

Identifizierung biologisch aktiver Peptide und
Proteine in den Sekreten von *Lucilia sericata* im
Wundheilungsgeschehen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Marcus Berger

aus Köln

Hundt Druck GmbH, Köln

Juli 2006

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. F.-G. Hanisch zwischen März 2003 und Mai 2006 im Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.

Betreuung der Arbeit und Erstellung des Erstgutachtens:

Prof. Dr. rer. nat. F.-G. Hanisch

Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Erstellung des Zweitgutachtens:

Prof. Dr. rer. nat. Dietmar Schomburg

Institut für Biochemie der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Prüfungsvorsitz:

Prof. Dr. rer. nat. Helmut W. Klein

Institut für Biochemie der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Tag der mündlichen Prüfung:

04 Juli 2006

„My flesh is clothed with maggots and clods of dust
My skin rotted and fouled afresh”

(Job VII, 5)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Behandlung von chronischen Wunden bei Infektionen mit Methicillin-resistenten <i>Staphylococcus aureus</i> ein Problem	1
1.2	Therapiestandard zur Behandlung von chronischen Wunden	2
1.3	Wundheilung durch sterile Fliegenlarven	3
1.4	Antibakterielle Resistenz am Beispiel von <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.5	Antimikrobielle Peptide	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit	22

2. Material und Methoden

2.1	Chemikalien	23
2.2	Gewinnung des Exkretion-Sekretion-Produktes von <i>Lucilia sericata</i>	24
2.3	Antibakterielle <i>Assays</i>	24
2.4	Biochemische und Massenspektrometrische Methoden	27
2.5	2D-Gelelektrophorese	33
2.6	In-Gel Digestion/Trypsinverdau	40
2.7	Probenvorbereitung für ESI-MS/MS-Messung aus In-Gel <i>Digestion</i>	45
2.8	Chromatographische Trennungsmethoden	46

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1	Untersuchungen des Sekrets aus den Speicheldrüsen von <i>Lucilia sericata</i>	48
3.1.1	Antibakterieller <i>Assay</i> unter Einsatz von Speicheldrüsensekret	49
3.1.2	Die Fraktionierung der Peptide	52
3.1.3	Die MALDI-MS Analyse	53
3.1.4	Elektrospray-Ionisation-MS/MS Analyse	54
3.1.5	Diskussion	58

Inhaltsverzeichnis

3.2	Die Proteomanalyse des Exkretions-Sekretions-Produktes	62
3.2.1	Identifizierung der Proteine im ES-Produkt	63
3.2.2	Diskussion	68
3.3	Peptidom-Analyse und <i>Screening</i> nach antibakteriellen Peptiden im ES-Produkt von <i>Lucilia sericata</i>	78
3.3.1	Der biologische Test auf der Grundlage einer Biolumineszenz-Reaktion	78
3.3.2	Trennung des ES-Produktes in Proteine und Peptide	81
3.3.3	Trennung der Peptidfraktion mit <i>Reversed-phase- und hydrophiler-Interaktions-Chromatographie</i>	82
3.3.4	Fraktionierung der Peptide mit hydrophiler Interaktions- und <i>Reversed-phase-Chromatographie</i>	84
3.3.5	Analyse der aktiven Fraktionen mittels LC-ESI-MS/MS	88
3.3.6	Diskussion	91
4.	Zusammenfassung	99
5.	Abstract	100
6.	Literaturverzeichnis	101
7.	Danksagung	117
8.	Erklärung	118
9.	Lebenslauf	119

1. Einleitung

1.1 Behandlung von chronischen Wunden bei Infektionen mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* - ein Problem

Mikroorganismen sind nahezu in fast allen chronischen Wunden anzutreffen. Ihre Anwesenheit bedeutet nicht obligat eine Verschlechterung des Heilungsprozesses. So können Bakterien in chronischen Wunden durch Freisetzung von proteolytischen Enzymen wie z.B. Hyaluronidase das physiologische *Debridment* unterstützen (O`Meara S. *et al.*, 2000). Darüber hinaus regen sie neutrophile Granulozyten an, die ihrerseits Proteasen zur Unterstützung freisetzen (Stone LL. *et al.*, 1980).

Unter dem Begriff „Kontamination einer Wunde“ versteht man die Besiedlung von Gewebe mit Bakterien, die sich nicht replizieren. Der Terminus Kolonisation besagt, dass es zu einer Replikation von Bakterien im Gewebe kommt. Eine klinische Differenzierung zwischen einer Kolonisation und einer lokalen Infektion ist sehr schwierig. Trotzdem gibt es einige Anhaltspunkte die klar für eine lokale Infektion sprechen. Klinische Anzeichen wären neben einer verzögerten Wundheilung auch Schmerzen, Fötor, Blutungen und der Nachweis von 10^5 Bakterien/pro Gramm Gewebe (Cutting KF. *et al.*, 2004). Bei Nachweis einer Infektion bzw. einer kritischen Kolonisation ist bei Patienten mit chronischen Wunden die Verwendung von lokalen antiseptischen Maßnahmen (Verabreichungen von Antibiotika) indiziert (Dissemond J. *et al.*, 2005).

In den letzten zwei bis drei Jahrzehnten ist weltweit von einer Zunahme von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in chronischen Wunden berichtet worden (Stone LL. *et al.*, 1980). In Deutschland sind 21.5% der Patienten mit chronischen Wunden, die in eine Klinik eingeliefert werden, mit MRSA infiziert. In Großbritannien zeigte eine Studien aus dem Jahr 2001, dass 35% aller Patienten mit akuten, chronischen Wunden mit MRSA infiziert sind (Dang CN. *et al.*, 2002).

Eine Analyse der Studien der letzten beiden Jahrzehnte zeigte, dass Patienten mit MRSA ein signifikant erhöhtes Mortalitätsrisiko aufweisen (Cosgrove SE. *et al.*, 2003). Daher muss das Ziel einer jeden therapeutischen Behandlung von chronischen Wunden sein, eine deutliche Reduzierung der Quantität der pathogenen MRSA-

Erreger in der Wunde zu erreichen oder diese zu eliminieren (Dissemond J. *et al.*, 2005).

1.2 Therapiestandard zur Behandlung von chronischen Wunden

Die Therapie von Patienten mit MRSA unterscheidet sich im Prinzip kaum von einer Therapie ohne MRSA. Allerdings bringt der Nachweis dieses Erregers zahlreiche Konsequenzen mit sich. Zum einen muss der Patient isoliert behandelt werden, damit der Erreger nicht verbreitet wird. Zum anderen müssen verschärfte Hygienemaßnahmen eingehalten werden. Diese Maßnahmen erschweren den Umgang mit dem Patienten erheblich. Dazu kommen noch deutlich erhöhte Kosten und große logistische Probleme. Die Behandlung von MRSA-Patienten verursacht allein in Großbritannien einen Kostenmehraufwand von über 13 Millionen Pfund im Jahr (Dang CN *et al.*, 2002).

Bei MRSA-Nachweis sollte zunächst eine gründliche Reinigung der Haut mit desinfizierenden Waschlösungen und sauren Syndets erfolgen. Als antiseptische Applikation hat sich bei der Therapie Octenidin, PVP-Jod oder Polyhexanid bewährt (Stone LL. *et al.*, 1980). Problematisch ist allerdings bei dieser Therapie, dass Octenidin und PVP-Jod eine hemmende bzw. zytotoxische Wirkung auf die Zellproliferation haben und somit die Wundheilung weiter verzögern (Gillitzer R. *et al.*, 2002). Das Antiseptikum Polyhexanid hat keine zytotoxische Wirkung und es konnte *in vivo* bei Patienten mit chronischen Wunden eine suffiziente MRSA-Eradikation gezeigt werden.

Bei MRSA-Infektionen stellen sog. Reserveantibiotika, wie die Glykopeptidantibiotika Vancomycin oder Teicoplanin, wichtige systemische antimikrobielle Therapieoptionen dar. Diese Antibiotika sind sehr wirksam, allerdings haben sie eine geringe Gewebepenetration, d.h. dass die gewünschte Konzentration des Wirkstoffes in der Wunde zu gering ist. Es muss folglich eine höhere Dosis verabreicht werden, um die gewünschte Wirkstoffkonzentration in der Wunde zu erreichen. Darüber hinaus ist eine Kombination mit anderen antibiotischen Substanzen, wie z.B. Rifampicin oder Fusidinsäure notwendig, da Glykopeptidantibiotika nicht gegen Erreger in den Schleimhäuten aktiv sind (Linde HJ *et al.*, 2002). Eine weitere Problematik stellt die zunehmende Resistenz von *Staphylococcus aureus*-Stämmen gegen Vancomycin dar.

