25-30 min 30 % B, 30-35 min 100 % Puffer B und 35-40 min 0 % B bei einer Flussrate von 1 ml/min. Radiomarkierte Lipid II-haltige Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Anfärbung der Lipide mit Ioddampf identifiziert, vereinigt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in Chloroform/Methanol (1:1 v/v) gelöst und bei -20°C gelagert. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte wie in

Kapitel 2.3.8 beschrieben. Die Probe mit radiomarkiertem Lipid II wurde dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt und die mit Ioddampf temporär sichtbar gemachte LII-Bande markiert. Nach Abdampfen des Iods wurde das Lipid II-haltige Kieselgel von der Kieselgelplatte abgeschabt und direkt zur Hydrolyse mit Perchlorsäure eingesetzt. Zur Kontrolle wurden gleichbehandelte Proben mit 5 nmol an reinem Lipid II verwendet.

### 2.3.6 Lipidextraktion

Die Extraktion von Lipiden aus den Reaktionsansätzen erfolgte durch die Zugabe des gleichen Volumens *n*-Butanol/Pyridinacetat, pH 4,2 (2:1 v/v) [2]. Die Proben wurden 1 min stark gevortext und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (Biofuge A, 14.000 × g, 10 min). Die obere, lipidhaltige Butanolphase wurde von der unteren wässrigen Phase abgenommen.

### 2.3.7 Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Lipiden

Zum Nachweis von Lipiden in einer Probe wurden 20 µl auf eine Kieselgelplatte (60F<sub>254</sub>, Merck, D) aufgetragen und mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung eines Chloroform-MeOH-A. dest.-konz. Ammoniumhydroxid-Laufmittels (88:48:10:1 v/v/v/v) [91] aufgetrennt. Zum Sichtbarmachen der Lipide wurde die Kieselgelplatte in PMA-Färbereagenz (2,5 % w/v Molybdätophosphorsäure und 1 % w/v Cer(IV)-sulfat in 6 % v/v Schwefelsäure) getaucht, getrocknet und anschließend im Ofen bei 140°C für kurze Zeit erhitzt, bis sich die Lipide blau verfärbt hatten. Diese Methode ist mit einer Detektionsgrenze von ca. 1 µg sehr sensitiv.

### 2.3.8 Phosphat-Test

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes wurde nach der Methode von Rouser [95] durchgeführt.

Die Proben wurden in phosphatfreie Glasröhrchen pipettiert und im Ofen bei 140°C für ca. 25 min getrocknet. Anschließend wurden die eingetrockneten Proben durch Zugabe von 300 µl Perchlorsäure (70-72 %ig) für 1-3 h bei 180°C im Heizblock hydrolysiert. Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe von 1 ml MilliQ-Wasser, 0,4 ml 1,25 % Ammoniumheptamolybdat und 0,4 ml 5 % Ascorbinsäure (frisch angesetzt). Nach kurzem Vortexen wurden die Proben für 5 min in kochendes Wasser gestellt. Von den wieder abgekühlten Proben wurde die Absorption bei 797 nm gegen gleichbehandeltes MilliQ-Wasser gemessen und die Phosphatkonzentration anhand einer Standardreihe von 0-60 nmol Phosphat (Stammlösung: 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung) bestimmt.

### 2.3.9 Hemmung der MurG-katalysierten *in vitro* Lipid II-Biosynthese

*In vitro* Lipid II-Biosynthese-Experimente wurden, wie von Schneider *et al.* beschrieben [104], durchgeführt.

Der MurG-Reaktionsansatz enthielt insgesamt 0,5 µg rekombinantes MurG-His<sub>6</sub> aus *Staphylococcus aureus* NCTC 8325, 2,5 nmol Lipid I, 25 nmol UDP-GlcNAc (2% [<sup>14</sup>C]-UDP-GlcNAc [11,2 GBq/mmol]), 6,8 mM MgCl<sub>2</sub> in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 und 1 % Triton X-100 (v/v) in einem Gesamtvolumen von 30 µl. Lipid I wurde zum Entfernen von organischem Lösungsmittel 20 min im Exsikkator eingetrocknet. Nach Zugabe der Detergenzlösung wurden die Proben 1 min gevortext, UDP-GlcNAc und MgCl<sub>2</sub> in Tris/HCl-Puffer und zuletzt das MurG-His<sub>6</sub>-Enzym zugegeben. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad für 1 h bei 30°C. Lantibiotika wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1, bezogen auf die Gesamtmenge Lipid I, zusammen mit der Zellwandvorstufe 15 min bei RT inkubiert, bevor die MurG-His<sub>6</sub>-Zugabe erfolgte. Anschließend wurden die Lipide, wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben, extrahiert, die abgenommene lipidhaltige BuOH-Phase mit 100 µl Wasser pH 4,2 gewaschen und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (siehe Kapitel 2.3.7). Die radioaktiven Lipid II-Banden wurden mit einem Phosphor Storage Screen (PSS) und einem Storm 820 Imager (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, GB) visualisiert und die Radioaktivität bestimmt.

### 2.3.10 Hemmung der PBP2-katalysierten *in vitro* Peptidoglykanbiosynthese

Die Peptidoglykanbiosynthese-Experimente wurden durchgeführt, wie von Schneider *et al.* beschrieben [104], jedoch mit geringen Änderungen. Ein PBP2-Reaktionsansatz enthielt insgesamt 9 µg rekombinantes MurG-His<sub>6</sub> aus *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (Expression und Aufreinigung siehe Kapitel 2.4.1), 1 nmol radiomarkiertes Lipid II [0,164 kBq/µl] (Herstellung und Aufreinigung siehe Kapitel 2.3.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> in 0,1 M Mes pH 5,5 und 0,1 % Triton X-100 (v/v) in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Versuchsansätze, in denen der Einfluss von Calcium überprüft werden sollte, enthielten zusätzlich 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>. Radiomarkiertes Lipid II wurde zum Entfernen von organischen Lösungsmittel 20 min im Exsikkator eingetrocknet. Nach Zugabe der Detergenzlösung wurden die Proben 1 min gevortext, MgCl<sub>2</sub> in Mes-Puffer und zuletzt das PBP2-His<sub>6</sub>-Enzym zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 30°C im Wasserbad. Lantibiotika wurden in einem molaren Verhältnis von 2:1, bezogen auf die Gesamtmenge radioaktives Lipid II, zusammen mit der Zellwandvorstufe 15 min bei RT inkubiert, bevor die PBP2-His<sub>6</sub>-Zugabe erfolgte. Anschließend wurden 40 µl der Reaktionsansätze auf eine Kieselgelplatte (60F<sub>254</sub>, Merck, D) aufgetragen und dünnschichtchromatographisch

aufgetrennt. Als Laufmittel diente Solvent B (Butanol, Essigsäure, A. dest., Pyridin (75:60:15:50, v/v/v/v)) [90]. Die radioaktiven Lipid II- und Peptidoglykan-Banden wurden wie in Kapitel 2.3.9 visualisiert und die Radioaktivität bestimmt.

### 2.3.11 Hemmung der FemX-katalysierten *in vitro* Lipid II-Gly-Synthese

Die FemX-Experimente wurden, wie von Schneider *et al.* beschrieben [106], mit einigen Modifikationen durchgeführt. 10 nmol Peptid wurden mit 5 nmol Lipid II für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 100 mM Tris/HCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5, 0,8 % Triton X-100, 2 mM ATP, 50 nmol Glycin (1:50 [U-<sup>14</sup>C]-Glycin [3,7 GBq/mmol]), 25 µg tRNA (Aufreinigung siehe Kapitel 2.3.12), 10 µg rekombinanter Glycyl-tRNA-Synthetase<sup>5</sup> und 2,7 µg FemX<sup>5</sup> in einem Endvolumen von 100 µl vervollständigt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 30°C wurden die Lipide aus dem Reaktionsansatz extrahiert (siehe Kapitel 2.3.6) und durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (siehe Kapitel 2.3.7). Die radioaktiven Lipid II-Gly-Banden wurden mit einem Phosphor Storage Screen (PSS) und einem Storm 820 Imager (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, GB) visualisiert und die Radioaktivität bestimmt.

### 2.3.12 tRNA-Aufreinigung

Die tRNA wurde mit Hilfe des Quiagen DNA/RNA Maxi Kits nach Angaben des Herstellers (Protokoll zur Aufreinigung kleiner RNA-Moleküle) aus grobem Substrat (siehe Kapitel 2.3.3) aufgereinigt. Vor der Aufreinigung wurde die Arbeitsfläche mit 0,5 M NaOH gereinigt und ausschließlich sterile Gefäße verwendet. Die Elution erfolgte in 200-300 µl RNase-freiem Wasser. Alle verwendeten Gefäße wurden mit 0,5 M NaOH gespült und sterilisiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde etwas tRNA in sterilem A. dest. 1:100 (v/v) verdünnt und in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch vermessen (OD<sub>260</sub> = 1 entspricht 40 µg/ml). Die Lagerung erfolgte über Wochen bei -20°C.

### 2.3.13 Carboxyfluorescein-Efflux (CF)-Experimente

#### Präparation von CF-gefüllten, unilamellaren Liposomen

Für die Carboxyfluorescein-Efflux-Experimente wurden durch die Extrusions-Technik [52, 78] große unilamellare Vesikel (LUVs = Large unilamellar Vesicles) hergestellt und

<sup>5</sup>Wurde freundlicherweise von Dr. Tanja Schneider (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie – Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn, 53115 Bonn, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

wie beschrieben behandelt [17].

Lipidvesikel (Liposomen) sind von einer Lipid-Doppelschicht umgebene wassergefüllte Kompartimente. Ionen oder Moleküle können im wässrigen Inneren der Vesikel eingeschlossen werden, wenn man diese in deren Gegenwart herstellt. Das als Marker eingesetzte Carboxyfluorescein ist ein Fluorophor, das elektromagnetische Wellen absorbieren kann und in einen angeregten Zustand übergeht. Beim Übergang in den Grundzustand kommt es zur Abgabe der Energie in Form von Fluoreszenzstrahlung. Die innerhalb der Liposomen eingeschlossenen CF Moleküle senden keine Fluoreszenzstrahlung aus, da durch die enge räumliche Nähe der Moleküle zueinander der Effekt der Fluoreszenzlöschung ("Quenching") eintritt. Das Austreten der CF Moleküle aus den Liposomen durch membranschädigende Peptide kann durch den Anstieg der Fluoreszenzintensität verfolgt werden.

Die Vesikel wurden aus DOPC-Lipiden mit und ohne 0,1 mol% Lipid II (bezogen auf die Gesamtmenge Lipid) hergestellt. Bei der Vesikelpräparation wurden ausschließlich phosphatfreie Gefäße verwendet.

Das entsprechende Volumen der Lipide (2  $\mu\text{mol}$  DOPC/Ansatz und zusätzlich für Lipid II-haltige Liposomen 2 nmol der Zellwandvorstufe/Ansatz) wurde in ein Glasröhrchen pipettiert und im Exsikkator eingetrocknet. Der trockene Lipidfilm wurde in 300  $\mu\text{l}$  CF-Lösung [50 mM CF in Puffer M [50 mM Mes-KOH, pH 6,0, 100 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ]] resuspendiert. Anschließend wurde die Lipidsuspension abwechselnd 8-10-mal unter leichtem Schwenken im Wasserbad auf maximal 30°C erwärmt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Durch diese "freeze-thaw-Methode" entstehen mit CF gefüllte multilamellare Vesikel [78]. Große unilamellare CF-haltige Liposomen wurden durch das wiederholte Pressen (8-10-mal) der multilamellaren Vesikel durch Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 400 nm (Isopore™ 0.4  $\mu\text{m}$  HTP Polycarbonat Membranfilter) in einem Swinnex-Gewinde erreicht. Die CF-haltigen, unilamellaren Vesikel wurden anschließend durch Gelfiltration über eine Sephadex™ G-50 Medium-Säule vom restlichen nicht eingeschlossenen CF abgetrennt. Die Phospholipidkonzentration wurde über den Phosphatgehalt der fertigen Liposomensuspension bestimmt (siehe Kapitel 2.3.8).

*CF-Lösung:* CF wurde zuerst in 1 N NaOH (1/4 des Endvolumens) gelöst und anschließend das Volumen mit Puffer M komplettiert.

### CF-Efflux-Messungen

Die CF-haltigen Vesikel wurden in einer Quarzküvette mit 1,5 ml Puffer M auf eine Endkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  Phospholipid (25 nmol  $\text{P}_i/\text{ml}$ ) verdünnt. Die mit Vesikelsuspension gefüllte Quarzküvette wurde in den Probenhalter eines Spectrofluorophoto-

meter (Shimadzu, Duisburg, D) gestellt und die Peptide wurden unter Rühren zugegeben [0,25  $\mu\text{M}$  Endkonzentration in 1,5 ml]. Die CF-Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 3 min aufgezeichnet und die Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 520 nm (Anregungswellenlänge: 492 nm) bei RT gemessen. Der CF-Efflux wurde relativ zu dem absoluten CF-Efflux nach Lyse der Vesikel durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Detergenzlösung (20 % Triton X-100 (v/v)) angegeben.

Um die Stabilität der Liposomen zu überprüfen, wurde eine drei-minütige Messung ohne Peptidzugabe durchgeführt.

Um den Einfluss von Calcium auf die porenbildende Aktivität von Lacticin 3147 zu untersuchen, wurden die Messungen zusätzlich in mit Calcium angereichertem und in calciumfreiem Puffer M durchgeführt. Dazu wurde der Puffer mit 1,25 mM  $\text{CaCl}_2$ , bzw. mit 10 mM Titriplex VI supplementiert.

### 2.3.14 Tryptophan-Fluoreszenzmessungen

Bei der Aminosäure Tryptophan handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Fluorophor, welches in einer polaren wässrigen Umgebung eine maximale Fluoreszenzemission in einem Wellenlängenbereich von 352-453 nm zeigt. In einer flüssigen Umgebung mit verringerter Polarität verschiebt sich dieses Fluoreszenzmaximum in einen Bereich kürzerer Wellenlängen (Blauverschiebung) mit gesteigerter Fluoreszenzintensität [34]. Diese Veränderung im Fluoreszenzemissionsspektrum tritt auch ein, wenn Tryptophanreste mit Lipidvesikeln interagieren [110]. Eine Interaktion zwischen tryptophanhaltigen Peptiden und Vesikelmembranen hat dementsprechend eine Veränderung des Tryptophan-Fluoreszenzemissionsspektrums zur Folge, wenn die Peptide an die Lipiddoppelschicht binden oder in diese eintauchen und die Tryptophanreste in eine hydrophobere Umgebung gelangen. Da Mersacidin keinen Tryptophanrest enthält, wurde dieses Experiment mit Plantaricin C, Lacticin 481 und Lacticin 3147 durchgeführt.

Die Tryptophan-Fluoreszenzmessungen erfolgten in Quarzküvetten in einem Volumen von 1,5 ml Puffer M bei RT. Puffer M-haltige DOPC-Liposomen mit und ohne 0,1 mol% Lipid II (Herstellung siehe Kapitel 2.3.13) wurden in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Lipid-Phosphat eingesetzt und die Peptide in verschiedenen Konzentrationen (0,25-1  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. Die Fluoreszenzanregung erfolgte im Spectrofluorophotometer (Shimadzu, Duisburg, D) bei 280 nm. Die Tryptophan-Fluoreszenzemissionsspektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 300-400 nm aufgenommen.

Ein Einfluss von Calciumionen auf die spezifische Interaktion zwischen Lantibiotika und DOPC-Vesikeln  $\pm$  Lipid II wurde untersucht, indem die Messungen zusätzlich in mit 1,25 mM  $\text{CaCl}_2$  angereichertem Puffer M durchgeführt wurden.

### 2.3.15 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Proteinbestimmung [15] ist eine photometrische Methode, um die Proteinkonzentration in einer Lösung zu ermitteln. Proteine werden durch Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt, indem der Farbstoff mit den kationischen und den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine unter sauren Bedingungen Komplexe bildet. Dabei verschiebt sich das Absorptionmaximum des Farbstoffes von 465 nm (ungebundene, protonierte, braunrote, kationische Form) zu 595 nm (gebundene, deprotonierte, blaue, anionische Sulfonatform).

In dieser Arbeit wurde der Bradford Protein-Assay der Firma Bio-Rad verwendet. Zur Quantifizierung wurden 5-15  $\mu$ l einer Proteinlösung mit A. dest. auf 100  $\mu$ l aufgefüllt, nach Angaben des Herstellers mit 5 ml Farbmix versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen gleich behandelten Probenpuffer gemessen und die Proteinmenge anhand einer Eichreihe von 0-60  $\mu$ g BSA bestimmt.

### 2.3.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-PAGE [67] wurde zur Auftrennung von Proteingemischen und der Bestimmung der relativen Molekülmassen eingesetzt. Bei dieser Methode kommt es zu einer Maskierung der Proteineigenladung durch das anionische Detergenz SDS, so dass Protein-SDS-Komplexe mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Diese Proteine-SDS-Komplexe wandern von der Proteineigenladung unabhängig durch ein Polyacrylamidgel (Trägermaterial) in Richtung Anode. Das Polyacrylamidgel bildet sich durch Co-Polymerisation aus Acrylamid und Bisacrylamid. Dabei handelt es sich um eine Radikalkettenreaktion, die durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (Radikalstarter) und TEMED (Radikalkettenträger) gestartet wird und unter Luftabschluss bei Raumtemperatur abläuft. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird die Gelmatrix in ein weitporiges Sammelgel und ein engporiges Trenngel unterteilt und mit zwei Puffersystemen, Tris-Glycin und Tris-Chlorid, kombiniert. Zu Beginn der elektrophoretischen Auftrennung wandern Chlorid-Ionen (Leit-Ionen) schnell in Richtung der Anode, während Glycin-Ionen sich aufgrund des im Sammelgel herrschenden pH-Werts ( $\sim 6,8$ ) nahe am isoelektrischen Punkt befinden und dadurch eine geringe Mobilität zeigen. Der hierdurch erzeugte Feldstärkegradient führt zu einer Stapelbildung der Protein-Ionen ("stacking"-Effekt) nach ihrer Mobilität. Das Erreichen der Phasengrenze zwischen Sammel- und Trenngel führt zur Stauung des Proteinstapels und zur Auflösung des Gradienten. Im Trenngel werden die Proteine in einem homogenen Puffer nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zur Analyse des His<sub>6</sub>-PBP2-Fusionsproteins wurde ein 12 %iges Trenn- und ein 5 %iges Sammelgel verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.7; Zusammensetzung der verwendeten Lösungen siehe Tabelle 2.8).

**Tabelle 2.7:** Zusammensetzung von SDS-PAGE-Trenn- und Sammelgel

Lösungen	12 %iges Trenngel	5 %iges Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid	2,25 ml	0,238 ml
Lösung A	1,25 ml	—
Lösung D	—	0,3 ml
Aqua dest.	2,7 ml	1,03 ml
SDS	50 µl	—
TEMED	5 µl	5 µl
APS	1 ml	0,8 ml

**Tabelle 2.8:** Für SDS-PAGE-Proteingele verwendete Lösungen

verwendete Lösungen	Zusammensetzung
Acrylamid	40 %-iges Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
Lösung A	3 M Tris/HCl
Lösung D	0,96 M Tris, 0,8 % SDS (w/v), pH 8,5
Ammoniumpersulfat	0,21 % (w/v)
SDS	20 % (w/v)
1-fach SDS-Probenpuffer	45 mM Tris/HCl, pH 6,8 , 1 % SDS (w/v), 10 % Glycerol, 0,01 % Bromphenolblau, 50 mM DTT
Elektrodenpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1 % SDS (w/v)
Färbelösung	2,5 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 450 ml Methanol
Entfärbelösung	50 ml Methanol, 75 ml Eisessig, ad 1 l mit A. dest.