So wurden Ende der 90er Jahre in den USA die ersten Resistenzfälle beschrieben (Lowry F., 2003).

Seit einigen Jahren gibt es neue alternative Behandlungsmethoden zur Gabe von Glykopeptidantibiotika. Neue Antibiotika, wie z. B. Dalfopristin oder Linezolid sind sehr wirksame Antibiotika. Dalfopristin hemmt irreversibel den Extrusionskanal am Ribosom und hat eine sehr stark bakterizide Wirkung, während Linezolid die Proteinbiosynthese inhibiert und sowohl bakterizid als auch bakteriostatisch wirkt. Beide Antibiotika wurden mit Erfolg bei der Therapie von MRSA-Patienten eingesetzt. Allerdings wurden die beiden Substanzen lediglich beim Versagen anderer Therapieschemata eingesetzt (von Eiff C. *et al.*, 1999), was sicherlich an den starken Nebenwirkungen, wie z.B. Lebersversagen liegt. Bei längerer Gabe von Linezolid wurden bereits resistente *Staphylococcus aureus* Stämme beschrieben (von Eiff C. *et al.*, 1999).

Es gibt zu den oben beschriebenen alternativen Behandlungsmethoden mit neuen Antibiotika eine weitere Therapie, die bei der Behandlung von chronischen Wunden sehr Erfolg versprechend ist. Dabei handelt es sich um eine Therapieform, die sich unter dem Begriff „Madenentherapie“ in letzter Zeit einen Namen gemacht hat. Dabei werden Fliegenmaden der Schmeißfliege *Lucilia sericata* (Abb.1/S.5) bei der Behandlung von chronischen Wunden eingesetzt.

Steckbrief *Lucilia sericata*

Lucilia sericata gehört taxonomisch zur der Ordnung der Diptera (Zweiflügler) und zur Familie der Calliphoridae (Schmeißfliegen). Als Fliege gehört sie zu den kleinsten vorkommenden Schmeißfliegen und hat eine charakteristische metallic grüne Farbe. Ihr Lebensraum ist überwiegend im ländlichen Raum mit Tierhaltung. Sie wird insbesondere von Schafzüchtern als ein Parasit angesehen, weil sie als Erstbesiedlerin von Wunden bei Schafen gilt und verstärkt Fleisch fressende Fliegenarten anlockt. Larven von *Lucilia* fressen ausschließlich abgestorbenes Gewebe, während Larven andere Schmeißfliegenarten auch vitales Gewebe angreifen.

Die Madentherapie wurde erfolgreich vor über 80 Jahren in den USA gegen Knochenmarkentzündung eingesetzt. Ende der 80er und Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts erfuhr diese Therapie ein *Comeback* bei der Behandlung von chronischen Wunden. In Deutschland ist sie neuerdings unter dem Namen „Biochirurgie“ bekannt und wird seit etwa 10 Jahren eingesetzt. Mittlerweile stellt sie eine erfolgreiche Alternative, aufgrund der zunehmenden Antibiotika Resistenz, bei der Behandlung von chronischen Wunden dar. Die Fliegenmaden von *Lucilia sericata* sind in Deutschland als Arzneimittel zugelassen und werden von der Firma Biomonde aus Barsbüttel (Hamburg) vertrieben. Die Kosten der Madentherapie werden von meisten Krankenkassen übernommen.

1.3 Wundheilung durch sterile Fliegenlarven

„Patrouillen im Fleisch“

Der Spiegel

In den letzten 10-15 Jahren hat eine alte Behandlungsmethode zur Behandlung von schwer heilbaren Wunden unter dem Begriff *Biochirurgie* oder *Maggot-Debriment-Therapy* erneut große Aufmerksamkeit erfahren (Sherman RA., 2000 und Mumcuoglu KY. 2001). Wenig erfolgreiche Behandlungsversuche von schlecht heilenden Wunden und das vermehrte Auftreten von Antibiotika resistenten Keimen haben dieser Therapieform große Aufmerksamkeit zu Teil werden lassen. Erfolgreich behandelt werden konnten chronische Wunden wie *Ulcus cruris venosum*, *Malum perforans*, *Dekubitus* und *Fournier`sches Gangrän*.

Die ersten schriftlichen Berichte zur Madentherapie stammen aus dem 16. Jahrhundert von einem französischen Chirurgen mit dem Namen *Ambroise Pare* (1510-1590). Während der napoleonischen Kriege beschrieb ein Militärarzt der französischen Armee, *Baron Dominique Jean Jarry*, ebenfalls die Auswirkungen von Fliegenmaden in Wunden verletzter Soldaten (Larrey DJ, 1932). Im amerikanischen Bürgerkrieg setzten Ärzte der Südstaatenarmee zum ersten Mal Fliegenmaden als therapeutisches Mittel ein. Erst in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts untersuchte der amerikanische Arzt *WS. Baer* das wundheilungsfördernde Potential steril gezüchteter Schmeißfliegenlarven.

Dabei wurde deutlich, dass es sich bei dem über Jahre hinweg beobachteten positiven Einfluss steriler Schmeißfliegenlarven auf akute, chronische Wunden nicht um das „*Maggot Active Principle*“ im Sinne eines *Remedium cardinale* handelt

(Livingston SK. 1936 und 1937). Vielmehr spielen verschiedene Faktoren eine Rolle, die teilweise synergetisch wirken.

Die Madentherapie umfasst drei entscheidende Hauptmechanismen: (I) Debridement der Wunde (Nekrolyse); (II) Vernichtung bzw. Eliminierung der Keime und (III) Stimulation der Wundheilung (Sherman RA., 1988 & 2003).

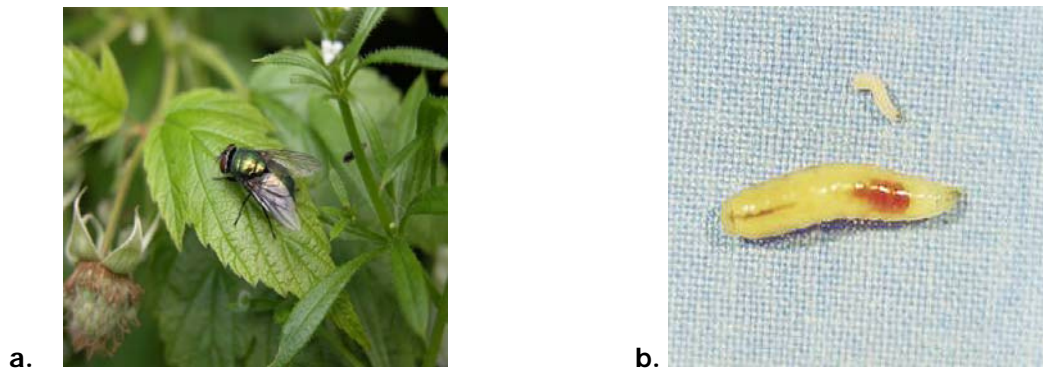


Abbildung 1: (a) Adultes Tier der Schmeißfliege *Lucilia sericata*. Gut zu erkennen ist die charakteristische metallic grüne Farbe. (b) Larven von *Lucilia sericata*. Oben die Maden vor der Applikation auf der Wunde; unten die Larve nach dreitägiger Applikation in der Wunde.