Alle Proben wurden vor dem Auftragen mit SDS-Probenpuffer (1/4 des Probenvolumens) versetzt und für 10 min gekocht, um Tertiär- und Sekundärstrukturen sowie Disulfidbrücken aufzulösen. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein gefärbter Prote-

inmarker verwendet (New England Biolabs, Molekulargewichte (in kDa): 175, 83, 62, 48, 25, 17, 7). Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 90 V im Sammelgel und 120-160 V im Trenngel durchgeführt. Die fertigen Gele wurden für ca. 30 min bei 60°C in Comassie-Färbelösung geschüttelt und bis zur gewünschten Farbtintensität entfärbt.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem PBP2-His<sub>6</sub> aus *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Rekombinantes PBP2 von *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 wurde als C-terminales Hexahistidin-tag in *Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimiert. Plasmid-DNA des rekombinanten Plasmids pCK-PBP2 wurde mittels Elektroporation in den Expressionstamm transformiert. Das His<sub>6</sub>-Fusionsprotein ließ sich anschließend mittels einer Metall-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen aufreinigen. Eine Analyse des His<sub>6</sub>-PBP2-Fusionsproteins erfolgte mittels einer diskontinuierlichen SDS-PAGE und für eine abschließende Konzentrationsbestimmung wurde eine Bradford-Proteinbestimmung durchgeführt.

#### Charakterisierung von pCK-PBP2

Bei pCK-PBP2, das im Rahmen einer Diplomarbeit hergestellt worden ist [65], handelt es sich um ein Konstrukt, bestehend aus dem pET-21b(+)-Plasmid der Firma Novagen, in das verdaute und aufgereinigte PBP2-DNA von *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 ligiert wurde.

Das pET-21b(+)-Plasmid ist ein 5,4 kb großer *E. coli*T7 Expressionsvektor, der ursprünglich von Studier *et al.* [109] entworfen und von der Firma Novagen weiterentwickelt worden ist. Der Vektor besitzt einen aus dem Bakterienphagen T7 stammenden T7-Promotor, welcher unter der Kontrolle des lac-Operators steht. Die Zugabe von IPTG führt zur Expression des Gens für die T7-RNA-Polymerase, welches chromosomal im Expressionsstamm *E. coli* BL21 bzw. *E. coli* C43 vorliegt. Die Bindung der T7-RNA-Polymerase an ihren Promotor führt zur Expression des stromabwärts gelegenen klonierten Gens. Zusätzlich enthält der Vektor die Sequenz für sechs Histidine (His-tag), welche stromabwärts der MCS liegen. Sie ermöglichen die Expression von Fusionsproteinen mit einem C-terminalen His-Tag. Des Weiteren besitzt der Vektor als Selektionsmarker ein Ampicillinresistenzgen.

### Transformation von *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Unter Transformation versteht man die Aufnahme freier DNA durch Bakterienzellen. Die Fähigkeit zur Aufnahme ist unter natürlichen Bedingungen allerdings gering. Durch chemische und physikalische Behandlung der Zellen ist es jedoch möglich, die DNA-Aufnahmefähigkeit von Bakterienzellen zu erhöhen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transformation von elektrokompentenen Zellen durch Elektroporation (Gene Pulser® II) durchgeführt. Bei der Elektroporation werden suspendierte Bakterienzellen kurzen elektrischen Impulsen hoher Feldstärke ausgesetzt. Dies führt zu einer kurzzeitigen Permeabilität der Plasmamembran und dadurch zur Fähigkeit der Zellen, freie DNA aufzunehmen [25, 126].

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt und die verwendete Reaktionsküvetten bei -20 vorgekühlt. 50 µl elektrokompentener *Escherichia coli* BL21 (DE3)-Zellen<sup>6</sup> wurden mit 2-5 µl salzfreier pCK-PBP2-Plasmid-DNA gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz luftblasenfrei in die vorgekühlte Reaktionsküvette pipettiert und ohne Verzögerung bei 200 Ω, 25 µF und 2,1 kV elektroporiert. Die Zellsuspension wurde anschließend sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h im Rotationsinkubator bei 37° inkubiert.

### Präparation von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen aus *Escherichia coli*

His<sub>6</sub>-Fusionsproteine lassen sich sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen durch Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose aufreinigen. Dabei handelt es sich um eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie, bei der eine metallchelatierende Gruppe am Säulenmaterial gebunden ist. An diese Gruppe können multivalente Übergangsmetallionen (Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, etc.) binden. Dadurch entstehen freie Koordinationsbindungsstellen, die für die Bindung von basischen Gruppen von Proteinen genutzt werden. Vor allem Histidinreste an der Oberfläche von Proteinen binden so spezifisch an die Säule. Bei der nativen Aufreinigung erfolgt die Elution mit Imidazol, welches den Imidazolring eines Histidin-Restes darstellt und durch einen kompetitiven Mechanismus die komplexierten Histidinreste des Fusionsproteins verdrängt. Im Gegensatz hierzu erfolgt die Elution unter denaturierenden Bedingungen durch Absenkung des pH-Wertes [1]. Um den Funktions- bzw. Aktivitätsverlust von PBP2 zu minimieren, wurden diese unter nativen Bedingungen aufgereinigt.

---

<sup>6</sup>Wurden freundlicherweise von Kathrin Gries (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie – Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn, 53115 Bonn, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

**Expression und Aufreinigung von PBP2-His<sub>6</sub> aus *Escherichia coli* BL21 (DE3)**

2 l LB-Bouillon (50 µg/ml Ampicillin) wurden mit 20 ml einer ÜN-Vk (LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin) *E. coli* BL21 pCK-PBP2 inokuliert und bei 37°C im Schüttelinkubator (120 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,75 angezogen. Nach Erreichen der OD<sub>600</sub> wurde die Proteinexpression mit IPTG induziert (Endkonzentration 1 mM). Die Kulturen wurden weitere 4,5 h inkubiert und anschließend durch Zentrifugation geerntet (Beckman Model J2-21 Centrifuge, 7.000 × g, 10 min, 4°C).

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 20 ml Lysispuffer [50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1 % Triton X-100 (v/v), 10 mM Imidazol] resuspendiert und 400 µl Lysozym [100 mg/ml], 300 µl RNase (5 mg/ml), 300 µl DNase (10 mg/ml) sowie 333 µl N-Laurylsarkosin [300 mg/ml] hinzugefügt. Zum Zellaufschluss wurden die Zellen mit einem Ultraschallgerät (10 × 15 s, mit je 1 min Kühlpause; 50 W/30 kHz) sonifiziert. Zelltrümmer und andere unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (Beckman Model J2-21 Centrifuge, 13.000 × g, 10 min, 4°C) von den löslichen Proteinen getrennt. Der proteinhaltige Überstand wurde mit 1,5 ml Ni-NTA-Agarose gemischt und für 2 h rührend bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension möglichst luftblasenfrei in 1 ml-Polypropylen-Cartridges (Qiagen GmbH, Hilden, D) überführt. Nach Absetzen der Ni-NTA-Agarose in der Säule wurde diese zur Entfernung von nicht bzw. nur schwach unspezifischen gebundenen Proteinen zunächst mit 10 ml Lysispuffer gespült und mit 5 ml Waschpuffer [50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1 % Triton X-100 (v/v), 20 mM Imidazol] gewaschen. Die Elution der His<sub>6</sub>-tag-Fusionsproteine erfolgte mit insgesamt 3 ml Elutionspuffer [50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1 % Triton X-100 (v/v), 200 mM Imidazol] in 0,5 ml-Schritten. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.3.16) auf ihren PBP2-Gehalt analysiert und die hochkonzentrierten PBP2-haltigen Fraktionen vereint.

Um die Proteinlösung von Imidazol zu befreien, wurden die Fraktionen anschließend dialysiert. Bei der Dialyse kommt es zu einem Austausch niedermolekularer Substanzen über eine Membran entlang eines Konzentrationsgefälles. Dabei werden Moleküle mit einem Molekulargewicht größer als die Ausschlussgröße der Membran zurückgehalten. In dieser Arbeit wurden Slide-A-Lyzer<sup>®</sup>-Dialysekassetten (Pierce, Rockford, USA) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Die Äquilibrierungszeit betrug 2 × 12 h bei 4°C in jeweils 800 ml Dialyse-Puffer [50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1 % Triton X-100 (v/v)]. Das Dialysat (PBP2-Lösung) wurde anschließend zum Gefrierschutz 1:1 mit sterilem Glycerol versetzt, bei -20°C gelagert und abschließend die Proteinkonzentration durch eine Bradford-Proteinbestimmung (siehe Kapitel 2.3.15) ermittelt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Peptidextraktion und -aufreinigung

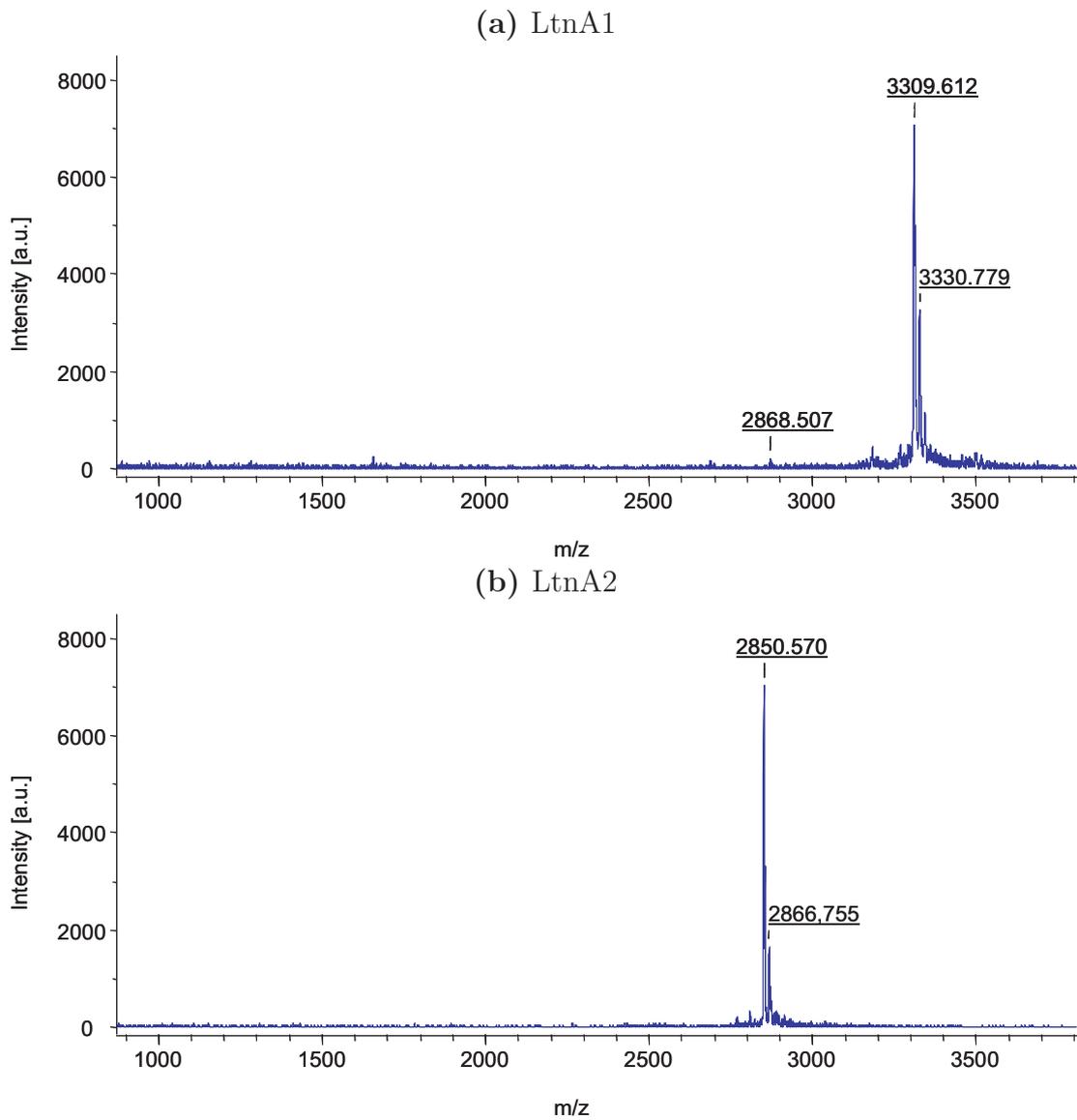
Lacticin 3147 wurde, wie von Martin *et al.* [70] beschrieben, mit einigen Modifikationen aus dem Überstand einer 4 l *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 pMRC01 pOM02-Kultur aufgereinigt. Das Lantibiotikum wurde mit Isopropanol von den Bakterienzellen abgelöst und die einzelnen Peptide durch eine präparative Reversed Phase-HPLC isoliert.

Die korrekten Massen und die Reinheit der isolierten Peptide wurde mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen verifiziert (Abb. 3.1). Insgesamt konnten 1,5 mg A1-Peptid und 0,84 mg A2-Peptid aus einem Liter Kultur gewonnen werden (Tab. 3.1).

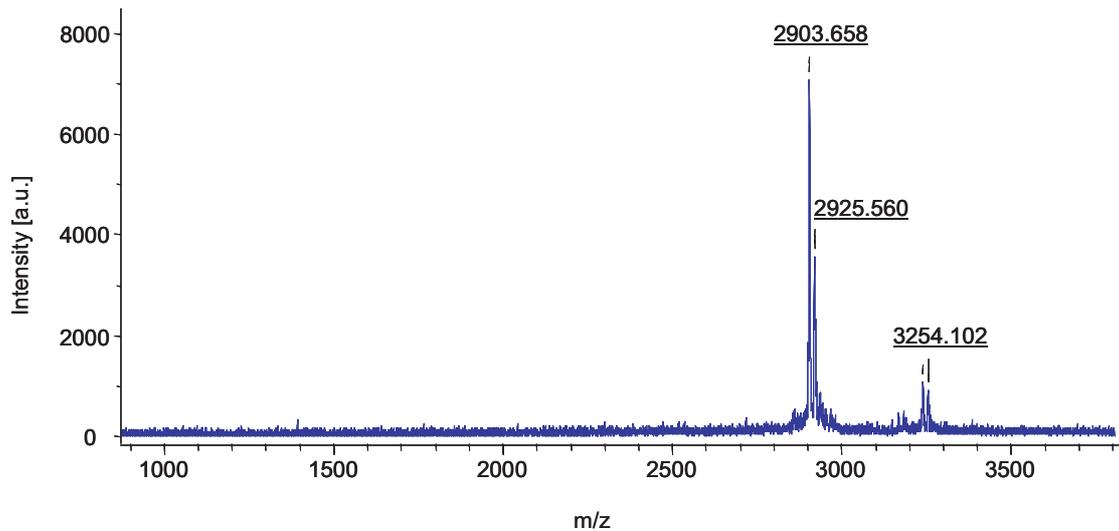
Lacticin 481 wurde aus dem Überstand einer 2 l *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C270-Kultur aufgereinigt. Die Anzucht des Produzentenstammes in Nisin-Produktionsmedium [66] bei konstant gehaltenem pH 6 ergab in Vorversuchen die höchste Bakteriozinproduktion im Vergleich zu anderen getesteten Medien (GM17 und Lacticin 3147-Produktionsmedium). Die anschließende Extraktion und Aufreinigung des Peptids erfolgte nach einer Methode von Burianek und Yousef [24], modifiziert durch Bonelli *et al.* [9]. Bei der sogenannten Chloroformextraktion präzipitieren amphiphile Peptide an der Grenze zwi-

**Tabelle 3.1:** Elutionscharakteristika, Molekulargewicht und Ausbeute der in dieser Arbeit aufgereinigten Lantibiotika

Peptid	Elution bei x % Puffer B	theoretisches MW [Da]	gemessenes MW [Da]	Peptidaus- beute [mg/l Kultur]
Lacticin 481	40,4	2901	2904	0,664
Lacticin 3147:				
LtnA1	37	3307	3310	1,5
LtnA2	46	2847	2851	0,84



**Abbildung 3.1:** MALDI-TOF-Massenspektren der einzelnen aufgereinigten Peptide LtnA1 ( $MW_{\text{theoretisch}} = 3307$  Da) und LtnA2 ( $MW_{\text{theoretisch}} = 2847$  Da) des Zwei-Komponenten Lantibiotikums Lacticin 3147. LtnA1 lag zusätzlich als Natrium-Addukt (+23) und LtnA2 einfach oxidiert (+16) vor.



**Abbildung 3.2:** MALDI-TOF-Massenspektrum des aufgereinigten Lacticin 481 ( $MW_{\text{theoretisch}} = 2901$  Da). Die Masse von 2925,60 Da entspricht einem Natrium-Addukt von Lacticin 481 (+23).

schen Chloroform und wässrigem Medium. Die Aufreinigung dieses Präzipitats erfolgt anschließend durch eine präparative Reversed Phase-HPLC.

Die massenspektrometrische Untersuchung des aufgereinigten Lacticin 481 bestätigte die korrekte Masse und Reinheit der Probe (Abb. 3.2). Es wurden insgesamt 0.664 mg Peptid aus 1 l Kultur aufgereinigt (Tab. 3.1).

### 3.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die antimikrobielle Aktivität der aufgereinigten Lantibiotika Lacticin 481 und Lacticin 3147 sowie von Mersacidin und Plantaricin C wurden gegen die Indikatorstämme *Micrococcus luteus* DSM 1790 und *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP ermittelt (Tab. 3.2). *Micrococcus luteus* DSM 1790 ist ein Indikatorstamm für die Lantibiotika Mersacidin und Nisin [19], während *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP äußerst sensitiv gegen Lacticin 3147 ist [79].

**Tabelle 3.2:** Minimale Hemmkonzentrationen der verwendeten Lantibiotika gegen die Indikatorstämme *Micrococcus luteus* DSM 1790 und *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP

Lantibiotikum	MW [Da]	MHK			
		<i>Micrococcus luteus</i> DSM 1790		<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> HP	
		$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$
Mersacidin	1824	1,25	0,69	2,5	1,37
Plantaricin C	2880	2,5	0,87	2,5	0,87
Lacticin 481	2901	1,25	0,43	0,31	0,11
Lacticin 3147 <sup>a</sup>		1,25	0,38	< 0,005	< 0,002
LtnA1	3307	> 10	> 3,02	2,5	0,76
LtnA2	2847	> 10	> 3,51	5	1,76
Nisin	3330	0,02	0,006	0.08	0.02

<sup>a</sup>LtnA1 und LtnA2 wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt; Berechnung der MHK anhand des MW von LtnA1.

### 3.3 Untersuchungen zum Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Aktivität von Lantibiotika, die über ein Mersacidin-Lipid II-Bindemotiv verfügen

#### 3.3.1 Die antimikrobielle Aktivität von Lantibiotika in der Gegenwart von 1,25 mM $\text{CaCl}_2$

Mersacidin besitzt in  $\text{CaCl}_2$  angereicherter Mueller-Hinton Bouillon [50 mg/l] eine durchschnittlich doppelt so hohe antimikrobielle Aktivität wie in nicht ergänzter Bouillon [5]. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um einen Mersacidin-spezifischen Effekt handelt oder ob auch andere Mersacidin-ähnliche Lantibiotika (Lantibiotika, die über das in Mersacidin identifizierte Lipid II-Bindemotiv verfügen) von der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen profitieren, wurden die MHKs der Lantibiotika gegen *Micrococcus luteus* DSM 1790 in Medium mit 1,25 mM  $\text{CaCl}_2$  bestimmt (Tab. 3.3).

Mersacidin, Plantaricin C und Lacticin 3147 besaßen in Gegenwart von 1,25 mM  $\text{CaCl}_2$  eine gesteigerte antimikrobielle Aktivität, während die MHK von Lacticin 481 unverändert blieb. Die antibakterielle Aktivität von Mersacidin steigerte sich um das Vierfache und die von Plantaricin C und Lacticin 3147 verdoppelte sich. Die individuellen Lacticin 3147-Peptide LtnA1 und LtnA2 zeigten in den eingesetzten Konzentrationen auch in

**Tabelle 3.3:** Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die antimikrobielle Aktivität von Mersacidin, Plantaricin C, Lacticin 481, Lacticin 3147 und dessen individuelle Peptide LtnA1 und LtnA2. MHK-Werte gegen *Micrococcus luteus* DSM 1790 wurden nach 24 h in 1/2 Mueller-Hinton Bouillon in Abwesenheit und Gegenwart von 1,25 mM  $\text{CaCl}_2$  bestimmt.

Lantibiotikum	MHK [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	
	1/2 MH	1/2 MH + 1,25 mM $\text{CaCl}_2$
Mersacidin	1,25	0,31
Plantaricin C	2,5	1,25
Lacticin 481	1,25	1,25
Lacticin 3147 <sup>a</sup>	1,25	0,63
LtnA1	> 10	> 10
LtnA2	> 10	> 10

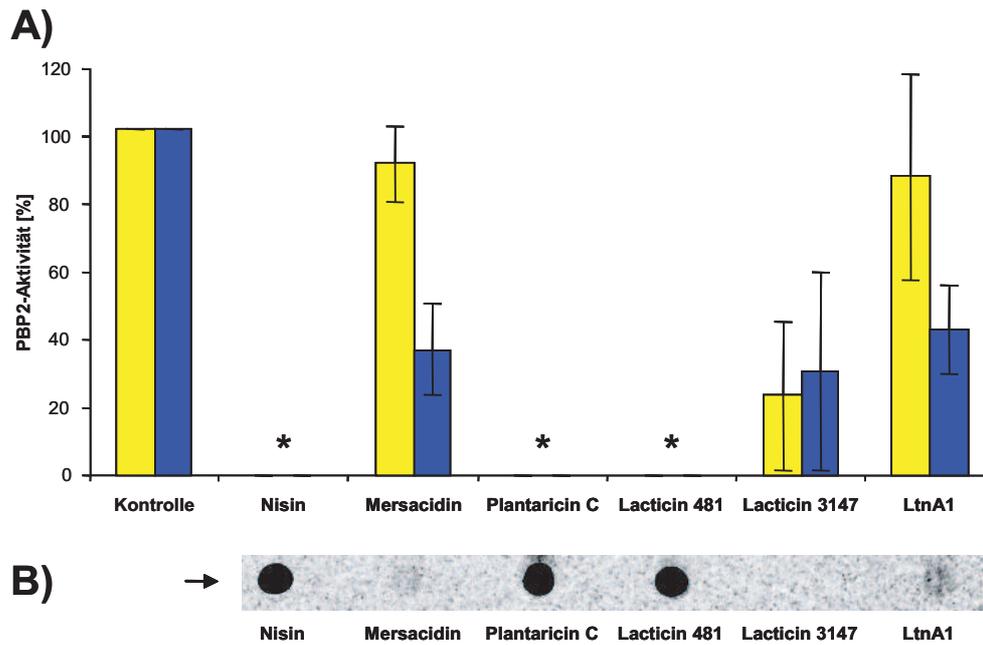
<sup>a</sup>LtnA1 und LtnA2 wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt; Berechnung der MHK anhand des MW von LtnA1.

der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen keine antimikrobielle Aktivität gegen den verwendeten Indikatorstamm.

### 3.3.2 Hemmung der *in vitro* Peptidoglykansynthese in Abhängigkeit von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

In diesem Experiment wurden *in vitro* Peptidoglykansynthese-Ansätze mit radiomarkiertem Lipid II durchgeführt, um den Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Interaktion von Mersacidin und Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika mit Lipid II zu untersuchen. Das bifunktionale HMW PBP2 von *Staphylococcus aureus* ATCT 8325 katalysiert die Transpeptidierungs- und Transglykosylierungsreaktion der Peptidoglykanbiosynthese und verwendet dazu die Zellwandvorstufe Lipid II als Substrat (Abb. 1.7) [103]. Eine Peptid-Lipid II-Komplexbildung hat eine Inhibierung der PBP2-Reaktion zur Folge. Die *in vitro* Reaktionsprodukte wurden anschließend dünn-schichtchromatographisch analysiert und die Radioaktivität bestimmt (Abb. 3.3).

Nisin, Plantaricin C und Lacticin 481 waren wirksame Inhibitoren der PBP2-Reaktion und blockierten die PBP2-Aktivität vollständig (Abb. 3.3A). Diese Peptide bildeten mit dem Substrat Lipid II (radiomarkiert) unter den eingesetzten Versuchsbedingungen Komplexe, die während der Dünnschichtchromatographie nicht dissoziierten und am Auftragspunkt liegen blieben (Abb. 3.3B). Im Gegensatz dazu hemmten Mersacidin und



**Abbildung 3.3:** **A)** Hemmung der *in vitro* Peptidoglykansynthese durch Lantibiotika in der Abwesenheit und Gegenwart von Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Die Reaktionsansätze enthielten radiomarkiertes Lipid II und PBP2 in Abwesenheit (gelb) und Gegenwart (blau) von 1,25 mM CaCl<sub>2</sub> und die Peptide wurden in einem 2:1 molaren Verhältnis (Peptid:Lipid II) zugegeben. Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. \* Komplett Inhibierung der PBP2-Reaktion. Alles Lipid II war am Auftragungspunkt sichtbar.

**B)** Komplex-Bildung von Lantibiotika mit radioaktiv markiertem Lipid II. Die Reaktionsansätze (siehe A) wurden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis ist dargestellt, da die Komplexbildung Ca<sup>2+</sup>-unabhängig war. Pfeil: Höhe des Auftragungspunktes

das LtnA1-Peptid von Lacticin 3147 die PBP2-Reaktion nur marginal und bildeten mit der radiomarkierten Zellwandvorstufe keine DC-stabilen Komplexe.

Enthielten die Reaktionsansätze zusätzlich 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>, konnte ein deutlicher Einfluss im Fall von Mersacidin und LtnA1 beobachtet werden. Beide Peptide reduzierten die PBP2-Aktivität auf 36 bzw. 42 %, was auf eine wichtige Rolle der Ca<sup>2+</sup>-Ionen bei der Peptid-Lipid II-Interaktion schließen lässt.

Die gleichzeitige Zugabe beider Lacticin 3147-Peptide, d.h. LtnA1 und LtnA2, resultierte in einer Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen deutlichen Hemmung der PBP2-Reaktion. Dies lässt den Schluss zu, dass LtnA2 offensichtlich den gleichen Einfluss wie Ca<sup>2+</sup>-Ionen auf die Lipid II-Bindungskapazität hat und diese steigert.

### 3.3.3 Tryptophan-Fluoreszenzspektroskopie

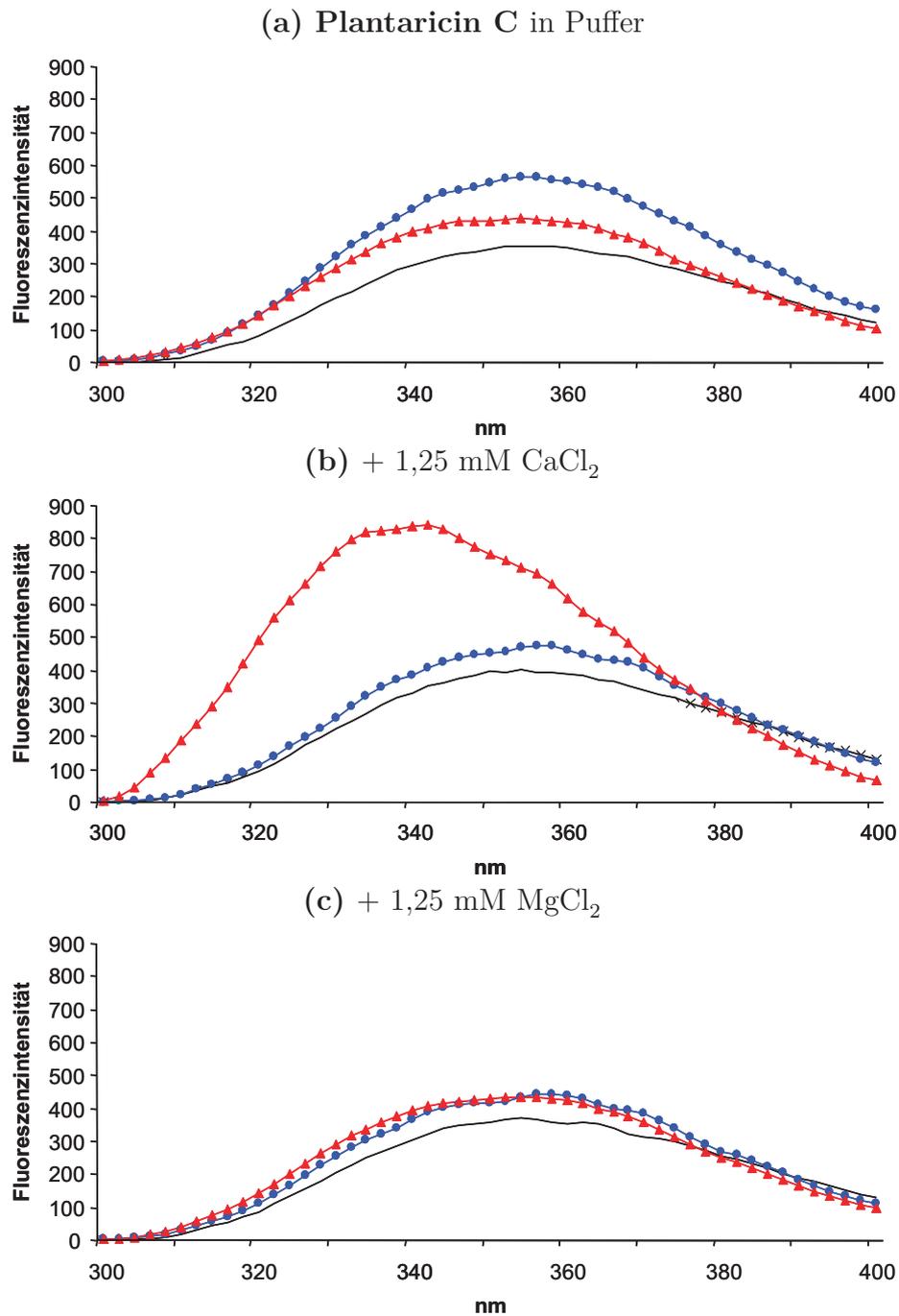
Die Primärstrukturen der in dieser Arbeit verwendeten Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika enthalten alle bis auf Mersacidin mindestens einen Tryptophanrest, der die Anwendung von Tryptophan-Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht, um die Interaktion der Peptide mit verschiedenen Typen von Liposomen in der Abwesenheit und Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu untersuchen.

Plantaricin C enthält einen Tryptophanrest im kompakten, globulären Teil des Peptids an Position 19 (Abb. 1.9). Das Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Plantaricin C in Puffer zeigte eine typische maximale Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 354 nm [110] (Abb. 3.4a), die in der Gegenwart von reinen DOPC-Vesikeln oder DOPC-Vesikeln mit 1 mol% Lipid II wesentlich unverändert blieb. Enthielt der Puffer 1.25 mM  $\text{CaCl}_2$ , veränderte sich das Emissionsspektrum von Plantaricin C in der Gegenwart von Lipid II-haltigen DOPC-Liposomen. Es konnte eine signifikante Blauverschiebung von 354 nm auf 342 nm und ein starker Anstieg der Tryptophanfluoreszenzintensität beobachtet werden (Abb. 3.4b). Dies deutet eine Änderung der Umgebung des Tryptophanrestes zu einer Umgebung geringerer Polarität [34] an, z.B. durch Interaktion mit Lipidvesikeln [110]. Die Interaktion von Plantaricin C mit Lipid II-supplementierten DOPC-Vesikeln hängt spezifisch von der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ab, da  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen das Emissionsspektrum nicht veränderten.

Der in Lacticin 481 an Position 24 im C-terminalen Teil des Peptids lokalisierte Tryptophanrest (Abb. 1.10) ist offensichtlich nicht an der Interaktion mit der Zellwandvorstufe bzw. den Vesikelmembranen beteiligt, da keine Veränderung im Fluoreszenzspektrum beobachtet werden konnte (Abb. 3.5a-c).

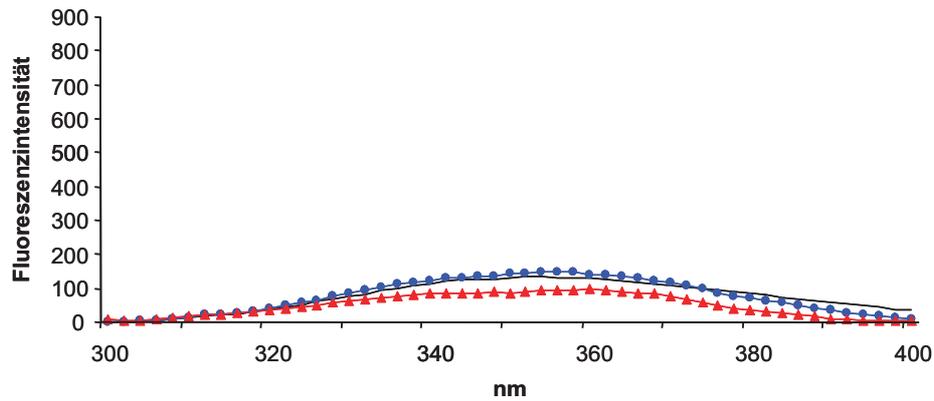
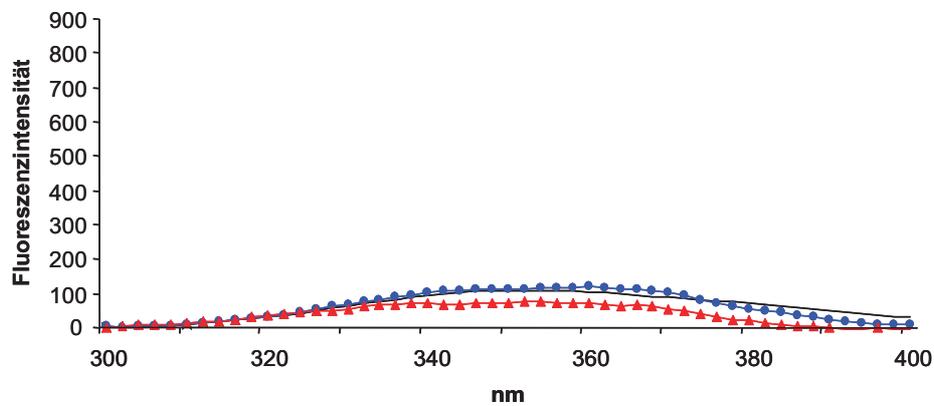
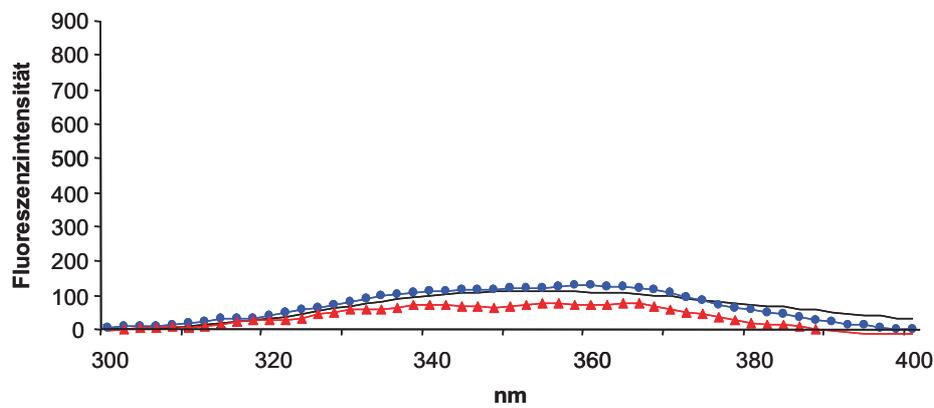
Die im Vergleich zu Plantaricin C geringe Tryptophan-Fluoreszenzintensität ist darauf zurückzuführen, dass sich der Tryptophanrest von Lacticin 481 höchstwahrscheinlich vollständig in einer polaren Umgebung, d.h. im Puffer, befindet. Möglicherweise wird dies auch durch einen quencheden Einfluss der den Tryptophanrest umgebenden Aminosäuren, wie es für Tryptophanmutanten des Lantibiotikums Nisin beschrieben wurde [18] verursacht.

Das A1-Peptid des Zwei-Komponenten-Lantibiotikums Lacticin 3147 besitzt insgesamt drei Tryptophanreste, die alle Teil des kompakten C-Terminus sind (Positionen 12, 18 und 29), während LtnA2 über keine Tryptophanreste verfügt (Abb. 1.11). Die Tryptophan-Fluoreszenzemissionsspektren von LtnA1 in Puffer hatten einen ähnlichen



**Abbildung 3.4:** Tryptophan-Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Plantaricin C [0,5  $\mu\text{M}$ ] (schwarz) in der Gegenwart von Vesikeln [100  $\mu\text{M}$  Lipid P<sub>i</sub>], bestehend aus DOPC (blau) und aus DOPC mit 1 mol% Lipid II (rot) in Puffer (a), der zusätzlich 1,25 mM CaCl<sub>2</sub> (b) bzw. 1,25 mM MgCl<sub>2</sub> (c) enthält. Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment sind dargestellt.