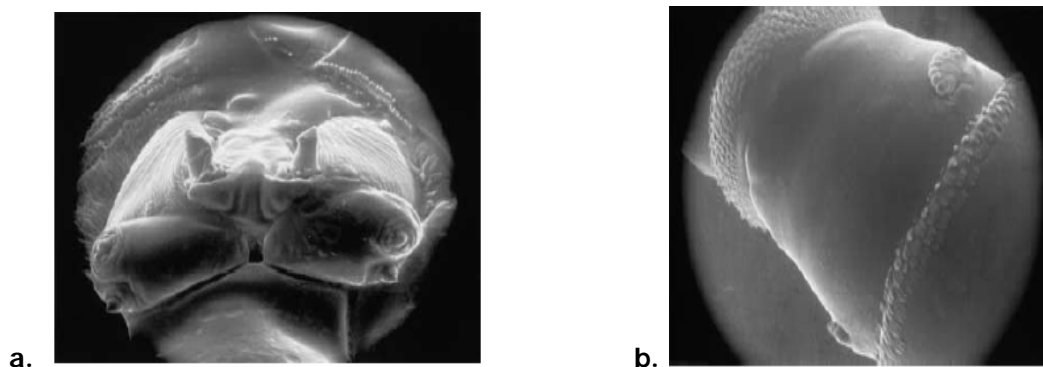


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme vom (a) „Beißapparat“ der Larve und (b) von den zirkulär verlaufenden „Haarkränzen“ die sich an der Außenseite des Körpers von *Lucilia sericata* befinden (Dissemond J. et al., 2002).

1.3.1 Debridement

Nekrosen stellen ein mechanisches Hindernis, in Form eines Fremdkörpers, für die Wundheilung dar. Sie sind von der Blutzirkulation und von der körpereigenen immunologischen Abwehr ausgeschlossen. So bilden sie einen hervorragenden Nährboden für pathogene Organismen. Deshalb ist die Entfernung von nekrotischem Gewebe entscheidend für die Behandlung akuter chronischer Wunden.

Der Mechanismus beim Debridement der Larven beruht auf ihren abgegebenen extrakorporalen Verdauungsenzymen. Diese Verdauungsenzyme spalten nekrotische Belege unter Schonung vitalen Gewebes. Eine Arbeitsgruppe aus Nottingham unter der Leitung von A. Horobin *et al.* (2003) konnte vor drei Jahren beweisen, dass in den Verdauungssekreten der Schmeißfliegenlarve *Lucilia sericata*, das die Autoren als Exkretorisches-Sekretorisches Produkt (ES-Produkt) bezeichnen, Proteasen enthalten sind. Es wurden Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Proteasen und Metalloproteasen gefunden. Ferner konnte experimentell ermittelt werden, dass diese Proteasen spezifische Elemente der extrazellulären Matrix spalten (Horobin A. *et al.*, 2003). Vistness *et al.* (1981) konnten in den Sekreten der Schmeißfliege *Calliphora vicina* Enzyme mit den Eigenschaften der Carboxypeptidasen A und B und der Leucin-Aminopeptidasen nachweisen.

Ein weiteres wichtiges Element für das Debridement ist der Körperbau der Larven. Für die Fortbewegung befinden sich an jedem Segment der Tiere nach hinten gerichtete Hakenkränze und am Mund feine Mundhaken (Abb.2/S.5). Bewegt sich die Larve über die Wundoberfläche, so bewirken die Hakenkränze und Mundhaken ein mechanisches Abkratzen der Wundoberfläche.

Durch das Aufsaugen des abgekratzten und enzymatisch abgebauten Substrates kommt es zu einer rapiden Abnahme des nekrotischen Wundbelages. Zu diesem Effekt kommt noch eine gesteigerte Wundsekretion, die zu einer zusätzlichen Reinigung der Wunde führt.

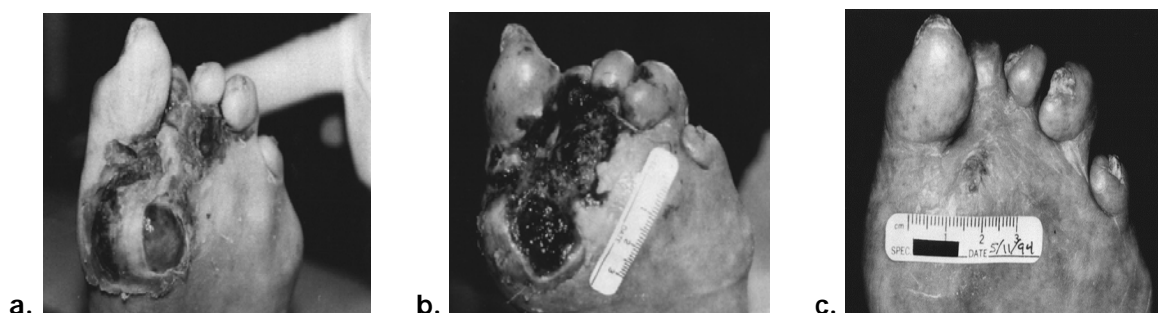


Abbildung 3: Die Bilder zeigen den Verlauf der Behandlung einer diabetischen Fußgangrän mittels der „Madentherapie“. (a) Wunde vor der Therapie; (b) während der Therapie, man sieht deutlich das fortgeschrittene Debridement der Maden; (c) nach der Behandlung, Wunde ist vollständig geheilt (Sherman RA., 2000).

1.3.2 Antimikrobielle Wirkung

Für die Wundheilung ist es eine entscheidende Voraussetzung, dass die Infektion in der Wunde beseitigt ist. Das oben beschriebene Debridement der Larven hat sicherlich eine keimzahlreduzierende Wirkung. Allein durch die gesteigerte Wundsekretion werden die Keime aus der Wunde verstärkt herausgespült. Neben diesen physikalischen Effekten spielen noch andere Faktoren eine Rolle.

Das natürliche Habitat von Schmeißfliegenlarven sind Kadaver, Wunden und Exkremente. Diese Orte sind mit Bakterien kontaminiert. Also müssen die Larven in der Lage sein, diese pathogenen Erreger zu tolerieren oder noch besser abzutöten.

Der physiologische pH-Wert in einer Wunde ist sauer. Es wird postuliert, dass die Larven Ammoniumbikarbonat und Kalziumbikarbonat ausscheiden und so den pH-Wert ins alkalische anheben. Allein dieser Effekt ist, nach Meinung einiger Autoren, als Ursache für die desinfizierende und wundheilungsfördernde Wirkung verantwortlich (Baer WS., 1931; Robinson W. *et al.*, 1939 & 1940).

Greenberg (1968 & 1973) konnte Ende der 60er Anfang der 70er Jahre des vorigen Jahrhunderts feststellen, dass Larven von Schmeißfliegen mit Hilfe des Mikroorganismus *Proteus mirabilis* eine Substanz ausscheiden, die bakterizide Eigenschaft hat. Die Forschergruppe um Erdmann *et al.* (1986) identifizierte die Substanzen als Phenyllessigsäure und Phenylacetaldehyd. Es kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Substanzen für einen Teil der antibakteriellen Wirkung mitverantwortlich sind.

Eine wichtige Entdeckung machte die Forschergruppe um Thomas *et al.* 1999. Als Erste zeigten sie, dass das ES-Produkt der Fliegenlarve *Lucilia sericata* deutliche antibakterielle Wirkung auf Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* hat. Das ES-Produkt war nicht nur gegen *Staph. aureus*, sondern auch gegen *Streptococcus A* und B und *Pseudomonas aeruginosa* aktiv. Das Verdauungssekret der Larven ist sowohl gegen gram-positive (*S.aureus*) als auch gegen gram-negative (*P. aeruginosa*) Bakterien wirksam.

Ein anderer wichtiger Beitrag zur antibakteriellen Wirkung kommt aus dem Bereich des Immunsystems von Insekten. Viele Insekten besitzen zur Abwehr von Erregern spezifische kationische, cysteinreiche Abwehrstoffe, die sog. Insektendefensine (Hoffman JA., 1995). Diese Defensine sind Peptide, die wirksam gegen gram-positive

aber auch gegen gram-negative Bakterien sind. Eine Arbeitsgruppe um die Forscherin Lehane *et al.* identifizierte 1993 aus dem Vorderdarm der Fliegenart *Stomoxys calcitrans* ein Insektendefensin. Es ist anzunehmen, dass ähnliche Peptide mit gleichem oder ähnlichem Effekt auch in den Larven der Schmeißfliege *Lucilia sericata* vorkommen und damit einen zusätzlichen antibakteriellen Wirkungsmechanismus in Gang setzen.