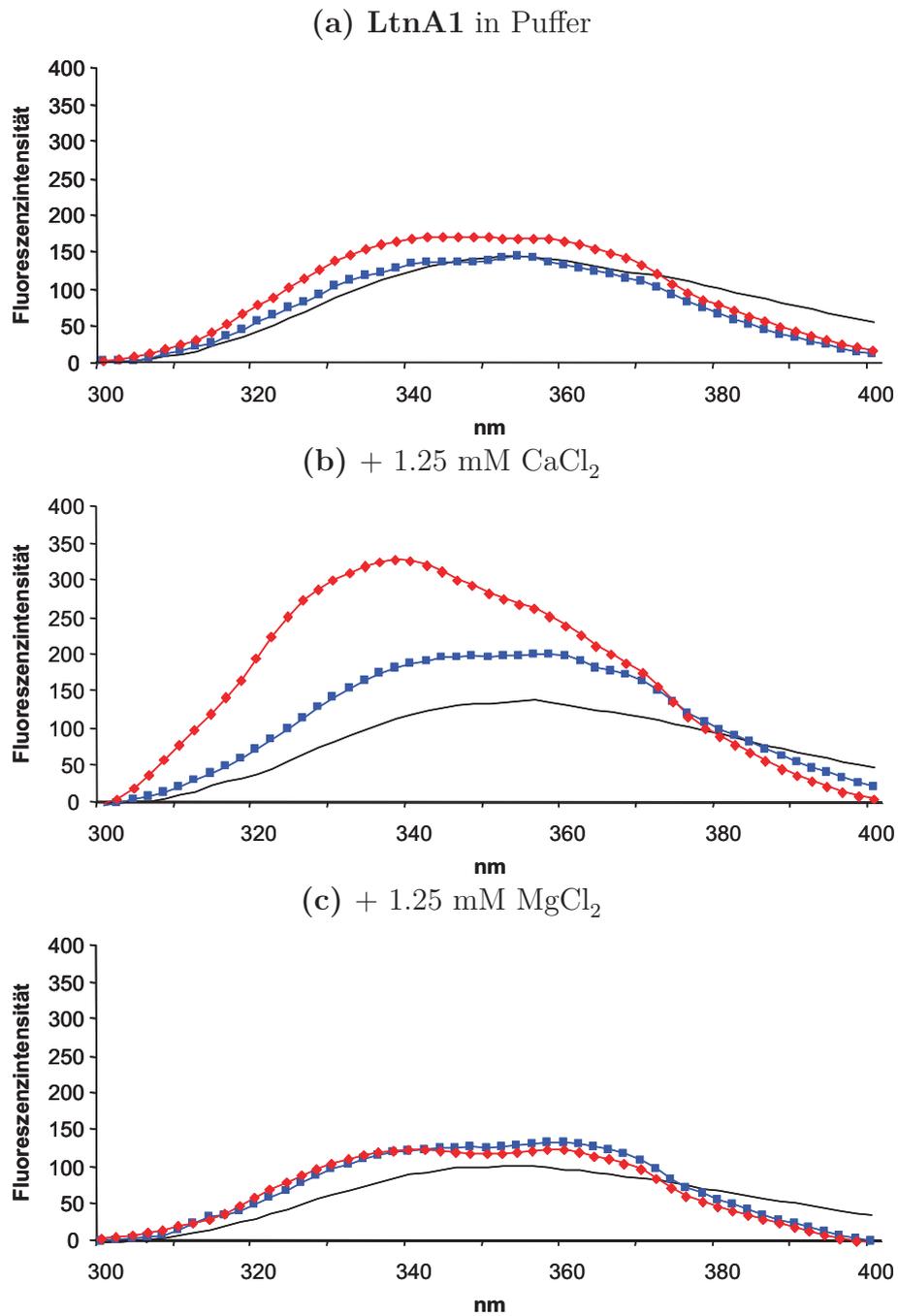
(a) Lacticin 481 in Puffer

(b) + 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>(c) + 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>

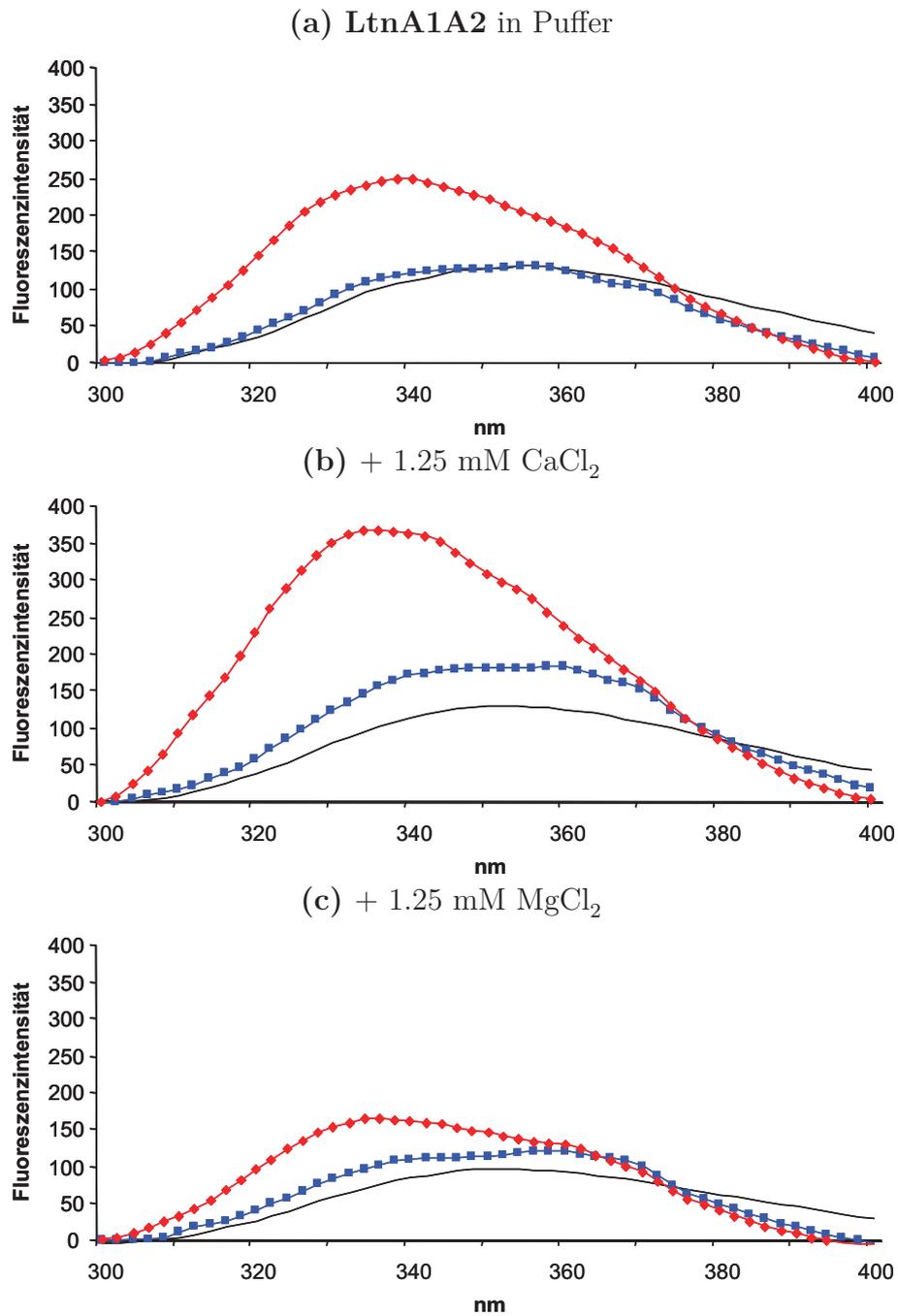
**Abbildung 3.5:** Tryptophan-Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Lacticin 481 [1  $\mu$ M] (schwarz) in der Gegenwart von Vesikeln [100  $\mu$ M Lipid P<sub>i</sub>], bestehend aus DOPC (blau) und aus DOPC mit 1 mol% Lipid II (rot) in Puffer (a), der zusätzlich 1,25 mM CaCl<sub>2</sub> (b) bzw. 1,25 mM MgCl<sub>2</sub> (c) enthält. Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment sind dargestellt.

Verlauf wie Plantaricin C (Abb. 3.6a). Die Gegenwart von 1,25 mM  $\text{CaCl}_2$  und Lipid II-haltigen DOPC-Liposomen resultierte in einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität und einer Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums auf 341 nm (Abb. 3.6b), die nicht durch die Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen induziert wurden (Abb. 3.6c). Diese signifikanten Änderungen des Tryptophan-Fluoreszenzspektrums deuten auf eine Interaktion des A1-Peptids mit der Vesikelmembran und Lipid II hin, bei der mindestens einer der drei Tryptophanreste des Peptids in die Lipidmembran eintaucht.

Wurden LtnA1 und das Partnerpeptid LtnA2 simultan eingesetzt (Abb. 3.7), konnte eine Blauverschiebung und eine Zunahme der Fluoreszenzintensität des Emissionsspektrums in der Gegenwart von Lipid II-haltigen DOPC-Vesikeln bereits in Puffer beobachtet werden (Abb. 3.7a). Die Zugabe von 1,25 mM  $\text{CaCl}_2$  verstärkte diesen Effekt deutlich (Abb. 3.7b), während  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen eher einen inhibierenden Einfluss ausübten (Abb. 3.7c).



**Abbildung 3.6:** Tryptophan-Fluoreszenz-Emissionsspektrum von LtnA1 [0,25  $\mu\text{M}$ ] (schwarz) in der Gegenwart von Vesikeln [100  $\mu\text{M}$  Lipid  $\text{P}_i$ ], bestehend aus DOPC (blau) und aus DOPC mit 1 mol% Lipid II (rot) in Puffer (a), der zusätzlich 1,25 mM CaCl<sub>2</sub> (b) bzw. 1,25 mM MgCl<sub>2</sub> (c) enthält. Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment sind dargestellt.

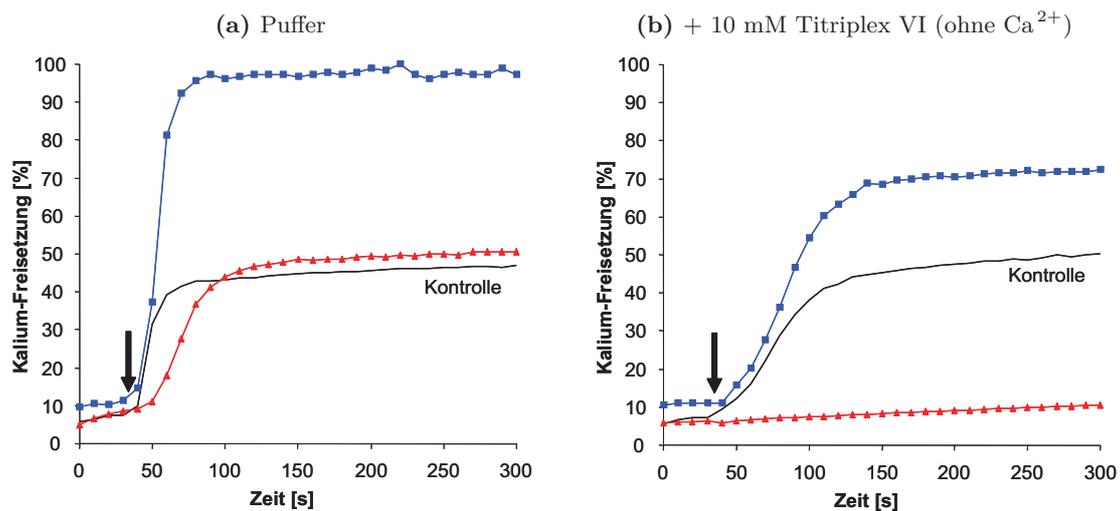


**Abbildung 3.7:** Tryptophan-Fluoreszenz-Emissionsspektrum von LtnA1A2 [jeweils 0,25  $\mu\text{M}$ ] (schwarz) in der Gegenwart von Vesikeln [100  $\mu\text{M}$  Lipid  $\text{P}_i$ ], bestehend aus DOPC (blau) und aus DOPC mit 1 mol% Lipid II (rot) in Puffer (a), der zusätzlich 1,25 mM CaCl<sub>2</sub> (b) bzw. 1,25 mM MgCl<sub>2</sub> (c) enthält. Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment sind dargestellt.

### 3.3.4 Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Bindung von LtnA1 an ganze Zellen

Das Zwei-Komponenten-Lantibiotikum Lacticin 3147 verfügt über einen speziellen Wirkmechanismus, bei dem die Bindung an die Zellwandvorstufe Lipid II und die Porenbildung auf zwei verschiedene Peptide, LtnA1 bzw. LtnA2, verteilt ist. Um die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei der Bindung von LtnA1 an die bakterielle Zelloberfläche und bei der LtnA1A2-vermittelten Porenbildung *in vivo* zu analysieren, wurde die Peptid-induzierte  $\text{K}^+$ -Freisetzung aus ganzen Zellen von *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP mit einer  $\text{K}^+$ -sensitiven Elektrode gemessen. Die Lacticin 3147-Peptide wurden in Konzentrationen von jeweils 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

In der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen induzierte die gleichzeitige Zugabe beider Lacticin 3147-Peptide einen schnellen  $\text{K}^+$ -Efflux aus den Laktokokken-Zellen (Abb. 3.8a). Wurden die bakteriellen Zellen mit LtnA1 vorinkubiert und anschließend mit Puffer gewaschen, induzierte die nachfolgende Zugabe des A2-Peptids ebenfalls einem maximalen  $\text{K}^+$ -Efflux. Da das A2-Peptid alleine keine porenbildende Aktivität besitzt, ist davon auszugehen, dass LtnA1 während des Waschschrtes an der bakteriellen Zelloberfläche



**Abbildung 3.8:**  $\text{K}^+$ -Freisetzung aus ganzen Zellen von *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP, induziert durch Lacticin 3147 in der Abwesenheit (a) und Gegenwart (b) von 10 mM Titriplex VI. Lacticin 3147 A1/A2 (1:1 molares Verhältnis) wurden gleichzeitig in einer Konzentration von jeweils 1  $\mu\text{M}$  zu ganzen Zellen (blaue Quadrate) zugegeben. Bakterienzellen wurden drei Minuten mit 1  $\mu\text{M}$  LtnA1 vorinkubiert, gewaschen und anschließend mit 1  $\mu\text{M}$  LtnA2 behandelt (rote Dreiecke). Im Kontrolllexperiment wurden beide Lacticin 3147-Peptide direkt zu gewaschenen Zellen gegeben (schwarze Linie). Ein repräsentatives Experiment ist dargestellt. Schwarzer Pfeil: Peptidzugabe.

gebunden blieb. Der reduzierte intrazelluläre  $K^+$ -Gehalt wurde durch den Waschschrift verursacht, wie die entsprechende Kontrollmessung (Zellen wurden vor LtnA1A2-Zugabe gewaschen) belegt.

Nach Zugabe von Titriplex VI (um ein  $Ca^{2+}$ -freies Testsystem zu erhalten) konnte ein anderes Bild beobachtet werden. Die schnelle, durch Lacticin 3147 induzierte  $K^+$ -Freisetzung war in der Abwesenheit von  $Ca^{2+}$ -Ionen deutlich verzögert (120 s nach Peptidzugabe) und der maximale  $K^+$ -Efflux auf 70 % reduziert (Abb. 3.8b). Mit LtnA1 vorinkubierte und gewaschene Zellen blieben nach einer anschließenden Zugabe von LtnA2 unter diesen Bedingungen stabil. Offensichtlich wurde das A1-Peptid durch den Waschschrift von den Bakterienzellen entfernt. Dies deutet darauf hin, dass  $Ca^{2+}$ -Ionen einen wichtigen Faktor für die Bindung von LtnA1 an die bakterielle Zelloberfläche darstellen.

### 3.3.5 Der Einfluss von $Ca^{2+}$ -Ionen auf die porenbildende Aktivität von Lacticin 3147 in Liposomen

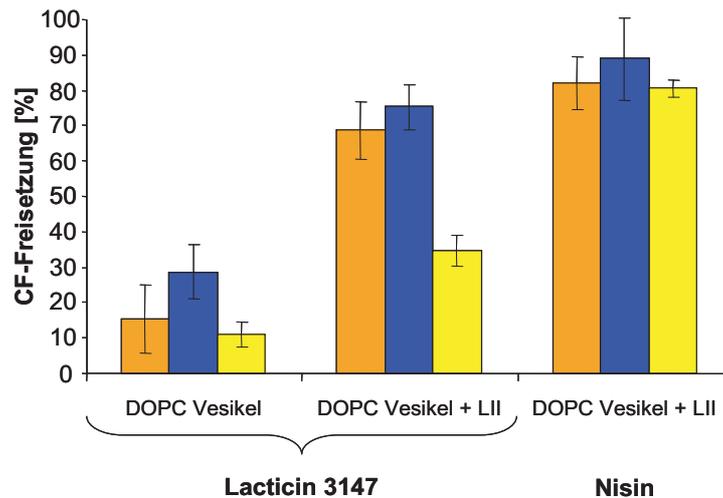
Carboxyfluorescein (CF)-Freisetzungs-Experimente wurden durchgeführt, um den Einfluss von  $Ca^{2+}$ -Ionen auf die porenbildende Aktivität von Lacticin 3147 in Abhängigkeit von Lipid II zu analysieren. CF-haltige 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)-Vesikel wurde mit und ohne 0,1 mol% eingesetzt und der Lacticin 3147-induzierte Marker-Freisetzung in Puffer, in Puffer mit zusätzlichen 1,25 mM  $CaCl_2$  und in Puffer mit 10 mM Titriplex VI ( $Ca^{2+}$ -frei) gemessen.

Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, wurde die Lacticin 3147-induzierte Porenbildung durch die Zugabe von 1,25 mM  $CaCl_2$  zum Puffer nicht beeinflusst. Sowohl die nicht Zielstruktur-vermittelte unspezifische Porenbildung in reinen DOPC-Vesikeln, als auch die durch Lipid II vermittelte Porenbildung in mit Lipid II supplementierten Vesikeln blieben unverändert.

Im Gegensatz dazu resultierte ein Entzug von  $Ca^{2+}$ -Ionen durch die Zugabe von Titriplex VI in einer signifikanten Reduzierung der porenbildenden Aktivität von Lacticin 3147 in reinen und in Lipid II-supplementierten DOPC-Vesikeln von jeweils 50 %.

Diese Daten deuten an, dass  $Ca^{2+}$ -Ionen nicht nur ein wichtiger Faktor für die LtnA1-Lipid II-Interaktion sind, wie durch die  $K^+$ -Efflux-Experimente gezeigt werden konnte, sondern auch in die Interaktion der beiden Lacticin 3147-Komponenten involviert sind.

Im Gegensatz zu Lacticin 3147 ist die porenbildende Aktivität des Typ-A Lantibiotikums Nisin in diesen geringen Konzentrationen von der Gegenwart der Zellwandvorstufe Lipid II abhängig [19]. Zusätzliche  $Ca^{2+}$ -Ionen zeigten keinen hemmenden Einfluss auf die porenbildende Aktivität, obwohl im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden konn-



**Abbildung 3.9:** Lacticin 3147- und Nisin-induzierter CF-Efflux aus DOPC-Liposomen mit und ohne 0,1 mol% Lipid II (LII). Die Peptide wurden in Konzentrationen von 0,25  $\mu\text{M}$  zu Liposomen (25  $\mu\text{M}$  auf Phosphatbasis) in Puffer (orange), in Puffer mit 1,25 mM  $\text{CaCl}_2$  (blau) und in Puffer mit 10 mM Titriplex VI (gelb) zugegeben. Die CF-Freisetzung aus den Liposomen wurde 2,5 min. nach Peptidzugabe bestimmt. Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

te, dass 1,25 mM  $\text{CaCl}_2$  einen störenden Einfluss auf den Nisin-induzierten  $\text{K}^+$ -Efflux aus *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP-Zellen hatte (Daten nicht gezeigt). Letzteres beruht auf der Anlagerung der divalenten Ionen an die anionische Bakterienmembran, wodurch es zu einer Maskierung der negativen Ladungen kommt. Dies stört die Interaktion des kationischen Nisins mit der bakteriellen Zellmembran. Dieser Effekt war in den CF-Efflux-Experimenten nicht zu beobachten, da die DOPC-Vesikel aus ungeladenen Lipiden bestehen.