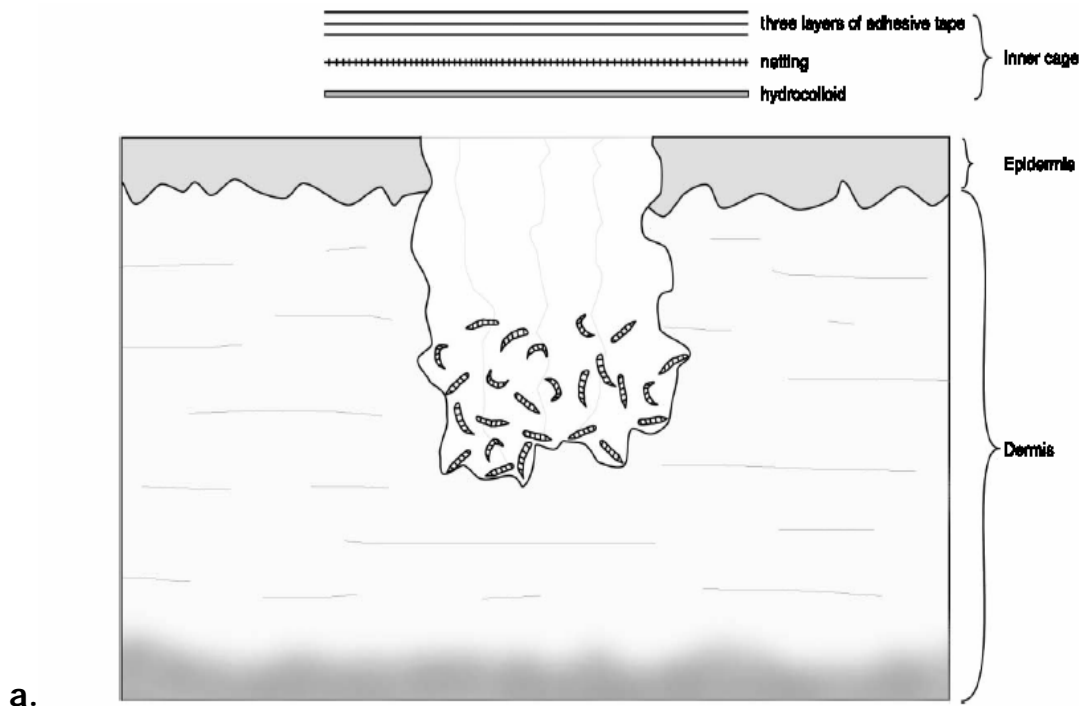


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Madentherapie mit Larven von *Lucilia sericata*. (a) zeigt die Behandlung mit freilaufenden Maden in der Wunde, die man als *free-range* Technik bezeichnet (Steenvoorde P. *et al.*, 2005). Ablauf der Anwendung: Die Wunde wird mit einer sterilen Spüllösung gereinigt. Nach Abtrocknen des Wundrandes erfolgt das Aufkleben eines geeigneten Adhäsivmaterials auf die gesunde Haut des Wundrandes. Die Wundgaze wird aus der Verpackung genommen und auf eine sterile, saugfähige Unterlage gelegt. Das Röhrchen mit den Fliegenmaden wird geöffnet und mit ca. 10 ml einer sterilen Kochsalzlösung befüllt. Die Flüssigkeit wird mit den Fliegenmaden aus dem Röhrchen auf die Wundgaze gegossen. Dabei wird die Flüssigkeit von der Unterlage aufgenommen. Die Wundgaze mit den Fliegenmaden wird von der Unterlage genommen und so auf das Adhäsivmaterial gelegt, dass sich die Fliegenmaden zwischen Wundoberfläche und Wundgaze befindet. Sie sind so in einem Käfig eingeschlossen (Verhinderung der Madenmigration). Die Wundgaze wird mit ein bis zwei luftdurchlässigen Mullkompressen bedeckt, die nur bei trockenen Wundverhältnissen leicht angefeuchtet werden sollten. Abschließend werden die Kompressen mit einem Pflasterstreifen oder einer Mullbinde locker fixiert.

1.3.3 Stimulation der Wundheilung

Die schnelle Heilung von chronischen Wunden nach Applikation von Larven der Gattung *Lucilia sericata* und die schnelle Entwicklung von Granulationsgewebe war eine spektakuläre Beobachtung. Die Stimulation der Wundheilung muss also durch

eine Substanz oder ein Molekül im larvalen Sekret erfolgen. Einige Forscher vermuten, dass die Tiere Allantoin und 2,5-Dixo-4-imidiazolidinyl-Harnstoff ausscheiden, die als Ursache der raschen Wundheilung angesehen werden (Robinson W., 1940).

In einer *in-vitro*- Studie konnte nachgewiesen werden, dass Fliegenlarven von *Lucilia sericata* spezielle Zytokine sezernieren. Nachgewiesen werden konnte IL-10 und IFN β , die wichtige Faktoren zur schnellen Granulationsgewebsbildung sind (Mumcuoglu KY. *et al.*, 2000/ Vortrag auf der 5-ten internationalen Konferenz der Biotherapie).

Unter dem Einfluss von Fliegenlarven und deren Ausscheidungen kommt es zu einer äußerst raschen Auffüllung der Wunde durch Granulationsgewebe, zu einer Epithelisierung der Wundoberfläche und zu einer rasanten Wundverkleinerung durch Wundkontraktion (Fleischmann *et al.*, 1999 & Grassberger *et al.*, 2003).

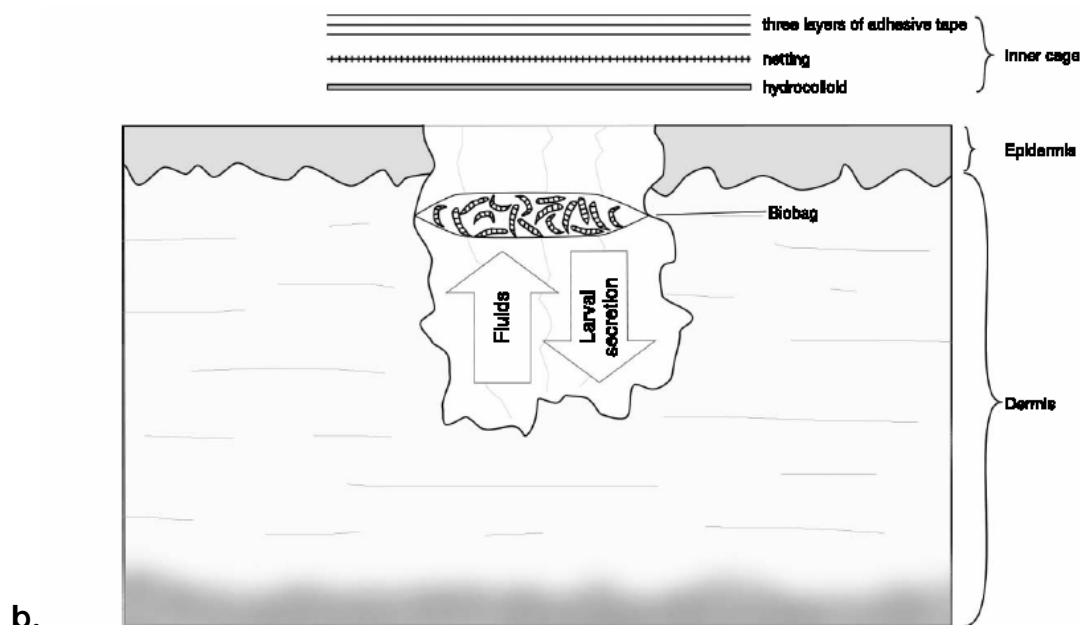


Abbildung 4: In (b) ist die Therapie mit einem *Biobag* dargestellt. Diese Behandlungsmethode wird als *contained* Technik bezeichnet (Steenvoorde P. *et al.*, 2005). Bei dieser Technik befinden sich die Larven in einem PVA- (Polyvinyl Alkohol) oder netzartigem Säckchen. Der netzartige *Biobag* verhindert zum einem, dass die Larven die Wunde verlassen und zum anderen ermöglicht er trotzdem den Larven, mit der Wundoberfläche in Kontakt zu treten. Damit kommt das larvale Exkretions-Sekretions-Produkt (ES-Produkt) mit der Wundoberfläche in Kontakt und kann seine Wirkung entfalten. Der *Biobag* wird einfach auf die Wundoberfläche aufgelegt und anschließend wird die Wunde wie unter (a) beschrieben verschlossen. Für beide Behandlungsmethoden werden sterile Larven verwendet. Man lässt die Maden für gewöhnlich 72 Stunden in der Wunde. Nach dieser Zeit werden die Larven entfernt und die Wunde wird zweimal mit neuen Larven für jeweils 72 Stunden behandelt. Die verwendete Fliegenmaden-Menge hängt von der jeweiligen Wunde ab. Als Faustregel gilt: 5-10 Maden pro cm² Wundoberfläche. Die käuflich zu erwerbenden *Biobags* enthalten je nach Größe der *Bags* zwischen 100-250 Fliegenlarven. Die Maden sind bei beiden Methoden für das Debridement der Wunde, die Vernichtung der Keime und die Stimulation der Wundheilung verantwortlich.

1.4 Antibakterielle Resistenz am Beispiel von *Staphylococcus aureus*

Anfang der 70er Jahre des 20. Jahrhundert war man davon überzeugt, dass man alle bakteriellen Infektionen mit den entsprechenden Antibiotika erfolgreich behandeln kann. Diese optimistische Zukunftsperspektive wurde abrupt zerstört durch das Auftreten von Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika. Insbesondere die pathogen Erreger *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* und *Mycobacterium tuberculosis* entwickelten raffinierte Resistenzmechanismen. Die Gründe für das Entstehen von Resistenzen sind vielfältig. Zu den Gründen gehört der massenhafte und nicht notwendige Einsatz von Antibiotika als Wachstumsverstärker im Tierfutter (sog. Kraftfutter) und die Globalisierung, die dazu beiträgt, dass die Erreger nicht mehr an geographische Hindernisse gebunden sind. Insbesondere sind gram-positive Erreger, dazu zählen in erster Linie *pneumokokki*, *enterokokki* und *staphylokokki*, gegen fast alle Antibiotika resistent und werden deshalb als *Multidrug resistente* Pathogene bezeichnet. *Staph. aureus* ist besonderes pathogen aufgrund seiner starken Virulenz, der Fähigkeit,

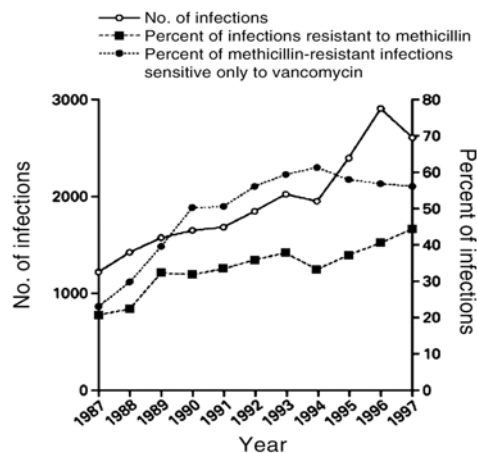


Abbildung 5: *Staph. aureus* Infektionen aus einem Zeitraum von 1987-1997. Die Erreger wurden getestet auf die Sensibilität gegenüber folgenden antibiotischen Substanzen: Gentamycin, Tobramycin, Amikacin, Erythromycin und Vancomycin (Lowry FD. 1998).

eine große Bandbreite von lebensgefährlichen Infektionen auszulösen, und seiner Fähigkeit, sich perfekt an die sich veränderten Umweltbedingungen anzupassen. Schon heute sterben 20-40% aller Patienten, die mit *Staph. aureus* infiziert sind, obwohl ausreichende Antibiotika zu Verfügung stehen (Mylotte JM. *et al.*, 1987). Darüber hinaus sind *Staph. aureus* Stämme verantwortlich für die meisten nosocomialen (= im Krankenhaus erworbene) Infektionen (Diekeman DJ. *et al.*,

2001). *Staph. aureus* Erreger sind heute in zunehmender Masse resistent gegen eine große Zahl von Antibiotika, wie z. B. Gentamycin, Erythromycin, Penicillin oder Vancomycin. Die unvermeidliche Folge davon ist eine Abnahme der Effektivität der antibiotischen Wirkstoffe, die zur Behandlung von lebensgefährlichen Infektionen notwendig sind (Abb.5/S.10) (Lowry FD., 1998).

1.4.1 Penicillin-Resistenz

Penicilline sind β -Laktamantibiotika und waren die ersten Antibiotika, die industriell hergestellt worden sind. Die Penicilline wurden erfolgreich gegen eine große Anzahl von bakteriellen Infektionen eingesetzt. Ihre Blütezeit hatten sie in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts. Vor 40-45 Jahren waren schon 80% der *S. aureus*- Stämme resistent gegen Penicillin. Der Grund dafür liegt in der Deaktivierung des Penicillins durch das Enzym Penicillinase, das von den *S. aureus* exprimiert wird (Kirby WMM. *et al.*, 1944). In den folgenden Jahren wurde der Resistenzmechanismus aufgeklärt. Die Resistenz der Staphylokokken gegen Penicillin wird hervorgerufen durch das Gen *blaZ*, das für die β -Laktamase codiert. Bei Anwesenheit von β -Laktamantibiotika wird das extrazelluläre Enzym exprimiert. Es spaltet durch Hydrolyse den β -Laktamring, was zur Deaktivierung der β -Laktamantibiotika führt. *blaZ* ist unter der Kontrolle von zwei regulatorischen Genen, dem Antirepressor *blaR1* und dem Repressor *blaI* (Kernodel DS., 2000). Verschiedene experimentelle Untersuchungen zeigten, dass der verantwortliche Signaltransduktionsweg für die β -Laktamase-Synthese durch eine autokatalytische Aktivierung der beiden regulatorischen Proteine BlaR1 und BlaI ausgelöst wird (Zhang HZ. *et al.*, 2001) (Abb.6a/S.12).

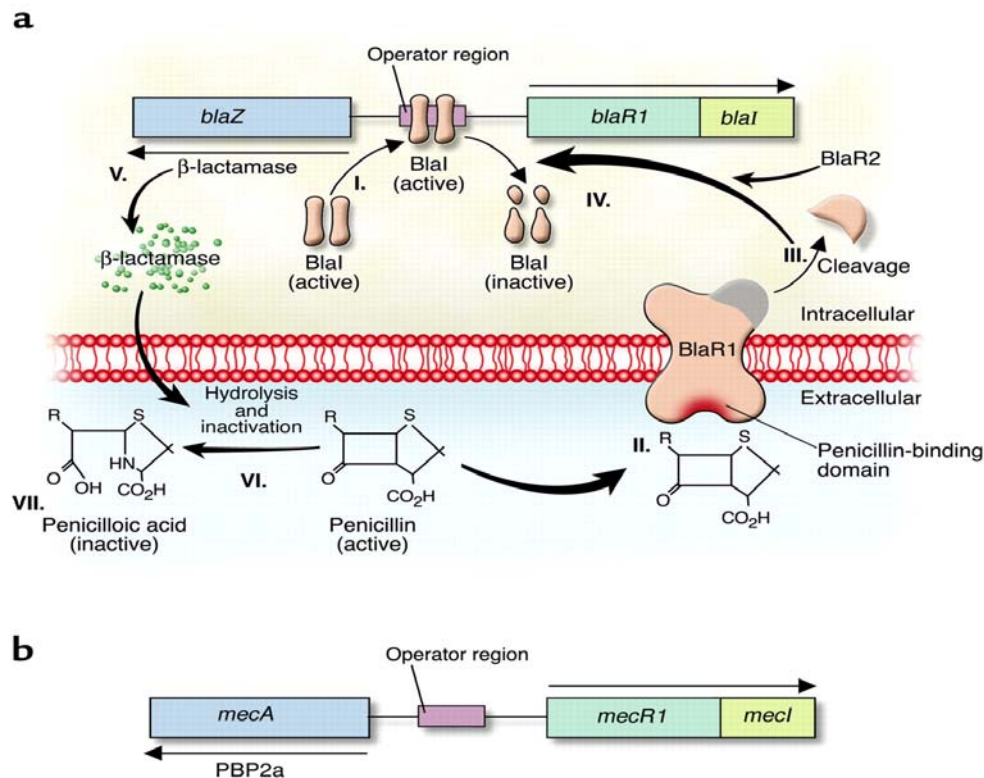


Abbildung 6a: Induktion der Staphylokokken β-Laktamase Synthese bei Anwesenheit eines β-Laktamantibiotikums (Penicillin). (I) Das DNA Bindungsprotein BlaI bindet an die Operonregion. RNA Transkription von *blaZ* und *blaR1*. (II) Die Bindung von Penicillin an das Transmembransensor Protein BlaR1 stimuliert die autokatalytische Aktivierung von BlaR1 (III-IV) Aktiviertes BlaR1 spaltet direkt oder indirekt BlaI in inaktive Fragmente. Dies führt zur Transkription von *blaZ* und *blaR1*. (V) *blaZ* enthält die Information für das extrazelluläre Enzym β-Laktamase. (VI) Hydrolyse des β-Laktamrings von Penicillin durch die β-Laktamase. (VII) Inaktivierte Form des Penicillins (b) Mechanismus der *S. aureus* Resistenz gegen Methicillin. Die Synthese von PBP2a verläuft im Prinzip genauso wie für β-Laktamase. Die Anwesenheit von β-Laktamantibiotika induziert die Synthese von MecR1. Die MecR1 inaktiviert MecI, die Synthese von PBP2a findet statt. MecI und BlaI haben coregulierende Wirkung auf die Expression von PBP2a und β-Laktamase (Lowry FD., 2003).