### 3.4 Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Lantibiotikums Lacticin 481

#### 3.4.1 Interaktion von Lacticin 481 mit den Lipid-Carriern $\text{C}_{55}$ -P und $\text{C}_{55}$ -PP und den Zellwandvorstufen Lipid I und Lipid II

Das Lantibiotikum Lacticin 481 zeigte in *in vitro* Peptidoglykansynthese-Experimenten die Eigenschaft, spezifisch mit der Zellwandvorstufe Lipid II zu interagieren (Abb. 3.3). Um dieses Ergebnis zu verifizieren und um zu überprüfen, ob Lacticin 481 auch mit anderen essentiellen membrangebundenen Komponenten des Peptidoglykan-Biosynthe-

**Tabelle 3.4:** Antagonistischer Einfluss von C<sub>55</sub>-P, C<sub>55</sub>-PP, Lipid I und Lipid II auf die antimikrobielle Aktivität von Lacticin 481

Wachstum von <i>Micrococcus luteus</i> DSM 1790	
Kontrolle (kein Peptid)	+
Lacticin 481 <sup>a</sup>	-
Lacticin 481 + C <sub>55</sub> -P <sup>b</sup>	-
Lacticin 481 + C <sub>55</sub> -PP <sup>b</sup>	-
Lacticin 481 + Lipid I <sup>b</sup>	+
Lacticin 481 + Lipid II <sup>b</sup>	+

<sup>a</sup>MHK 1,25 µg/ml; 0,43 µM.

<sup>b</sup>Molares Verhältnis 1:2 (Peptid:Lipid).

sezyklus interagiert, wurde ein Antagonisierungstest durchgeführt.

Das Peptid wurde mit einem zweifachen Überschuss der Lipide (Lipid I, Lipid II, C<sub>55</sub>-P bzw. C<sub>55</sub>-PP) inkubiert und als höchste Konzentration in eine MHK-Bestimmung gegen *Micrococcus luteus* DSM 1790 eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

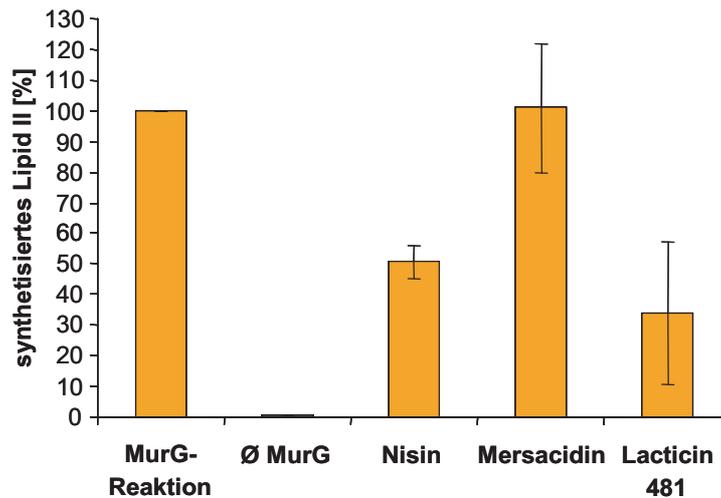
Ausschließlich eine Präinkubation von Lacticin 481 mit den Lipid I und Lipid II wirkte sich antagonisierend auf die antimikrobielle Aktivität des Lantibiotikums aus. Offensichtlich interagiert Lacticin 481 spezifisch mit den beiden Zellwandvorstufen.

### 3.4.2 Hemmung der *in vitro* Lipid II-Biosynthese durch Lacticin 481

Um die spezifische Interaktion von Lacticin 481 mit der Zellwandvorstufe Lipid I näher zu charakterisieren, wurden *in vitro* Lipid II-Syntheseansätze mit aufgereinigtem Lipid I und radiomarkiertem UDP-GlcNAc durchgeführt und die Inhibierung dieser Reaktion durch Lacticin 481 untersucht. Rekombinantes MurG aus *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 katalysiert die *in vitro* Lipid II-Synthese durch Anheftung von GlcNAc an Lipid I (Abb. 1.7). Das synthetisierte radioaktiv markierte Lipid II wurde durch Bestimmung der Radioaktivität quantifiziert.

Zum Vergleich wurden das Typ-A Lantibiotikum Nisin, das spezifisch an Lipid I bindet [12], und das Typ-B Lantibiotikum Mersacidin, das ausschließlich mit Lipid II interagiert [20], getestet.

Wie in Abbildung 3.10 gezeigt ist, reduzierte Lacticin 481 die *in vitro* Lipid II-Synthese auf 40 % und besaß damit eine mit Nisin vergleichbare inhibierende Wirkung auf die MurG-Reaktion. Dieses Ergebnis bestätigt eine spezifische Interaktion von Lacticin 481



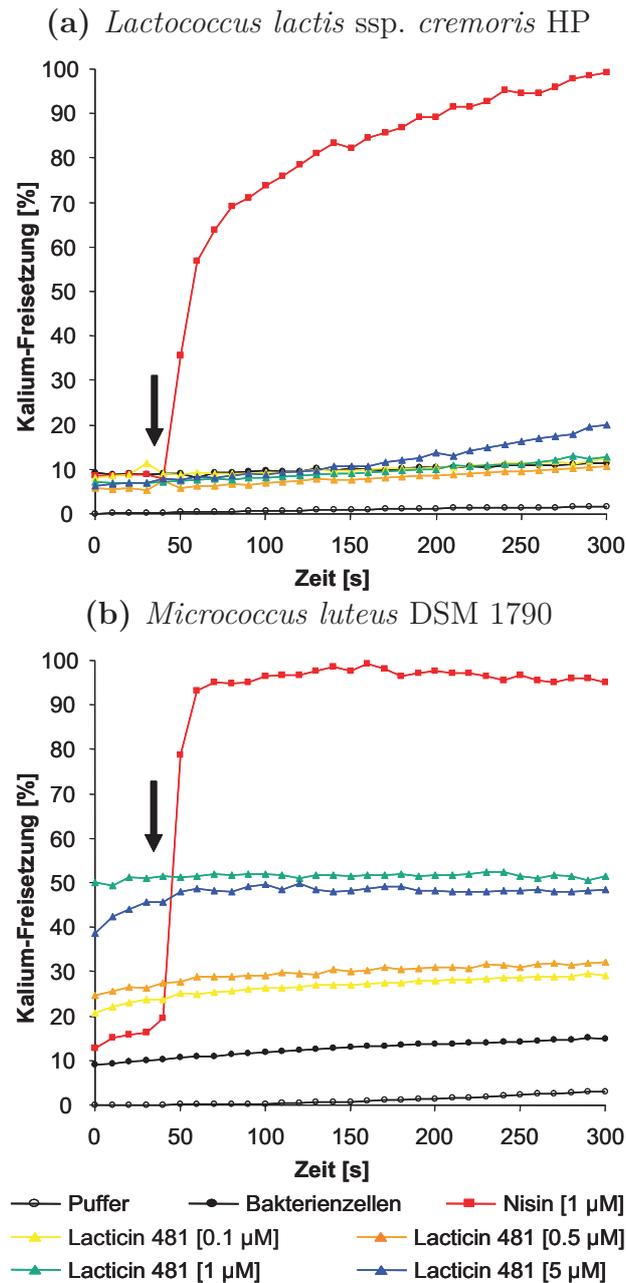
**Abbildung 3.10:** Hemmung der *in vitro* Lipid II-Synthese durch diverse Lantibiotika. Reaktionsansätze mit aufgereinigtem Lipid I und [U-<sup>14</sup>C]-GlucNAc wurden in Gegenwart der Lantibiotika im molaren Verhältnis von 1:1 (Peptid:Lipid I) inkubiert, anschließend die Lipide extrahiert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die Radioaktivität des synthetisierten, radioaktiv markierten Lipid II bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

mit Lipid I.

### 3.4.3 Der Einfluss von Lacticin 481 auf die Integrität von ganzen Zellen

Um zu überprüfen, ob es sich bei Lacticin 481 um ein porenbildendes Lantibiotikum handelt, wurde mit einer K<sup>+</sup>-Elektrode gemessen, ob das Peptid einen K<sup>+</sup>-Efflux aus ganzen Bakterienzellen induzieren kann. Als Teststämme dienten *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP, ein Stamm mit sehr hoher Lacticin 481-Empfindlichkeit, und *Micrococcus luteus* DSM 1790, der etwas weniger sensitiv ist (Tab. 3.2). Die Bakterienzellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase abgeerntet und mit verschiedenen Lacticin 481-Konzentrationen (0,1, 0,5, 1 und 5 µM) behandelt. Die Zugabe von 1 µM Nisin erfolgte als Positivkontrolle (100 %-Wert).

Lacticin 481 konnte weder in *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP- noch in *Micrococcus luteus* DSM 1790-Zellen einen K<sup>+</sup>-Efflux induzieren (Abb. 3.11). Selbst in den höchsten eingesetzten Konzentrationen von 5 µM, die einer 100-fachen MHK gegen *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP bzw. einer fast 12-fachen MHK gegen *Micrococcus luteus* DSM 1790 entsprechen, war keine Zunahme der K<sup>+</sup>-Konzentration im Puffer zu messen. Erst nach über 2,5 min war bei höchster Peptidkonzentration bei *Lactococcus lactis* ssp.



**Abbildung 3.11:** Die Auswirkung von Lacticin 481 auf die „Integrität der Zellmembran“ von *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP (a) und *Micrococcus luteus* DSM 1790 (b). Die Peptidzugabe [1 µM] erfolgte nach 30 s (schwarzer Pfeil). Der  $K^+$ -Efflux ist relativ zur Gesamtmenge freigesetzter  $K^+$ -Ionen nach Zugabe von 1 µM Nisin (100 %) dargestellt. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt. Der kontinuierliche Anstieg der anfänglichen  $K^+$ -Konzentration im Puffer bei den sukzessiv durchgeführten Messungen mit *Micrococcus luteus* DSM 1790 wurde durch Lyse der Bakterienzellen verursacht.

*cremoris* HP ein leichter Anstieg der  $K^+$ -Konzentration im Puffer zu detektieren, der möglicherweise aus einer langsamen peptidinduzierten Lyse der Bakterienzellen resultierte.

Die Zugabe von 1  $\mu$ M Nisin führte bei beiden getesteten Bakterienstämmen zu einem eindeutigen, für Porenbildung typischen  $K^+$ -Ausstrom, der bei *Micrococcus luteus* DSM 1790 etwas deutlicher ausgeprägt war. Nisin besitzt gegen diesen Bakterienstamm eine etwas höhere antimikrobielle Aktivität als gegen *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP (Tab. 3.2) und dies äußert sich wahrscheinlich in einer etwas beschleunigten Porenbildung.

Die stetige Zunahme der anfänglichen  $K^+$ -Konzentration im Puffer der sukzessiv durchgeführten Messungen mit *Micrococcus luteus* DSM 1790 wurde, trotz Lagerung auf Eis, durch die schnelle Lyse der Bakterienzellen verursacht. Die Zellen von *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP blieben in einem Zeitraum bis zu 60 min stabil.

## 3.5 Untersuchungen zur Interaktion von Lactococcin 972 mit der Zellwandvorstufe Lipid II

### 3.5.1 Antagonisierung der Lactococcin 972-Aktivität mit essentiellen Lipid-Zellwandvorläufern

Im Antagonisierungstest wurde Lactococcin 972 mit einem zweifachen Überschuss der Lipide ( $C_{55}$ -P,  $C_{55}$ -PP, Lipid I und Lipid II) inkubiert und in einer Konzentration von 0,58  $\mu$ M (62,5-fache MHK) gegen *Lactococcus lactis* MG1363 getestet. Die Tabelle 3.5 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

Nur durch Vorinkubation mit Lipid II wurde die antimikrobielle Aktivität von Lactococcin 972 antagonisiert, da ein Wachstum des Indikatorstammes beobachtet werden konnte. Offensichtlich ist das Bakteriozin in der Lage, mit Lipid II spezifisch zu interagieren.

**Tabelle 3.5:** Aufhebung der antimikrobiellen Aktivität von Lactococcin 972 durch C<sub>55</sub>-P, C<sub>55</sub>-PP, Lipid I und Lipid II

Wachstum von <i>Lactococcus lactis</i> MG1363	
Kontrolle (kein Peptid)	+
Lactococcin 972 <sup>a</sup>	-
Lactococcin 972 + C <sub>55</sub> -P <sup>b</sup>	-
Lactococcin 972 + C <sub>55</sub> -PP <sup>b</sup>	-
Lactococcin 972 + Lipid I <sup>b</sup>	-
Lactococcin 972 + Lipid II <sup>b</sup>	+

<sup>a</sup>eingesetzte Konzentration 0,58 µM (62,5-fache MHK)

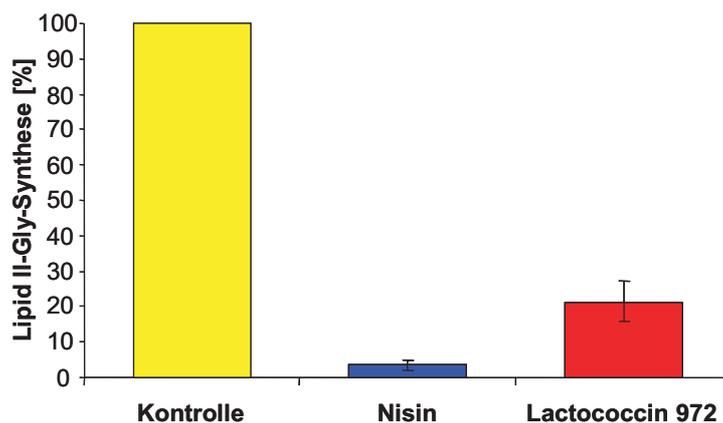
<sup>b</sup>Molares Verhältnis 1:2 (Peptid:Lipid).

### 3.5.2 Die Inhibierung der *in vitro* der Lipid II-Gly-Synthese durch Lactococcin 972

*In vitro* Lipid II-Gly-Synthese-Experimente wurden durchgeführt, um die Interaktion von Lactococcin 972 mit der Zellwandvorstufe Lipid II genauer zu analysieren. Die Anheftung eines Glycinrestes an das Lysin in der Pentapeptid-Seitenketten des Lipid II-Moleküls wird in *Staphylococcus aureus* durch das Enzym FemX katalysiert (Abb. 1.7).

Es wurde die Hemmung dieser Reaktion durch Lactococcin 972 untersucht, indem Lipid II bzw. mit Peptid vorinkubiertes Lipid II (2:1 molares Verhältnis (Peptid:Lipid II)) zusammen mit [U-<sup>14</sup>C]-Glycin in *in vitro* FemX-Reaktionsansätze eingesetzt wurden. Zum Vergleich wurde zusätzlich das Lantibiotikum Nisin eingesetzt, das mit Lipid II einen festen Komplex bildet (Abb. 3.3B). Das synthetisierte radioaktiv markierte Lipid II-Gly wurde durch Bestimmung der Radioaktivität quantifiziert.

Lactococcin 972 inhibierte die FemX-Reaktion deutlich und reduzierte die Menge des synthetisierten Lipid II-Gly um 80 % (Abb. 3.12). Das Bakteriozin ist damit ein fast ebenso potenter FemX-Inhibitor wie Nisin, das die gesamte Lipid II-Gly-Synthese hemmte. Offensichtlich bildet Lactococcin 972 mit Lipid II einen Komplex, der fest genug ist, um die Zellwandvorstufe effektiv als Substrat für FemX zu blockieren.



**Abbildung 3.12:** Hemmung der *in vitro* Lipid II-Gly-Synthese durch Lactococcin 972. Lipid II bzw. mit Lactococcin 972 (rot) oder Nisin (blau) vorinkubiertes Lipid II (2:1 molares Verhältnis (Peptid:Lipid II)) wurde in *in vitro* FemX-Reaktionsansätzen mit [U-<sup>14</sup>C]-Glycin, rekombinanter tRNA-Synthetase und aufgereinigter tRNA inkubiert. Anschließend wurden die Lipide extrahiert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und das radioaktiv markierte Lipid II-Gly quantifiziert. Die Menge des in der Kontrollreaktion (gelb) synthetisiertem Lipid II-Gly (ohne Peptid) entspricht 100 %. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die spezifische Interaktion von Mersacidin und Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika mit der Zellwandvorstufe Lipid II

Wie für das Typ-B Lantibiotikum Mersacidin, konnte im Laufe der vergangenen Jahre für verschiedene Typ-A, Typ-B und Zwei-Komponenten-Lantibiotika gezeigt werden, dass sie mit der bakteriellen Zellwandvorstufe Lipid II spezifisch interagieren.

Im Falle des Typ-A Lantibiotikums Nisin ist diese Interaktion  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig und konnte durch NMR-Studien auf der molekularen Ebene aufgeklärt werden. Das Peptid bindet über fünf intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptid-Rückgrat und dem Pyrophosphatrest des Lipid II-Moleküls an die Zellwandvorstufe. Diese Interaktion beschränkt sich ausschließlich auf den N-Terminus von Nisin (Aminosäuren 1-11, inklusive zweier Lanthionin-Ringe), der einen sogenannten „pyrophosphate cage“ bei der Komplexbildung ausbildet [55, 71]. Dieses Nisin-Lipid II-Bindemotiv ist auch in anderen Typ-A Lantibiotika, die mit der Zellwandvorstufe interagieren, zu finden, wie z.B. Epidermin und Gallidermin [9], Subtilin [85] und Mutacin 1140 [107].

Im Gegensatz dazu konnte die spezifische Interaktion des Typ-B-Lantibiotikums Mersacidin mit Lipid II noch nicht im Detail aufgeklärt werden. NMR-Untersuchungen identifizierten eine kurze Hinge-Region (Ala12Abu13), die in die Peptid-Lipid II-Interaktion involviert ist [54] und Bestandteil des konservierten Mersacidin-Lipid II-Bindemotivs (Abb. 1.8) ist.

Divalente Ionen kommen natürlich in der Zellhülle aller Bakterien vor und insbesondere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beeinflussen erheblich die Wirkungsweise antibakterieller Peptide.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Lantibiotika untersucht, die über ein Mersacidin-ähnliches Lipid II-Bindemotiv verfügen, das einen konservierten Glutamatrest enthält. Dieser konservierte Glutamatrest konnte von Kärcher durch Röntgenstrukturanalysen in dem Mersacidin-ähnlichen Lantibiotikum Actargardine als eine Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen identifiziert werden [64]. Kärcher postulierte, dass der konservierte

Glutamatrest in Mersacidin ebenfalls eine Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen darstellt und dass es bei der Mersacidin-Lipid II-Interaktion zur Ausbildung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Mersacidin-Lipid II-Komplexes kommt [64]. Basierend auf diesen Daten wurde vermutet, dass der konservierte Glutamatrest eine Rolle in der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Interaktion Mersacidin-ähnlicher Lantibiotika mit der Zellwandvorstufe Lipid II spielt.

Dies stimmt gut mit der Beobachtung überein, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die antimikrobielle Aktivität einiger der getesteten Peptide verbesserten (Tab. 3.2); ein Effekt, der bisher nur für die antibakterielle Aktivität von Mersacidin bekannt war [5].

Basierend auf den Charakteristiken in der Dünnschichtchromatographie (DC), können zwei Typen von Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika unter den hier untersuchten Peptiden unterschieden werden. Mersacidin, Lacticin 3147 sowie das einzelne A1-Peptid von Lacticin 3147 bildeten Komplexe mit Lipid II, die während der DC dissoziierten, während die Plantaricin C- und Lacticin 481-Lipid II-Komplexe stabil blieben und am Auftragungspunkt sichtbar waren (Abb. 3.3b).

Übereinstimmend mit dieser Beobachtung verfügen Mersacidin und LtnA1 über gleiche physikochemische Eigenschaften. Beide Peptide besitzen keine Nettoladung, einen N-terminalen Thioether-Ring (Ala1-Ala2) und ein Lipid II-Bindemotiv, das sich nur an einer Position unterscheidet (His anstelle von Dha an Position 23 in LtnA1). Des Weiteren verfügt LtnA1 wie Mersacidin über eine potentielle Hinge-Region (Ala19Abu20) und ein identisches C-terminales Thioether-Verbrückungsmuster (Abb. 1.11).

Entsprechend konnte für Mersacidin und LtnA1 eine in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen deutlich verbesserte Aktivität in verschiedenen Experimenten beobachtet werden. Beide Peptide benötigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen für eine volle antimikrobielle Aktivität (Tab. 3.3) und für eine potente Inhibierung der *in vitro* Peptidoglykansynthese, d.h. die Hemmung der PBP2-Reaktion (Abb. 3.3). Zudem konnte in Tryptophan-Fluoreszenzexperimenten gezeigt werden, dass das Eintauchen von LtnA1 in die Lipid-Doppelschicht von Lipid II-haltigen Vesikeln in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bedeutend verbessert war (Abb. 3.6b).

Bemerkenswerterweise ist, wie durch zielgerichtete Mutagenese gezeigt werden konnte [111, 33], der Glutamatrest im Lipid II-Bindemotiv beider Peptide, d.h. Glu17 in Mersacidin und Glu24 in LtnA1, essentiell für deren antimikrobielle Aktivität und könnte an der  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierten Aktivität beteiligt sein.

Kürzlich konnte auch für das Zwei-Komponenten-Lantibiotikum Haloduracin [80] von Cooper *et al.* durch ein *in vitro* Biosynthese-System und zielgerichtete Mutagenese ein Mersacidin-ähnliches Lipid II Bindemotiv identifiziert werden (Ala17-Ala23), das einen essentiellen Glutamatrest (Glu22) enthält. Zudem konnte für Haloduracin gezeigt wer-

den, dass die konservierte Thioether-Ringstruktur von HalA1 (Ring B; Abu18-Ala23) für die antibakterielle Aktivität nicht notwendig ist, während der benachbarte C-Ring des Peptids für die Bioaktivität von Haloduracin notwendig war [30]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die korrekte Konformation der Aminosäuren Abu-X-Glu-Ala eine kritische Determinante für die Aktivität darstellt. Dies gilt eventuell auch für Mersacidin und LtnA1.

Plantaricin C kombiniert  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige und -unabhängige Charakteristiken. Im Gegensatz zu Mersacidin und LtnA1 wurde bei den PBP2-Experimenten die feste Bindung von Plantaricin C an Lipid II nicht durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beeinflusst (Abb. 3.3), obwohl das Peptid in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine verbesserte antimikrobielle Aktivität besaß (Tab. 3.3). Aus diesem Grund müssen die divalenten Ionen die antimikrobielle Aktivität des Lantibiotikums auf einem anderen Weg verbessern. Tryptophan-Fluoreszenz-Experimente deuten an, dass das Peptid scheinbar erst auf der Membranoberfläche von Vesikeln lokalisiert, wenn es an Lipid II bindet. Der Tryptophan-haltige Abschnitt von Plantaricin C tauchte erst in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Lipid-Doppelschicht ein (Abb. 3.4). Möglicherweise stabilisieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine Konformation des Lantibiotikums, die für ein Eintauchen in die Membran mehr kompatibel ist. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass ein Eintauchen des Peptids in die bakterielle Membran ein wichtiger  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Schritt ist und zu einer verbesserten *in vivo* Aktivität beiträgt.

Möglicherweise sind diese Daten auch erste Hinweise für den molekularen Ablauf der Porenbildung durch Plantaricin C, ein Wirkungsmechanismus, der für einige spezifische Bakterienstämme beschrieben ist [44, 123]. Es könnte sein, dass die Porenbildung ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Prozess ist, da das Peptid offensichtlich erst in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in eine Membran Lipid II-haltiger Vesikel eintaucht, ein für die Bildung einer membrandurchspannenden Pore essentieller Schritt.

Leider ist nicht bekannt, in welchem Ausmaß die Gegenwart des konservierten Glutamatrestes im Lipid II-Bindemotiv von Plantaricin C an der Aktivität mitwirkt, da bisher noch keine Untersuchungen mit zielgerichteter Mutagenese in Plantaricin C durchgeführt worden sind, um zu aufzuklären, ob dieser Glutamatrest essentiell ist.

## 4.2 Der Wirkungsmechanismus von Lacticin 481

Bisher ist wenig über den Wirkungsmechanismus von Lantibiotika der Lacticin 481-Gruppe bekannt. Lacticin 481 und Nukacin ISK-1 besitzen beide Affinität zu künstlichen Lipidmonolayern [35, 3], Streptococcin A-FF22 bildet in Membranen mit einem

Potenzial von mindestens 100 mV instabile Poren [58] und alle Produzenten von Peptiden dieser Lantibiotika-Gruppe haben zum Selbstschutz mit LanFEG ein System, das die Peptide von der bakteriellen Zellmembran ins Medium entfernen soll [38]. Dufour *et al.* vermuteten, dass diese Lantibiotika ihre antimikrobielle Aktivität an der bakteriellen Zellmembran über einen gemeinsamen Wirkmechanismus entfalten, indem die Peptide nicht nur über elektrostatische Wechselwirkungen mit anionischen Lipiden an die Zielmembran binden, sondern auch über ein Mersacidin-ähnliches Lipid II-Bindemotiv an die Zellwandvorstufe Lipid II binden [38].

Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit für Lacticin 481 bestätigt werden. Das Peptid interagiert spezifisch mit Lipid II und inhibiert die Zellwandbiosynthese auf dem Level der Transglykosylierung (Abb. 3.3a). Die Abbildung 4.1d zeigt ein Modell für den Wirkungsmechanismus von Lacticin 481.

Interessanterweise war die Aktivität von Lacticin 481 im Gegensatz zu den anderen untersuchten Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika komplett  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig. Weder die antimikrobielle Aktivität (Tab. 3.3), noch die Aktivität in den PBP2-Experimenten war in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gesteigert (Abb. 3.3a). Zusätzlich bildete das Peptid wie Plantaricin C  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig einen festen Komplex mit Lipid II (Abb. 3.3B).

Offensichtlich sind bei der Lacticin 481-Aktivität keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen involviert. Diese Folgerung wird durch die Tatsache unterstützt, dass kürzlich von Patton *et al.* durch den Einsatz von zielgerichteter Mutagenese gezeigt werden konnte, dass der Glutamatrest an Position 13 im Mersacidin-ähnlichen Lipid II-Bindemotiv von Lacticin 481 im Gegensatz zu Mersacidin und LtnA1 nicht für die antibakterielle Aktivität des Peptids essentiell ist [86]. Offensichtlich ist für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -verbesserte antimikrobielle Aktivität von Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika ein für die Peptidaktivität essentieller Glutamatrest im Lipid II-Bindemotiv notwendig.

Dennoch bildet Lacticin 481 wie Plantaricin C  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig einen stabilen Komplex mit Lipid II (Abb. 3.3B). Bei dieser Interaktion ist der GlcNAc-Rest des Lipid II-Moleküls offensichtlich nicht beteiligt, da Lacticin 481 in Antagonisierungstests und MurG-Experimenten auch mit der Zellwandvorstufe Lipid I interagiert (Tab. 3.4, Abb. 3.10), die im Vergleich zum Lipid II-Molekül keinen GlcNAc-Rest besitzt (Abb. 1.7). Der GlcNAc-Rest ist z.B. für die spezifische Interaktion von Mersacidin mit Lipid II essentiell [22], während andere Lantibiotika wie z.B. Plantaricin C für eine Interaktion mit Lipid II auf diesen nicht angewiesen sind [123].

Obwohl beide Peptide mit Lipid I und Lipid II interagieren, unterscheiden sich Lacticin 481 und Plantaricin C in ihrer porenbildenden Aktivität. Lacticin 481 induzierte in  $\text{K}^+$ -Efflux-Experimenten auch in hohen Konzentrationen keine  $\text{K}^+$ -Freisetzung

(Abb. 3.11), während Plantaricin C in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP und anderen sensitiven Bakterienstämmen Poren bildet [44, 123]. Dieser Unterschied zeigt sich möglicherweise auch in den Tryptophan-Fluoreszenzexperimenten. Im Gegensatz zu Plantaricin C interagiert Lacticin 481 mit Lipid II-haltigen Vesikeln, ohne dass der Tryptophan-haltige Peptidabschnitt in die Lipid Doppelschicht einzutauchen schien, obwohl sich der einzelne Tryptophanrest an einer Position im Molekül befindet (fünf Aminosäuren C-terminal vom Lipid II-Bindemotiv), die vergleichbar mit der Lage des Tryptophanrestes in Plantaricin C ist (sechs Aminosäuren C-terminal vom Lipid II-Bindemotiv). Darin spiegelt sich möglicherweise die fehlende porenbildende Aktivität von Lacticin 481 wider, da das Lantibiotikum nicht in die Vesikelmembran eintauchen kann. Dass Lacticin 481 trotz Ausbleiben einer Fluoreszenzspektrumsänderung mit zwitterionischen DOPC-Vesikeln interagiert, ist sicher, da Demel *et al.* eine Spezifität von Lacticin 481 für anionische und besonders für zwitterionische Lipide zeigen konnten [35].

### 4.3 Der Einfluss der positiven Netto-Gesamtladung auf die Aktivität Mersacidin-ähnlicher Lantibiotika

Zusätzlich zur Verbesserung der Peptid-Lipid II-Interaktion könnte es möglich sein, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auch die Funktion haben, den beiden ungeladenen Peptiden Mersacidin und LtnA1 eine insgesamt positive Nettoladung zu verleihen, die den Lantibiotika eine Interaktion mit der negativ geladenen Oberfläche der bakteriellen Zellmembran ermöglicht.

Ein solcher Mechanismus wurde kürzlich für das anionische Lipopeptid Daptomycin beschrieben. Es wurde vorgeschlagen, dass Daptomycin in Lösung  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in einem molaren Verhältnis von 1:1 bindet, um Mizellen mit einer insgesamt positiven Ladung zu bilden, die hohe Konzentrationen des Antibiotikums zur bakteriellen Membran befördern könnten. In enger räumlicher Nähe zur Membran könnten solche Mizellen dissoziieren und Daptomycin in die Lipid-Doppelschicht inserieren und eine positive Membrankrümmung und Ionen-Freisetzung bewirken [59, 108, 49, 104].

Im Gegensatz zu Mersacidin und LtnA1 besitzen Plantaricin C und Lacticin 481 einen positiv geladenen N-Terminus, der den Peptiden eine insgesamt positive Nettoladung verleiht.

Dieser N-Terminus scheint eine wichtige Rolle in der Aktivität beider Lantibiotika zu spielen. Ein Abspalten des N-Terminus in Plantaricin C durch Trypsin-Behandlung hob die gesamte Peptidaktivität auf [43] und eine gekürzte Form von Lacticin 481 (T-Lacticin 481), der die Aminosäuren 1-5 fehlten, besaß eine zehnfach reduzierte spezifische

Aktivität [114]. Ein proteolytisches Fragment von Lacticin 481, dem der N-terminale Lysinrest fehlte, zeigte eine reduzierte antimikrobielle Aktivität [127].

Die positiv geladenen Aminosäuren in Plantaricin C und Lacticin 481 könnten die Interaktion beider Peptide mit der Bakterienmembran ermöglichen, wie es schon für Nukacin ISK-1 [102], einem Lantibiotikum der Lacticin 481-Gruppe [38], gezeigt werden konnte. Dieses Peptid enthält drei N-terminale Lysinreste, die, wie kürzlich dargelegt werden konnte, für die starke Affinität des Peptids für anionische Lipidmembranen verantwortlich sind [3]. Nukacin ISK-1-Mutanten, denen Lysinreste fehlten oder durch Alaninreste ausgetauscht waren, zeigten eine verringerte Bindung an anionische Membranen und eine 32-fache Reduzierung der antibakteriellen Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass eine elektrostatische Bindung von Nukacin ISK-1 an die bakterielle Membran ein wichtiger Schritt im Wirkungsmechanismus darstellt. Nukacin ISK-1-Mutanten mit zusätzlichen Lysinresten am N-Terminus zeigten eine verbesserte Bindung an anionische Membranen, aber keine erhöhte antimikrobielle Aktivität [3].

#### 4.4 Der Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Porenbildungsprozess von Lacticin 3147

Lacticin 3147 ist ein porenbildendes Bakteriozin, das kleine ionenselektive Poren in der Zytoplasmamembran von empfindlichen Bakterien bildet [79]. Nach Aufklärung der Peptidstruktur durch multidimensionale NMR-Spektroskopie wurde aufgrund von Strukturähnlichkeiten des Lacticin 3147-A1-Peptids mit dem Typ-B Lantibiotikum Mersacidin, ein Modell für die Wirkungsweise von Lacticin 3147 entwickelt. LtnA1 sollte wie Mersacidin spezifisch an die Zellwandvorstufe Lipid II binden und LtnA2 anschließend durch Interaktion mit dem entstandene LtnA1:Lipid II-Komplex eine membrandurchspannende Pore bilden [70, 81]. Diese Modell konnte von Wiedemann *et al.* bestätigt und gleichzeitig ein dualer Wirkungsmechanismus für das Zwei-Komponenten-Lantibiotikum postuliert werden, nach dem Lacticin 3147 neben der Porenbildung seine antimikrobielle Aktivität auch durch Hemmung der Zellwandbiosynthese erreicht [124].

Informationen über den Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf den Porenbildungsprozess konnte nur mit dem Zwei-Komponenten Lantibiotikum Lacticin 3147 erhalten werden, da von den untersuchten Lantibiotika nur dieses Peptid eine porenbildende Aktivität besitzt.

*In vitro* CF-Efflux-Experimente zeigten, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einen insgesamt stimulierenden Effekt auf die Porenbildung durch Lacticin 3147 haben (Abb. 3.9). Die divalenten Ionen beeinflussen offensichtlich die Lacticin 3147-Lipid II-Interaktion und die Interaktion

zwischen A1- und A2-Peptid, da sowohl in reinen, als auch in Lipid II-supplementierten DOPC-Vesikeln die Lacticin 3147-induzierte CF-Freisetzung verdoppelt wurde.

Zudem sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, wie durch Tryptophan-Fluoreszenzspektroskopie gezeigt werden konnte (Abb. 3.6b), erforderlich für ein tiefes Eintauchen von LtnA1 in die Lipid-Doppelschicht von Lipid II-haltigen DOPC-Vesikeln. Die für ein in die Membran eingedrungenes Peptid typische Spektrumsänderung konnte auch  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig in Gegenwart des A2-Peptids beobachtet werden (Abb. 3.7a), das in seinem C-terminalen Bereich über insgesamt zwei positiv geladene Aminosäuren (Lys24 und Arg27) verfügt (Abb. 1.11).

Diese Ergebnisse heben die wichtige Rolle positiver Ladungen in der Aktivität von Lacticin 3147 hervor. Dies konnte auch *in vivo* bestätigt werden.  $\text{K}^+$ -Efflux-Experimente zeigten, dass für eine feste Bindung von LtnA1 an Zellen, ein Schritt, der für die nachfolgende Porenbildung essentiell ist, die Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen oder von LtnA2 essentiell war (Abb. 3.8).

#### **4.5 Eine Hypothese über die Funktion von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Wirkungsmechanismus einiger Mersacidin-ähnlicher Lantibiotika**

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann eine Hypothese über die Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Wirkungsmechanismus einiger Mersacidin-ähnlicher Lantibiotika aufgestellt werden.

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind für eine Interaktion von Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika mit der Zellwandvorstufe Lipid II nicht essentiell. Vielmehr verbessern sie die antimikrobielle Aktivität einiger, aber nicht aller Peptide und der Weg, wie die divalenten Ionen zur antimikrobiellen Aktivität beitragen, unterscheidet sich von Peptid zu Peptid.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können zum einen Peptiden ohne Nettoladung eine positive Gesamtladung verleihen, wodurch die Interaktion mit der Bakterienmembran verbessert wird und/oder zum anderen können sie die Affinität der Lantibiotika für Lipid II verstärken, woraus ein tieferes Eindringen der Peptide in die Lipid-Doppelschicht resultiert. Bei letzterem handelt es sich um einen wichtigen Prozess für die Aktivität von Lantibiotika, die in ihrem Lipid II-Bindemotiv einen essentiellen Glutamatrester enthalten.

In Abbildung 4.1 ist zusammenfassend ein Modell für die Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Wirkungsmechanismus von Mersacidin, Plantaricin C, Lacticin 3147 und Lacticin 481 dargestellt.

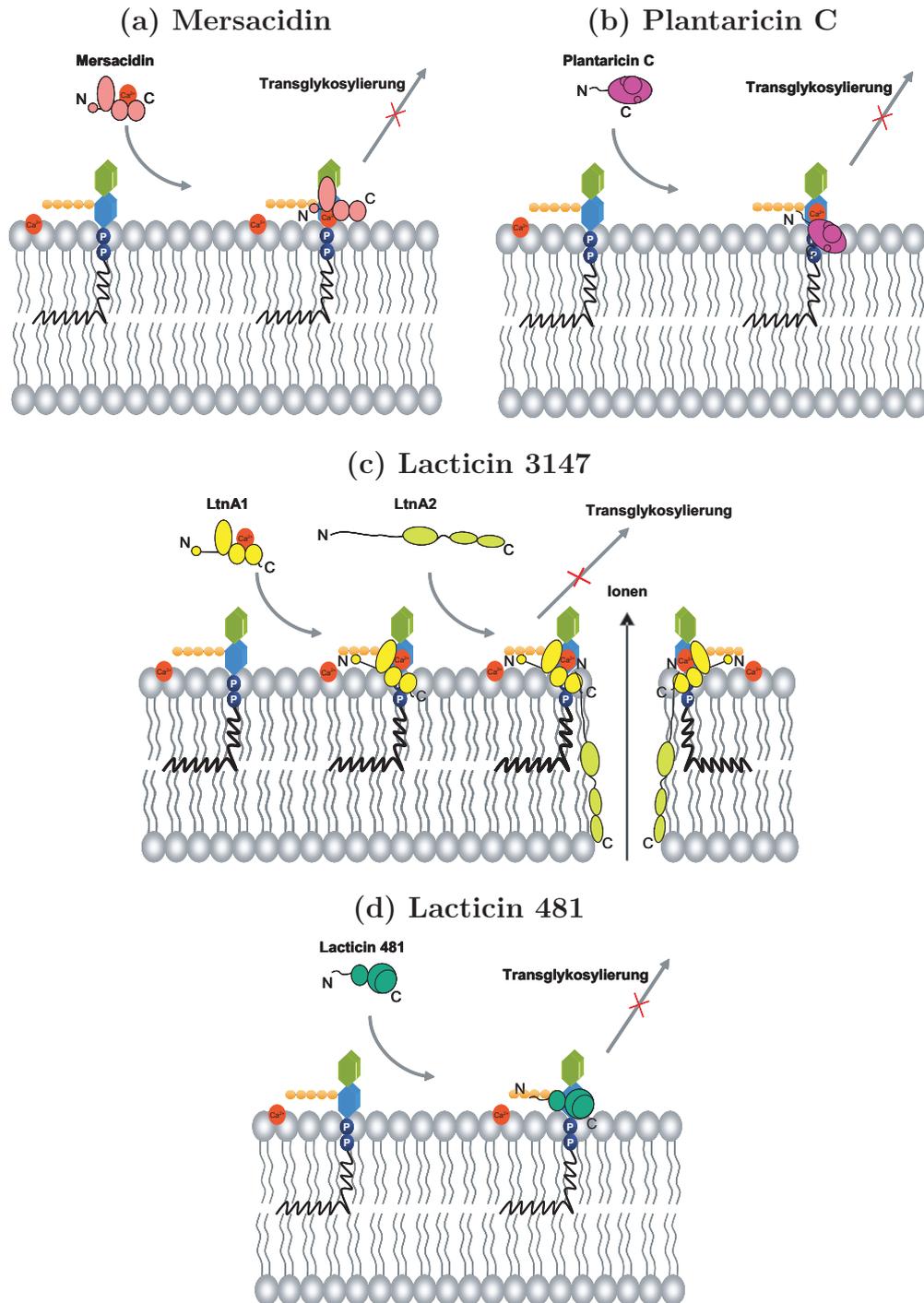


Abbildung 4.1: Hypothetisches Modell für die Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Wirkungsmechanismus von Mersacidin (a), Plantaricin C (b), Lacticin 3147 (c) und Lacticin 481 (d).  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind als gefüllte rote Kreise dargestellt.