1.4.2 Methicillin-Resistenz

Das Antibiotikum Methicillin wurde Anfang der 60er Jahre als Ersatz-Präparat für Penicillin eingeführt. Es gehört, wie das Penicillin, zu den β-Laktamantibiotika. Die Methicillin-Resistenz erfordert das Vorhandensein des *mecA* Gens (Kernodel DS. 2000 und Chambers HF. 1997). Abbildung 6b (S.12) zeigt den schematischen Mechanismus der Methicillin Resistenz. *mecA* ist verantwortlich für die Synthese des *Penicillin-bindenden Protein 2a* (PBP2a), einem 78 KDa Protein (Song MD. *et al.*, 1987). Der Methicillin-Resistenz liegt eine strukturelle Veränderung des membrangebundenen Penicillin-Bindungsproteins der Bakterien zugrunde. Durch Mutationen in den Regulargenen *mecI* und *mecR1* und dem Promotorbereich des PBP kodierenden *mecA* sind Staphylokokken mit exprimierten PBP2a entstanden, die

Resistenz gegen Methicillin auslösen. Des Weiteren tragen auch die *femAB*-Genprodukte (*factor essential for methicillin resistance*) und β -Laktamase-Operon zur Expression der Methicillin-Resistenz bei (Chambers HF., 1997).

1.4.3 Vancomycin-Resistenz

Vancomycin ist ein Glykopeptidantibiotikum und gehört zu den sog. Reserveantibiotika. In den letzten Jahren wurden vermehrt *S. aureus* Stämme beschrieben, die eine Resistenz gegen Vancomycin aufwiesen. Dieser Befund ist alarmierend, da Vancomycin als eine letzte Waffe gegen multiresistente Bakterien angesehen wird. Man unterscheidet zwischen einer *Vancomycin intermediate-resistant S. aureus* (VISA) und einer *Vancomycin resistant S. aureus* (VRSA) Resistenz. Folglich gibt es auch zwei Formen des Resistenzmechanismus. Bei VISA Stämmen kommt es zu einer zusätzlichen Synthese von Peptidoglykanen, die eine zunehmende Anzahl von D-Ala-D-Ala Resten aufweisen. Durch die Bindung von Vancomycin an dieses D-Ala-D-Ala Motiv wird verhindert, dass Vancomycin an sein eigentliches Zielmolekül binden kann (Sieradzki K. *et al.*, 1999).

VRSA Resistenz ist das Ergebnis eines Konjugations-Transfers des *vanA* Operons, von Vancomycin resistenten *Enterococcus faecalis* (Showsh SA. *et al.*, 2001). Das *vanA* Operon erlaubt den Bakterien eine Veränderung der terminalen Peptidsequenz von D-Ala-D-Ala zu D-Ala-Lac. Das neue Dipeptid reduziert dramatisch die Affinität zu Vancomycin (Murray BE., 2000). In Anwesenheit von Vancomycin kann die Zellwandsynthese ablaufen (Abb.7/S.14).

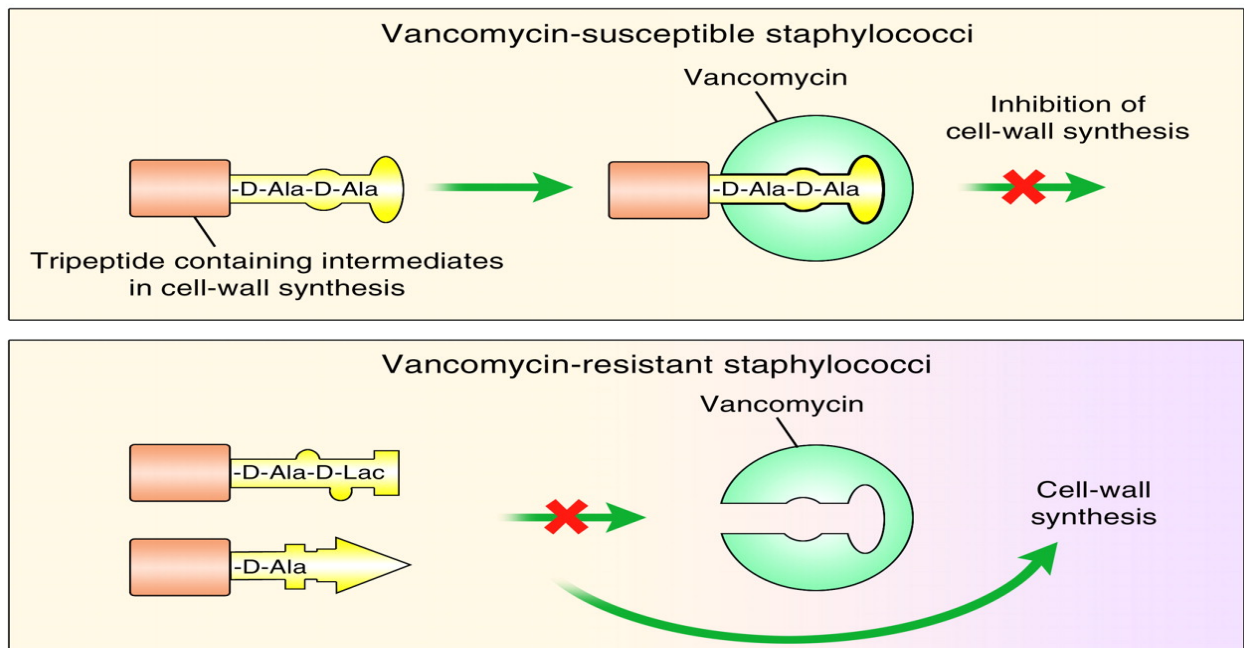


Abbildung 7: Darstellung des Resistenzmechanismus für VRSA Stämme. Verantwortlich für die Resistenz ist das *vanA* Operon von *E. faecalis*. Ein neues Dipeptid am Zellwand-Precursor führt zu einer drastischen Reduzierung der Affinität zu Vancomycin (Murray BE, 2000).

1.5 Antimikrobielle Peptide

Antibakterielle Peptide sind evolutionär gesehen vorzügliche Waffen gegen Mikroorganismen (Zasloff, 2002). Ihre große Verbreitung im Tier- und Pflanzenreich spricht dafür, dass sie eine grundlegende Rolle in der erfolgreichen Evolution von komplexen multizellulären Organismen spielen. Tierische und auch pflanzliche Organismen haben ein großes Spektrum an AMP, die gegen eine ganze Reihe von Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilzen, Viren und Protozoen, wirken. Antimikrobielle Peptide (AMP) kann man als die „Achillesferse“ der Bakterien betrachten, da sie spezifisch die Zellmembran von Bakterien angreifen.

Historisch betrachtet ist die Forschung an AMPs sehr jung. Erst vor gut 25 Jahren wurde aus der Hämolymphe der Seidenspinnerlarve das erste AMP isoliert und charakterisiert. Dabei handelte es sich um ein kationische Peptid aus 37 Aminosäuren das von seinem Entdecker Cecropin genannt wurde (Steiner H. *et al.*, 1981). Das Cecropin-Peptid ist aktiv gegen zwei gram-negative Bakterien: *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* (*E. coli*). In den folgenden Jahren wurden weitere

Einleitung

Cecropine entdeckt und es wurde klar, dass AMPs eine entscheidende Rolle im Immunsystem der Insekten spielen.

In den letzten beiden Jahrzehnten wurde eine ganze Reihe von AMPs in verschiedenen eukaryontischen Organismen entdeckt, die antibakteriell auf ein breites Spektrum von Bakterien wirken. Bis heute sind 500-600 Peptide identifiziert, die nachweislich gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen wirken. Jedes Peptid hat ein Wirkungsspektrum und ist aktiv gegen eine unterschiedliche Anzahl von Erregern. Deshalb erfolgt die Katalogisierung nach dem Aufbau der Sekundärstruktur der Peptide. Der italienische Biochemiker A. Tossi hat eine Datenbank entwickelt, und über 500 Peptide nach ihrer Struktur katalogisiert sind (<http://www.bbcm.univ.triest.it/tossi/antimic.html>).

Danach unterscheidet man im wesentlichen zwischen drei Klassen von AMPs:

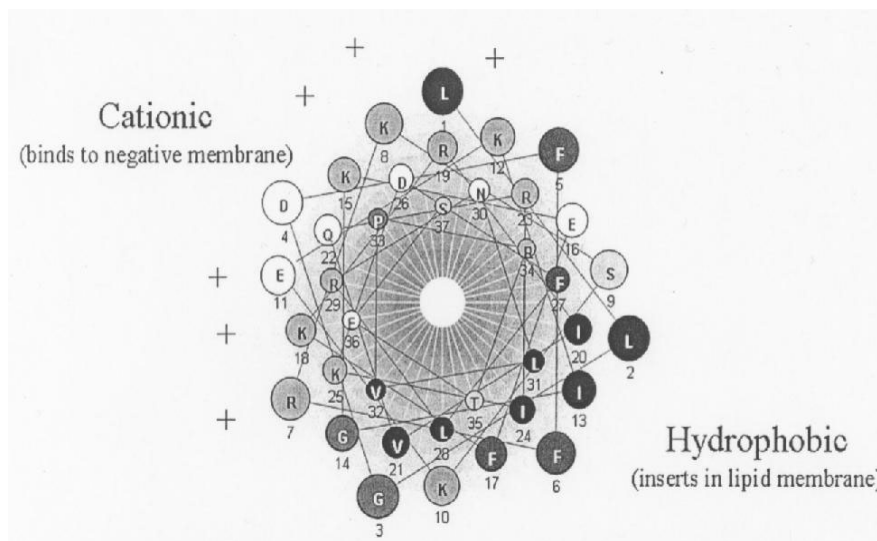


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aminosäureverteilung in der alpha-helikalen Struktur von LL-37. Die meisten positiv geladenen Aminosäuren befinden sich auf einer Seite des Moleküls. Während die gegenüber liegende Seite des Peptids hydrophob ist. Die amphipathische Struktur findet man bei vielen kationisch geladenen antimikrobiellen Peptiden (Izadpanah A. *et al.*, 2005).

Die erste Klasse sind die sog. linearen Peptide, die sich dadurch auszeichnen, dass sie keine Cysteine enthalten und eine α -helikale amphipathische Struktur aufweisen. Als Beispiele wären hier die Cecropine, aber auch das humane Cathelicidin LL-37 zu nennen. 80-90% der bis jetzt entdeckten Peptide gehören dieser Klasse an. (Bomann H., 2003). Abbildung 8 (S.15) zeigt ein solches Peptid am Beispiel von LL-37. Auffällig an dieser Klasse von Peptiden ist die Tatsache, dass sie eine kationische Seite haben und entgegengesetzt eine hydrophobe Seite. Die amphipathische Organisation

erlaubt dem Peptid, sich mit der kationischen Seite an die negativ geladene Bakterienmembran zu binden, während sich die hydrophobe Seite in der Lipidschicht der Membran verankert (Izadpanah A. *et al.*, 2003).

Die zweite Klasse von antibakteriellen Peptiden ist durch das Vorhandensein von 6 Cysteinresten, die drei Disulfidbrücken ausbilden, charakterisiert. Solche Peptide haben eine β -Faltblattstruktur. Beispiele wären hier die α -Defensine und die β -Defensine (HBD), die vor allem in der Haut des Menschen vorkommen. Hier wirken sie gezielt gegen Hefezellen, gram-positive und gram-negative Bakterien. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass das humane β -Defensin 3 (HBD3) *in-vitro* eine starke bakterizide Wirkung gegenüber MRSA demonstriert (Schröder JM., 2002). Die antimikrobielle Wirkung wird durch eine Interaktion mit der Bakterienmembran vermittelt.

Die dritte Klasse der antibakteriellen Peptide umfasst Peptide mit einer ungewöhnlichen Peptidsequenz. Solche Peptide sind reichhaltig an den Aminosäuren Arginin, Tryptophan und Prolin. PR-39 und Indolicidin sind Beispiele für die dritte Klasse der Peptide (Bomann H., 2003). Abbildung 9 (S.17) zeigt eine Übersicht der drei Hauptklassen von AMPs.

Alle Peptide mit antibakterieller Wirkung stammen von einem sog. Propeptid ab, das eine Signalsequenz enthält. Die posttranslationale Modifikation der Propeptide beinhaltet nicht nur eine proteolytische Spaltung, sondern in einigen Fällen auch eine Glykosylierung oder carboxy-terminale Amidierung und Aminosäure Isomerisierung (Simmaco M. *et al.*, 1998). Viele Peptide werden durch proteolytische Spaltung aus größeren Proteinen prozessiert, so etwa das Buforin II aus Histon 2A oder das Laktoferricin aus Laktoferrin (Kim HS. *et al.*, 2000 & Ulvatne H. *et al.*, 2001).

Eine wesentliche Besonderheit der AMPs liegt in ihrer Spezifität. Als Beispiel wäre hier das humane Cathelicidin LL-37 zu nennen. LL-37 findet man beim Menschen sowohl in der Haut als auch im Schweiß. An beiden Orten wirkt es gegen unterschiedliche Mikroorganismen. In Abbildung 10 (S.18) ist die enzymatische Prozessierung des Cathelicidin LL-37, die notwendig für die Aktivierung und Funktion ist, dargestellt. Die Prozessierung von LL-37 wird durch das Enzym Proteinase 3 katalysiert. Das Ergebnis der Spaltung ist die Cathelin Domäne und die antimikrobielle Peptid (AMP) Domäne (Sorensen OE. *et al.*, 2001). Beide sind aktiv, wobei die Cathelin-Domäne entweder als Protease-Inhibitor oder antibakteriell wirkt.

<u>α-Helical peptides without cysteine</u>	
Human LL-37	LLGDFFRKS K EKIGKEFKRI VQRIKDFLRN LVPRT ES
Mice CRAMP	ISRLAGGLLR KGGEKIG E KL KKIGQKIKNF FQKLVPQ P
Ascaris Cecropin P1	SWLSKTAKKL ENSAKKR ISE GIAIAIQGGP R
Pig VIP (45-72)	HSDAVFTDNY TRLRQMA V K KYLNSILN*
Frog Megerin 2	GIGKFLHSA K KFGKAFVGEI MNS
CA(1-7) M(2-9)	KWKL F KKIGA VLK V L

<u>Peptides with three disulphide bonds</u>	
Human α -defensin HNP-1	AC Y CRIPAC I AGERR Y GT C I YQGR L WAF C C
Human β -defensin HBD-2	GIGDPV T CL K SGAICH P V F C PRRY K QIG T C GLPG T K C CK K P
Human β -defensin HBD-3	IINT L Q K Y C RVRG G CA V L SCL P K E Q I G K C STR G R K C C RR K K

<u>Peptides rich in proline or tryptophane</u>	
Pig PR-39	RRR R PP P Y L P RPR P PP F FP RLPP R IP P GF PPR F PP R FP*
Cow Indolicidin	IL P W K W P W P WRR*

Abbildung 9: Übersicht über die drei Hauptklassen von antimikrobiellen Peptiden. Zu sehen sind die (1) die α -helikalen Peptide ohne Cysteinrest; (2) Peptide mit drei Disulfidbrücken und (3) Peptide, die reich an Prolin und Tryptophan sind (Bomann H., 2003).