Das ungeladene Lantibiotikum Mersacidin entwickelt seine durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verbesserte antimikrobielle Aktivität, indem das Peptid in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen höchstwahrscheinlich ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion bindet. Dies verleiht dem Lantibiotikum eine positive Netto-Gesamtladung und ermöglicht eine erleichterte Bindung an die negativ geladene Bakterienmembran und eine verstärkte Interaktion mit Lipid II. Dies bewirkt eine verstärkte Hemmung des Transglykosylierungsschritt der Zellwand-Biosynthese (Abb. 4.1a).

Plantaricin C entfaltet in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine verbesserte antimikrobielle Aktivität vermutlich nicht durch eine verstärkte Inhibierung der Zellwandbiosynthese. Das kationische Lantibiotikum bindet über seinen positiv geladenen N-Terminus an die negativ geladene bakterielle Zellmembran und interagiert spezifisch mit der Zellwandvorstufe Lipid II.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erleichtern höchstwahrscheinlich diese Interaktion, indem sie eine Konformationsänderung von Plantaricin C induzieren, die ein Eintauchen des Peptids in die Bakterienmembran ermöglicht (Abb. 4.1b).

Im Gegensatz zu den anderen Peptiden ist Lacticin 3147 ein Zwei-Komponenten-Lantibiotikum, das über einen dualen Wirkungsmechanismus verfügt.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wirken sich verbessernd auf die antimikrobielle und die porenbildende Aktivität des Peptids aus. Anscheinend fördern  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sowohl die LtnA1-Lipid II-Interaktion als auch die Interaktion des A2-Peptids mit dem LtnA1:Lipid II-Komplex.

LtnA1 besitzt wie Mersacidin keine Nettoladung und könnte durch die Bindung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions eine insgesamt positive Nettoladung erhalten. Dies erleichtert die Bindung des A1-Peptids an die bakterielle Zellmembran und verstärkt die LtnA1-Lipid II-Interaktion. Zudem ermöglicht es ein Eintauchen des Lantibiotikums in die Bakterienmembran (Abb. 4.1c).

Lacticin 481 besitzt eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Aktivität. Das kationische Lantibiotikum bindet über seinen positiv geladenen N-Terminus an die bakterielle Zellmembran und inhibiert durch Komplexierung von Lipid II die Zellwandbiosynthese (Abb. 4.1d).

Mersacidin-ähnliche Lantibiotika, deren Wirkungsmechanismus potenziell durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen unterstützt wird, sind z.B. Actagardine [129], die A1-Peptide einiger Zwei-Komponenten-Lantibiotika (Staphylococcin C55 [83], Smb [128], BHT-A [57] und Haloduracin [80]) oder auch Variacin [89], die wie Mersacidin und das A1-Peptid von Lacticin 3147 über keinen positiv geladenen N-Terminus verfügen. Über die notwendige essentielle Rolle des konservierten Glutamatrestes ist bis auf Haloduracin (siehe Kapitel 4.1) bei keinem der aufgezählten Peptide etwas bekannt.

## 4.6 Die Interaktion von Lactococcin 972 mit der Zellwandvorstufe Lipid II

Die Ergebnisse des Antagonisierungstests (Tab. 3.5) und der FemX-Experimente (Abb. 3.12) zeigen eindeutig, dass das Bakteriozin Lactococcin 972 mit der Zellwandvorstufe Lipid II spezifisch interagiert. Dies deutete sich schon in früheren Untersuchungen an, da das Peptid den Einbau von Zellwandvorstufen und die Septumbildung in sich teilenden Bakterienzellen inhibierte [74]. Zudem aktiviert Lactococcin 972 das Zwei-Komponenten-Regulationssystem CesSR, das durch Moleküle, die störend auf Lipid II und dessen Biosynthese-Kreislauf wirken, stark induziert wird [77]. Zusätzlich dazu konnten Martínez *et al.* zeigen, dass Lactococcin 972 mit Lipid II-Mizellen copräzipitiert und die *in vitro* PBP2-Reaktion hemmt [72]. Diese Resultate bestätigen, dass es sich bei Lactococcin 972 um das erste bekannte, nicht-lanthioninhaltige Bakteriozin handelt, das mit der Zellwandvorstufe Lipid II interagiert.

Lactococcin 972 besteht aus unmodifizierten Aminosäureresten und enthält keine Lanthioninringe oder Cysteine, die eventuell intramolekulare Brücken bilden könnten. Dies unterscheidet das Peptid von den Lantibiotika. Innerhalb letzterer wurden bisher zwei verschiedene Struktur motive beschrieben, die an der Interaktion dieser Peptide mit Lipid II beteiligt sind [10] und basieren auf Strukturuntersuchungen an den Lipid II-bindenden Lantibiotika Nisin und Mersacidin (siehe Kapitel 4.1). In beiden Fällen sind Lanthioninringe an der Interaktion mit Lipid II beteiligt. Aus diesem Grund besitzt Lactococcin 972 möglicherweise ein neues Lipid II-Bindemotiv.

Lactococcin 972 unterscheidet sich von den Lantibiotika darin, dass es über ein sehr nahes Wirkspektrum verfügt und nur gegen bestimmte Laktokokken-Stämme aktiv ist [75], obwohl es als Zielstruktur Lipid II besitzt. Da die Zellwandvorstufe ein Molekül ist, das im Reich der Prokaryoten ubiquitär vorkommt, könnte es sein, dass das Peptid ein mutmaßliches Co-Target benötigt, das den Zugang zu Lipid II unterstützt bzw. ermöglicht. Dieses Co-Target ist möglicherweise ein Bestandteil des Divisoms, da das Peptid gegen sich nicht teilende Zellen keine Aktivität besitzt und spezifisch die Septumbildung inhibiert [74]. Desweiteren reduziert das Peptid nicht die Dicke der bakteriellen Zellwand, wie es für Lipid II-bindende Lantibiotika wie z.B. Mersacidin [21] beschrieben ist. Dies muss jedoch in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

## 4.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben neue wichtige Informationen für die Aufklärung der Wirkungsmechanismen von Lantibiotika geliefert. Es konnte gezeigt werden, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Wirkungsmechanismus einiger Mersacidin-ähnlicher Lantibiotika eine wichtige Rolle spielen. Dies trifft wahrscheinlich auch noch für weitere Mersacidin-ähnliche Lantibiotika zu, wobei auch ein Effekt auf Typ-A Lantibiotika nicht ausgeschlossen werden kann. Um diese identifizieren zu können, wäre es interessant, in zukünftigen Untersuchungen zur Wirkungsweise von Lantibiotika, z.B. in MHK-Bestimmungen oder in Experimenten zur Lantibiotika-Lipid II-Interaktion, auch den Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu berücksichtigen.

Da die Bildung eines Peptid- $\text{Ca}^{2+}$ -Lipid II-Komplexes für die Aktivität der Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika offensichtlich nicht essentiell ist, müssen kommende Untersuchungen klären, wie die divalenten Ionen genau in die Aktivität der Peptide eingreifen.

Im Fall von Lactococcin 972 konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch ein nicht-lanthioninhaltiges Bakteriozin mit der Zellwandvorstufe Lipid II interagiert. In dieser Bakteriozin-Klasse werden höchstwahrscheinlich weitere Mitglieder identifiziert werden, die an Lipid II binden, um ihre antimikrobielle Aktivität zu entfalten. Es wird interessant zu sehen sein, welche strukturellen Merkmale diese Peptide besitzen, um mit dem Lipid II-Molekül interagieren zu können.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Zunahme der Resistenzentwicklung in pathogenen Bakterien gegen klinisch relevante Antibiotika in den vergangenen Jahren dramatische Ausmaße angenommen hat, ist es notwendig, neue hochwirksame Antibiotika zu entwickeln. Die Identifizierung von aktivitätssteigernden Faktoren, kann dabei eine entscheidende Rolle spielen.

## 5 Zusammenfassung

### Der Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die Aktivität von Mersacidin und Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika

Das Typ-B-Lantibiotikum Mersacidin entfaltet seine antibakterielle Aktivität, indem es spezifisch über ein konserviertes Bindemotiv mit der ultimativen Zellwandvorstufe Lipid II interagiert und dadurch den Transglykosylierungsschritt der Zellwandbiosynthese inhibiert. Die maximale antimikrobielle Aktivität erreicht das Peptid in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

In dieser Arbeit sollte die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Wirkmechanismus von Mersacidin aufgeklärt und überprüft werden, ob es sich bei der aktivitätssteigernden Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen um einen Mersacidin-spezifischen Effekt handelt oder ob auch andere Mersacidin-ähnliche Lantibiotika (Lantibiotika, die über ein konserviertes Mersacidin-ähnliches Lipid II-Bindemotiv verfügen) auf die Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen angewiesen sind, um ihre maximale antibakterielle Aktivität zu entfalten. Neben Mersacidin wurden die Mersacidin-ähnlichen Lantibiotika Plantaricin C, Lacticin 481 und Lacticin 3147 untersucht. Diese Peptide besitzen alle das konservierte Lipid II-Bindemotiv, unterscheiden sich aber in ihren strukturellen Eigenschaften. So verfügen z.B. Plantaricin C und Lacticin 481 im Gegensatz zu Mersacidin über einen verlängerten, positiv geladenen N-Terminus. Lacticin 3147 ist ein Zwei-Komponenten-Lantibiotikum.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die antimikrobielle Aktivität von Mersacidin, Plantaricin C und Lacticin 3147 verbessern. Die divalenten Ionen entfalten ihren verstärkenden Einfluss, indem sie die Interaktion dieser Peptide mit der bakteriellen Zellmembran, respektive Lipid II, unterstützen. Lacticin 481 besitzt einen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Wirkungsmechanismus, der erstmalig genau aufgeklärt werden konnte.

**Mersacidin** entfaltet in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine verbesserte antimikrobielle Aktivität, indem das ungeladene Peptid höchstwahrscheinlich ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion bindet, das dem Peptid eine insgesamt positive Nettoladung verleiht. Dies erleichtert die Bindung an die negativ geladene bakterielle Zellmembran und verstärkt die spezifische In-

teraktion mit der Zellwandvorstufe Lipid II und die Hemmung der Zellwandbiosynthese (Transglykosylierungsschritt).

Die in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verbesserte antimikrobielle Aktivität von **Plantaricin C** beruht vermutlich nicht auf einer verstärkten Hemmung der Zellwandbiosynthese. Vielmehr könnten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, nachdem das kationische Peptid über seinen positiv-geladenen N-Terminus an die Bakterienmembran gebunden hat, eine Konformationsänderung des Peptids ermöglichen, die eine Interaktion mit Lipid II erleichtert und ein Eintauchen des Lantibiotikums in die bakterielle Zellmembran erlaubt.

**Lacticin 3147** unterscheidet sich von den anderen Peptiden dadurch, dass es ein Zwei-Komponenten-Lantibiotikum ist und einen dualen Wirkungsmechanismus besitzt. Die Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen fördert die antimikrobielle und die porenbildende Aktivität des Peptids. Möglicherweise erleichtern  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die Interaktion von LtnA1 mit Lipid II sowie auch die LtnA2-Interaktion mit dem LtnA1:Lipid II-Komplex.

Das insgesamt ungeladene A1-Peptid könnte wie Mersacidin durch die Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine positive Gesamt-Nettoladung erhalten, die eine Bindung an die Bakterienmembran unterstützt. Zudem bewirken  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine verstärkte Interaktion von LtnA1 mit Lipid II sowie ein Eintauchen des Peptids in die Membran.

Die Aktivität von **Lacticin 481** ist offensichtlich  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig. Das kationische Peptid bindet über seinen positiv geladenen N-Terminus an die Bakterienmembran und inhibiert die Zellwandbiosynthese durch Komplexbildung der Zellwandvorstufe Lipid II. Es wurde weder eine verstärkte Interaktion mit Lipid II noch ein Eintauchen des Peptids in die Membran beobachtet.

#### **Zusätzliche Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Lantibiotikums Lacticin 481 ergaben:**

- Lacticin 481 besitzt gegen die Teststämme *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP und *Micrococcus luteus* DSM 1790 keine porenbildende Aktivität.
- Lacticin 481 interagiert spezifisch mit den beiden Zellwandvorstufen Lipid I und Lipid II. Dies bedeutet, dass bei der Lacticin 481-Lipid II-Interaktion der *N*-Acetyl-Glucosaminrest der Zellwandvorstufe nicht involviert ist.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei Lacticin 481 um ein ausschließlich die Zellwand-Biosynthese hemmendes Lantibiotikum handelt.

---

**Untersuchungen zur Interaktion des nicht-lanthioninhaltigen Bakteriozins Lactococcin 972 mit der Zellwandvorstufe Lipid II ergaben:**

- Lactococcin 972 bindet an Lipid II und ist damit das erste nicht-lanthioninhaltige Bakteriozin, für das eine solche Interaktion gezeigt werden konnte.

# Literaturverzeichnis

- [1] 2003. *The QIAexpressionist*. Qiagen GmbH.
- [2] **Anderson, J., M. Matsushashi, M.A. Haskin, and J.L. Strominger.** 1967. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. II. Phospholipid carriers in the reaction sequence. *J. Biol. Chem.* **242**:3180–3190.
- [3] **Asaduzzaman, S., J. Nagao, Y. Aso, J. Nakayama, and K. Sonomoto.** 2006. Lysine-oriented charges trigger the membrane binding and activity of nukacin ISK-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:6012–6017.
- [4] **Barreteau, H., A. Kovac, A. Boniface, M. Sova, S. Gobec, and D. Blanot.** 2008. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:168–207.
- [5] **Barrett, M., R.P. Wenzel, and R.N. Jones.** 1992. *In vitro* activity of mersacidin (M87-1551), an investigational peptide antibiotic tested against gram-positive bloodstream isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:641–644.
- [6] **Benz, R., G. Jung, and H.-G. Sahl.** 1991. *Nisin and Novel Lantibiotics*. Chapter Mechanism of channel-formation by lantibiotics in black lipid membranes, p. 359-372. ESCOM Science Publishers, Leiden.
- [7] **Bierbaum, G., and H.G. Sahl.** 1985. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch. Microbiol.* **141**:249–254.
- [8] **Bierbaum, G., and H.G. Sahl.** 1987. Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J. Bacteriol.* **169**:5452–5458.
- [9] **Bonelli, R., T. Schneider, H.G. Sahl, and I. Wiedemann.** 2006a. Insights into *in vivo* activities of lantibiotics from gallidermin and epidermin mode-of-action studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1449–1457.

- 
- [10] **Bonelli, R., I. Wiedemann, and H.G. Sahl.** 2006b. *Handbook of Biologically Active Peptides* chapter Lantibiotics. Academic Press, Amsterdam.
- [11] **Bonelli, R., I. Wiedemann, and H.G. Sahl.** 2006c. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Chapter Lantibiotics. Academic Press, Amsterdam.
- [12] **Bonev, B., E. Breukink, E. Swiezewska, B. De Kruijff, and A. Watts.** 2004. Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin. *FASEB J.* **18**:1862–1869.
- [13] **Booth, M., C.P. Bogie, H.G. Sahl, R.J. Siezen, K.L. Hatter, and M.S. Gilmore.** 1996. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol. Microbiol.* **21**:1175–1184.
- [14] **Bouhss, A., A.E. Trunkfield, T.D. Bugg, and D. Mengin-Lecreulx.** 2008. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:208–233.
- [15] **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
- [16] **Breukink, E., H.E. van Heusden, P.J. Vollmerhaus, E. Swiezewska, L. Brunner, S. Walker, A.J. Heck, and B. de Kruijff.** 2003. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J. Biol. Chem.* **278**:19898–19903.
- [17] **Breukink, E., C. van Kraaij, R.A. Demel, R.J. Siezen, O.P. Kuipers, and B. de Kruijff.** 1997. The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry* **36**:6968–6976.
- [18] **Breukink, E., C. van Kraaij, A. van Dalen, R.A. Demel, R.J. Siezen, B. de Kruijff, and O.P. Kuipers.** 1998. The orientation of nisin in membranes. *Biochemistry* **37**:8153–8162.
- [19] **Breukink, E., I. Wiedemann, C. van Kraaij, O.P. Kuipers, H. Sahl, and B. de Kruijff.** 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* **286**:2361–2364.
- [20] **Brötz, H., G. Bierbaum, K. Leopold, P.E. Reynolds, and H.G. Sahl.** 1998. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:154–160.

- 
- [21] **Brötz, H., G. Bierbaum, A. Markus, E. Molitor, and H.G. Sahl.** 1995. Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism? *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:714–719.
- [22] **Brötz, H., G. Bierbaum, P.E. Reynolds, and H.G. Sahl.** 1997. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur. J. Biochem.* **246**:193–199.
- [23] **Brötz, H., M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Götz, G. Bierbaum, and H.G. Sahl.** 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.* **30**:317–327.
- [24] **Burianek, L., and A.E. Yousef.** 2000. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**:193–197.
- [25] **Calvin, N., and P.C. Hanawalt.** 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**:2796–2801.
- [26] **Cascales, E., S.K. Buchanan, D. Duché, C. Kleanthous, R. Llobès, K. Postle, M. Riley, S. Slatin, and D. Cavard.** 2007. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**:158–229.
- [27] **Chatterjee, C., M. Paul, L. Xie, and W.A. van der Donk.** 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.* **105**:633–684.
- [28] **Chatterjee, S., S. Chatterjee, S.J. Lad, M.S. Phansalkar, R.H. Rupp, B.N. Ganguli, H.W. Fehlhaber, and H. Kogler.** 1992. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization. *J. Antibiot.* **45**:832–838.
- [29] **Choung, S., T. Kobayashi, J. Inoue, K. Takemoto, H. Ishitsuka, and K. Inoue.** 1988. Hemolytic activity of a cyclic peptide Ro09-0198 isolated from *Streptovorticillium*. *Biochim. Biophys. Acta* **940**:171–179.
- [30] **Cooper, L. E., A. L. McClarren, A. Chary, and W. A. van der Donk.** 2008. Structure-activity relationship studies of the two-component lantibiotic haloduracin. *Chem. Biol.* **15**:1035–1045.
- [31] **Cotter, P., L.A. Draper, E.M. Lawton, O. McAuliffe, C. Hill, and R.P. Ross.** 2006. Overproduction of wild-type and bioengineered derivatives of the lantibiotic lactacin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(6):4492–4496.

- 
- [32] **Cotter, P., C. Hill, and R.P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:777–788.
- [33] **Cotter, P. D., L. H. Deegan, E. M. Lawton, L. A. Draper, P. M. O’Connor, C. Hill, and R. P. Ross.** 2006. Complete alanine scanning of the two-component lantibiotic lactacin 3147: generating a blueprint for rational drug design. *Mol. Microbiol.* **62**:735–747.
- [34] **Cowgill, R.** 1967. Fluorescence and Protein Structure. X. Reappraisal of Solvent and Structural Effects. *Biochimica et Biophysica Acta* **133**:6–18.
- [35] **Demel, R., T. Peelen, R.J. Siezen, B. De Kruijff, and O.P. Kuipers.** 1996. Nisin Z, mutant nisin Z and lactacin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. A monolayer study. *Eur. J. Biochem.* **235**:267–274.
- [36] **Dischinger, J., C. Szekat, and G. Bierbaum.** 2008. Lichenicidin: a novel two-component lantibiotic produced by *Bacillus licheniformis* DSM13. *In: Tagungsband zur VAAM-/GBM-Jahrestagung 2008* .
- [37] **Driessen, A., H.W. van den Hooven, W. Kuiper, M. van de Kamp, H.G. Sahl, R.N. Konings, and W.N. Konings.** 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry* **34**:1606–1614.
- [38] **Dufour, A., T. Hindré, D. Haras, and J.P. Le Pennec.** 2007. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**:134–167.
- [39] **Dufour, A., D. Thuault, A. Boulliou, C.M. Bourgeois, and J.P. Le Pennec.** 1991. Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus lactis* strain and purification of the inhibitory peptide. *J. Gen. Microbiol.* **137**:2423–2429.
- [40] **Duquesne, S., V. Petit, J. Peduzzi, and S. Rebuffat.** 2007. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**:200–209.
- [41] **Gasson, M. J.** 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* **154**:1–9.
- [42] **Gillor, O., B.C. Kirkup, and M.A. Riley.** 2004. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**:129–146.

- 
- [43] **González, B., P. Arca, B. Mayo, and J.E. Suárez.** 1994. Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2158–2163.
- [44] **González, B., E. Glaasker, E. Kunji, A. Driessen, J.E. Suarez, and W.N. Konings.** 1996. Bactericidal Mode of Action of Plantaricin C. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2701–2709.
- [45] **Guder, A., I. Wiedemann, and H.G. Sahl.** 2000. Posttranslationally modified bacteriocins—the lantibiotics. *Biopolymers* **55**:62–73.
- [46] **Hancock, R., and H.G. Sahl.** 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* **24**:1551–1557.
- [47] **Hasper, H., B. de Kruijff, and E. Breukink.** 2004. Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry* **43**:11567–11575.
- [48] **Hécharad, Y., and H.G. Sahl.** 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* **84**:545–557.
- [49] **Ho, S. W., D. Jung, J. R. Calhoun, J. D. Lear, M. Okon, W. R. Scott, R. E. Hancock, and S. K. Straus.** 2008. Effect of divalent cations on the structure of the antibiotic daptomycin. *Eur. Biophys. J.* **37**:421–433.
- [50] **Hoffmann, A., U. Pag, I. Wiedemann, and H.G. Sahl.** 2002. Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. *Farmaco* **57**:685–691.
- [51] **Holo, H., Z. Jeknic, M. Daeschel, S. Stevanovic, and I.F. Nes.** 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology* **147**:643–651.
- [52] **Hope, M., M.B. Bally, G. Web, and P.R. Cullis.** 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta* **812**:55–65.
- [53] **Hosoda, K., M. Ohya, T. Kohno, T. Maeda, S. Endo, and K. Wakamatsu.** 1996. Structure determination of an immunopotentiator peptide, cinnamycin, complexed with lysophosphatidylethanolamine by <sup>1</sup>H-NMR. *J. Biochem.* **119**:226–230.

- 
- [54] **Hsu, S., E. Breukink, G. Bierbaum, H.G. Sahl, B. de Kruijff, R. Kaptein, N.A. van Nuland, and A.M. Bonvin.** 2003. NMR study of mersacidin and lipid II interaction in dodecylphosphocholine micelles. Conformational changes are a key to antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* **278**:13110–13117.
- [55] **Hsu, S., E. Breukink, E. Tischenko, M.A. Lutters, B. de Kruijff, R. Kaptein, A.M. Bonvin, and N.A. van Nuland.** 2004. The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:963–967.
- [56] **Hurst, A.** 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* **27**:85–123.
- [57] **Hyink, O., M. Balakrishnan, and J.R. Tagg.** 2005. *Streptococcus rattus* strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.* **252**:235–241.
- [58] **Jack, R., R. Benz, J. Tagg, and H.G. Sahl.** 1994. The mode of action of SAFF22, a lantibiotic isolated from *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *Eur. J. Biochem.* **219**:699–705.
- [59] **Jung, D., A. Rozek, M. Okon, and R. E. Hancock.** 2004. Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. *Chem. Biol.* **11**:949–957.
- [60] **Jung, G.** 1991. Lantibiotics - ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfid bridges and alpha,beta-didehydroamino acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**:1051–1068.
- [61] **Kodani, S., M.A. Lodato, M.C. Durrant, F. Picart, and J.M. Willey.** 2005. SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes. *Mol. Microbiol.* **58**:1368–1380.
- [62] **Kohlrausch, U., and J.V. Höltje.** 1991. One-step purification procedure for UDP-N-acetylmuramyl-peptide murein precursors from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **62**:253–257.
- [63] **Kordel, M., F. Schüller, and H.G. Sahl.** 1989. Interaction of the pore forming-peptide antibiotics Pep 5, nisin and subtilin with non-energized liposomes. *FEBS Lett.* **244**:99–102.

- 
- [64] **Kärcher, J.** 2000. *Mersacidin-analoge Typ-B-Lantibiotika - Kristallisation, Datensammlung und Strukturaufklärung*. PhD thesis Georg-August-Universität, Göttingen. <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2000/kaercher/jkaercher.pdf>.
- [65] **Körner, C.** 2006. Klonierung, Aufreinigung und Untersuchung zur Aktivität der Zellwandbiosyntheseenzyme MraY und PBP2 aus *Staphylococcus aureus*. Master's thesis Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Deutschland.
- [66] **Kuipers, O., W.M.G.J. Yap, H.S. Rollema, M.M. Beerthuyzen, R.J. Siezen, and W.M. de Vos.** 1991. *Nisin and Novel Lantibiotics*. Chapter Expression of wild-type and mutant nisin genes in *Lactococcus lactis*, p. 259-259. ESCOM Science Publishers, Leiden.
- [67] **Laemmli, U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
- [68] **Linnett, P., and J.L. Strominger.** 1973. Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**:231–236.
- [69] **Liu, W., and J.N. Hansen.** 1993. The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:648–651.
- [70] **Martin, N., T. Sprules, M.R. Carpenter, P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross, and J.C. Vederas.** 2004. Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry* **43**:3049–3056.
- [71] **Martin, N. I., and E. Breukink.** 2007. Expanding role of lipid II as a target for lantibiotics. *Future Microbiol.* **2**:513–525.
- [72] **Martínez, B., T. Böttiger, T. Schneider, A. Rodríguez, H. G. Sahl, and I. Wiedemann.** 2008. Specific interaction of the unmodified bacteriocin Lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:4666–4670.
- [73] **Martínez, B., M. Fernández, J. E. Suárez, and A. Rodríguez.** 1999. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology* **145**:3155–3161.
- [74] **Martínez, B., A. Rodríguez, and J. E. Suárez.** 2000. Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci. *Microbiology* **146**:949–955.

- 
- [75] **Martínez, B., J. E. Suárez, and A. Rodríguez.** 1995. Antagonistic activities of wild lactococcal strains isolated from homemade cheeses. *J. Food. Prot.* **58**:1118–1123.
- [76] **Martínez, B., J. E. Suárez, and A. Rodríguez.** 1996. Lactococcin 972: a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. *Microbiology* **142**:2393–2398.
- [77] **Martínez, B., A. L. Zomer, A. Rodríguez, J. Kok, and O. P. Kuipers.** 2007. Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the Lactococcal two-component system CesSR. *Mol. Microbiol.* **64**:473–486.
- [78] **Mayer, L., M.J. Hope, and P.R. Cullis.** 1986. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta* **858**:161–168.
- [79] **McAuliffe, O., M.P. Ryan, R.P. Ross, C. Hill, P. Breeuwer, and T. Abee.** 1998. Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:439–445.
- [80] **McClerren, A., L.E. Cooper, C. Quan, P.M. Thomas, N.L. Kelleher, and W.A. van der Donk.** 2006. Discovery and in vitro biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:17243–17248.
- [81] **Morgan, S., P.M. O’connor, P.D. Cotter, R.P. Ross, and C. Hill.** 2005. Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lacticin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2606–2611.
- [82] **Märki, F., E. Hänni, A. Fredenhagen, and J. van Oostrum.** 1991. Mode of action of the lanthionine-containing peptide antibiotics duramycin, duramycin B and C, and cinnamycin as indirect inhibitors of phospholipase A2. *Biochem. Pharmacol.* **42**:2027–2035.
- [83] **Navaratna, M., H.G. Sahl, and J.R. Tagg.** 1998. Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4803–4808.
- [84] **Orlov, D., T. Nguyen, and R.I. Lehrer.** 2002. Potassium release, a useful tool for studying antimicrobial peptides. *J. Microbiol. Methods* **49(3)**:325–328.

- 
- [85] **Parisot, J., S. Carey, E. Breukink, W. C. Chan, A. Narbad, and B. Bonev.** 2008. Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:612–618.
- [86] **Patton, G., M. Paul, L.E. Cooper, C. Chatterjee, and W.A. van der Donk.** 2008. The importance of the leader sequence for directing lanthionine formation in lactacin 481. *Biochemistry* **47**:7342–7351.
- [87] **Piard, J.-C., F. Delorme, G. Giraffa, J. Commissaire, and M. Desmazeaud.** 1990. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* cnrz 481. *Neth. Milk Dairy J.* **44**:143–158.
- [88] **Prasch, T., T. Naumann, R.L. Markert, M. Sattler, W. Schubert, S. Schaal, M. Bauch, H. Kogler, and C. Griesinger.** 1997. Constitution and solution conformation of the antibiotic mersacidin determined by NMR and molecular dynamics. *Eur. J. Biochem.* **244**:501–512.
- [89] **Pridmore, D., N. Rekhif, A. C. Pittet, B. Suri, and B. Mollet.** 1996. Variacin, a new lanthionine-containing bacteriocin produced by *Micrococcus varians*: comparison to lactacin 481 of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1799–1802.
- [90] **Reisinger, P., H. Seidel, H. Tschesche, and W.P. Hammes.** 1980. The effect of nisin on murein synthesis. *Arch. Microbiol.* **127**(3):187–193.
- [91] **Rick, P., G.L. Hubbard, M. Kitaoka, H. Nagaki, T. Kinoshita, S. Dowd, V. Simplaceanu, and C. Ho.** 1998. Characterization of the lipid-carrier involved in the synthesis of enterobacterial common antigen (ECA) and identification of a novel phosphoglyceride in a mutant of *Salmonella typhimurium* defective in ECA synthesis. *Glycobiology* **8**:557–567.
- [92] **Rilla-Villar, N.** 2003. *Aplicación de Bacterias Lácticas productoras de Bacteriocinas en Bioconservación*. PhD thesis Universidad de Santiago de Compostela, Spanien.
- [93] **Rogers, H., H.R. Perkins, and J.B. Ward.** 1980. *Microbial Cell Walls and Membranes*. Chapman and Hall, London.
- [94] **Rohrer, S., and B. Berger-Bächi.** 2003. FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:837–846.

- 
- [95] **Rouser, G., S. Fkeischer, and A. Yamamoto.** 1970. Two dimensional then layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**:494–496.
- [96] **Ruhr, E., and H.G. Sahl.** 1985. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:841–845.
- [97] **Ryan, M., M.C. Rea, C. Hill, and R.P. Ross.** 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:612–619.
- [98] **Sahl, H., R.W. Jack, and G. Bierbaum.** 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* **230**:827–853.
- [99] **Sahl, H., M. Kordel, and R. Benz.** 1987. Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Arch. Microbiol.* **149**:120–124.
- [100] **Sahl, H.-G.** 1991. *Nisin and Novel Lantibiotics.* Chapter Pore formation in bacterial membranes by cationic peptides, p. 347-358. ESCOM Science Publishers, Leiden.
- [101] **Sahl, H.-G., and H. Brandis.** 1981. Production, purification and chemical properties of an antistaphylococcal agent produced by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Gen. Microbiol.* **127(2)**:377–384.
- [102] **Sashihara, T., H. Kimura, T. Higuchi, A. Adachi, H. Matsusaki, K. Sonomoto, and A. Ishizaki.** 2000. A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**:2420–2428.
- [103] **Sauvage, E., F. Kerff, M. Terrak, J.A. Ayala, and P. Charlier.** 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:234–258.
- [104] **Schneider, T., K. Gries, I. Wiedemann, S. Pelzer, H. Labischinski, and H.-G. Sahl.** 21.01.2009. The Lipopeptide Antibiotic Friulimicin B Inhibits Cell Wall Biosynthesis through Complex Formation with Bactoprnol-Phosphate. *Antimicrob. Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.01040-08.

- 
- [105] **Schneider, T., J. Kärcher, E. Pohl, P. Lubini, and G.M. Sheldrick.** 2000. *Ab initio* structure determination of the lantibiotic mersacidin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56**:705–713.
- [106] **Schneider, T., M.M. Senn, B. Berger-Bächi, A. Tossi, H.G. Sahl, and I. Wiedemann.** 2004. *In vitro* assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **53**:675–685.
- [107] **Smith, L., H. Hasper, E. Breukink, J. Novak, J. Cerkasov, J. D. Hillman, S. Wilson-Stanford, and R. S. Orugunty.** 2008. Elucidation of the antimicrobial mechanism of mutacin 1140. *Biochemistry* **47**:3308–3314.
- [108] **Straus, S. K., and R. E. Hancock.** 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**:1215–1223.
- [109] **Studier, F., A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, and J.W. Dubendorff.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**:60–89.
- [110] **Surewicz, W., and R.M. Epand.** 1984. Role of peptide structure in lipid-peptide interactions: A fluorescence study of the binding of pentagastrin-related pentapeptides to phospholipid vesicles. *Biochemistry* **23**:6072–6077.
- [111] **Szekat, C., R.W. Jack, D. Skutlarek, H. Färber, and G. Bierbaum.** 2003. Construction of an expression system for site-directed mutagenesis of the lantibiotic mersacidin. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3777–3783.
- [112] **Thuault, D., E. Beliard, J. Le Guern, and C.M. Bourgeois.** 1991. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **74**:1145–1150.
- [113] **Turner, D., L. Brennan, H.E. Meyer, C. Lohaus, C. Siethoff, H.S. Costa, B. Gonzalez, H. Santos, and J.E. Suárez.** 1999. Solution structure of plantaricin C, a novel lantibiotic. *Eur. J. Biochem.* **264**:833–839.
- [114] **Uguen, P., T. Hindré, S. Didelot, C. Marty, D. Haras, J.P. Le Pennec, K. Vallée-Réhel, and A. Dufour.** 2005. Maturation by LctT is required for biosynthesis of full-length lantibiotic lactacin 481. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:562–565.

- 
- [115] **van den Hooven, H., F.M. Lagerwerf, W. Heerma, J. Haverkamp, J.C. Piard, C.W. Hilbers, R.J. Siezen, O.P. Kuipers, and H.S. Rollema.** 1996a. The structure of the lantibiotic lactacin 481 produced by *Lactococcus lactis*: location of the thioether bridges. *FEBS Lett.* **391**:317–322.
- [116] **van den Hooven, H., C.A. Spronk, M. van de Kamp, R.N. Konings, C.W. Hilbers, and F.J. van de Van.** 1996b. Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bound to membrane-mimicking micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *Eur. J. Biochem.* **235**:394–403.
- [117] **van Heijenoort, J.** 2007. Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**:620–635.
- [118] **van Heusden, H., B. de Kruijff, and E. Breukink.** 2002. Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry* **41**:12171–12178.
- [119] **van Kraaij, C., E. Breukink, M.A. Noordermeer, R.A. Demel, R.J. Siezen, O.P. Kuipers, and B. de Kruijff.** 1998. Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane. *Biochemistry* **37**:16033–16040.
- [120] **Vollmer, W.** 2008. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:287–306.
- [121] **Vollmer, W., D. Blanot, and M.A. de Pedro.** 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:149–167.
- [122] **Wiedemann, I., R. Benz, and H.G. Sahl.** 2004. Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. *J. Bacteriol.* **186**:3259–3261.
- [123] **Wiedemann, I., T. Böttiger, R.R. Bonelli, T. Schneider, H.G. Sahl, and B. Martínez.** 2006a. Lipid II-based antimicrobial activity of the lantibiotic plantaricin C. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:2809–2814.
- [124] **Wiedemann, I., T. Böttiger, R.R. Bonelli, A. Wiese, S.O. Hagge, T. Gutschmann, U. Seydel, L. Deegan, C. Hill, P. Ross, and H.G. Sahl.** 2006b. The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147—a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol. Microbiol.* **61**:285–296.

- 
- [125] **Willey, J., and W.A. van der Donk.** 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**:477–501.
- [126] **Wirth, R., A. Friesenegger, and S. Fiedler.** 1989. Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* **216**:175–177.
- [127] **Xie, L., L.M. Miller, C. Chatterjee, O. Averin, N.L. Kelleher, and W.A. van der Donk.** 2004. Lacticin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science* **303**:679–681.
- [128] **Yonezawa, H., and H.K. Kuramitsu.** 2005. Genetic analysis of a unique bacteriocin, Smb, produced by *Streptococcus mutans* GS5. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:541–548.
- [129] **Zimmermann, N., and G. Jung.** 1997. The three-dimensional solution structure of the lantibiotic murein-biosynthesis-inhibitor actagardine determined by NMR. *Eur. J. Biochem.* **246**:809–819.

# Eidesstattliche Erklärung

An Eides statt versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt habe und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, unter Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht sind.

Diese oder eine ähnliche Arbeit wurde noch an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Bonn, im Februar 2009

---

Tim Böttiger

## Publikationen

- **Böttiger, T., Schneider T., Martínez B., Sahl H.-G., Wiedemann I.** The influence of Ca<sup>2+</sup> ions on the activity of lantibiotics containing a mersacidin-like lipid II binding motif. Manuskript eingereicht (AEM00262-09, Version1).
- **Martínez, B., Böttiger, T., Schneider, T., Rodríguez, A., Sahl, H.G. and Wiedemann, I.** 2008. Specific interaction of the unmodified bacteriocin Lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:4666-4670.
- **Wiedemann, I., Böttiger, T., Bonelli, R.R., Wiese, A., Hagge, S.O., Gutschmann, T., Seydel, U., Deegan, L., Hill, C., Ross, P. and Sahl, H.G.** 2006b. The mode of action of the lantibiotic lacticin 3147 – a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol. Microbiol.* **61**:285–296.
- **Wiedemann, I., Böttiger, T., Bonelli, R.R., Schneider, T., Sahl, H.G. and Martínez, B.** 2006a. Lipid II-based antimicrobial activity of the lantibiotic plantaricin C. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:2809–2814.