Eine weitere Prozessierung des antibakteriellen Peptids ist durch eine weitere Serinprotease möglich. Der beschriebene Vorgang führt zu neuen, unterschiedlichen Peptiden mit differenziertem Wirkungsspektrum gegen verschiedene pathogene Erreger.

1.5.1 Die Regulationsmechanismen

Antibakterielle Peptide repräsentieren einen integralen Teil des angeborenen Immunsystems mit breiter antimikrobieller, antifungizider und antiviraler Potenz sowohl bei Insekten als auch beim Menschen (Schröder JM., 2002). Eine wichtige Erkenntnis war, dass AMPs induzierbar sind, d.h., dass Ihre Synthese durch spezifische Stimuli gesteuert werden kann. Die Induktion kann sowohl von der Art der Mikroorganismen als auch von deren Quantität abhängig sein. So wird z. B. vermutet, dass die Haut des Menschen ein Erkennungssystem besitzt, das pathogene von nicht pathogenen Erregern differenzieren kann und dementsprechend reagiert (Zasloff M., 2002).

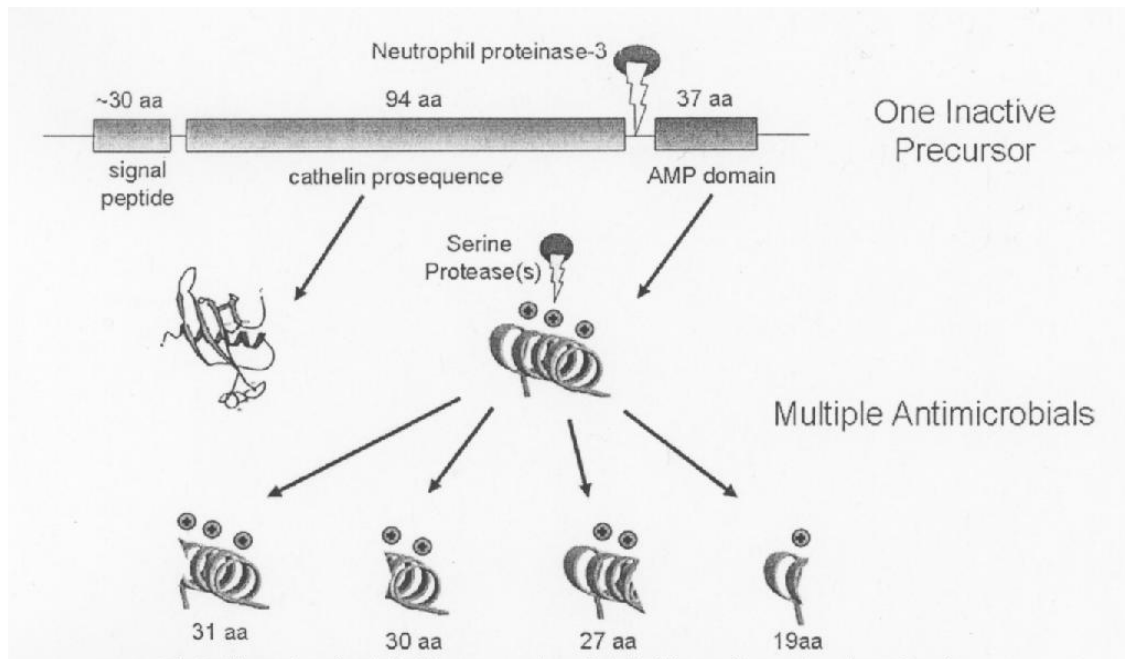


Abbildung 10: Darstellung des Cathelicidin Genproduktes. Cathelicidine werden als großes, inaktives Propeptid exprimiert. Serinproteasen wie die Proteinase 3, spalten den Cathelin-Precursor in eine Cathelin Domäne und eine antibakterielle Peptid Domäne. Eine weitere Prozessierung des antibakteriellen Peptids ist möglich durch weitere Serinproteasen. Eine Vielzahl von neuen Peptiden mit unterschiedlichen Wirkungsspektren entsteht (Izadpanath A. *et al.*, 2005).

Trotzdem stellt sich die Frage, auf welche Art und Weise die Immunabwehr mit antimikrobiellen Peptiden reguliert wird. Um den Regulationsmechanismus aufzuklären, wurden mehrere experimentelle Studien mit dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Das Ergebnis der Untersuchungen war die Feststellung, dass der Abwehrmechanismus in *D. melanogaster* ein facettenreicher Prozess ist. Eine septische Verletzung induziert eine proteolytische Kaskade in der Hämolymphe, eine Abwehrreaktion der Hämocyten und die Synthese und Freisetzung von AMPs (Hetru C. *et al.*, 2003). Der Fettkörper von Insekten, ein Äquivalent der Säugetierleber, spielt eine zentrale Rolle bei der immun-induzierten Synthese und der Freisetzung von AMPs in die Hämolymphe (Bulet P. *et al.*, 1999).

Die Abbildung 11 (S.19) zeigt den Fettkörper und die 7 Peptide, die in ihm produziert werden und in die Hämolymphe freigesetzt werden. Drosomycin und Metchnikowin sind essentiell bei der Bekämpfung von Pilzinfektionen, während die Defensine gegen gram-positive Bakterien wirken.

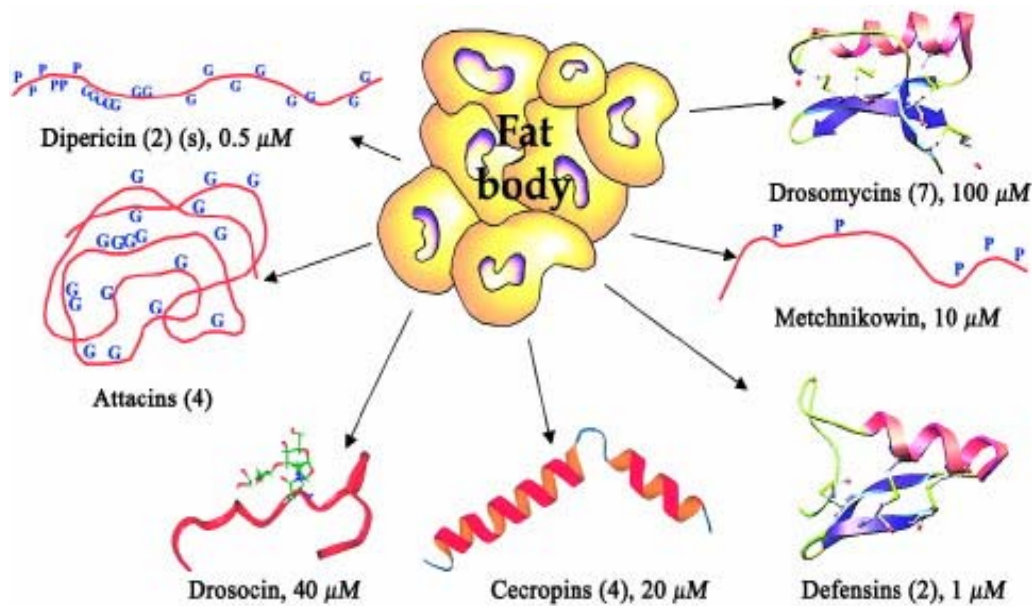


Abbildung 11: Der Fettkörper von *Drosophila melanogaster* produziert sieben antimikrobielle Peptide (oder Peptidfamilien). Drosomycin, Metchnikowin, Defensine, Cecropine, Drosocin, Attacin und Diptericin wurden bis heute biochemisch isoliert und identifiziert (Hetru C. *et al.*, 2003).

Cecropine, Drosocin, Attacin und das Diptericin wirken gegen gram-positive und gram-negative Bakterien (Ekengren S. und Hultmark D., 1999). Der Wirkmechanismus dieser Moleküle ist noch nicht komplett verstanden und ist vermutlich bis jetzt einzigartig.

In *D. melanogaster* gibt es zwei Signaltransduktionswege die den systematischen antimikrobiellen Abwehrmechanismus regulieren; der Toll- und der Imd-*Pathway*.

Toll-*Pathway*

Der Toll-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen Infektion mit gram-positiven Bakterien und gegen Pilzinfektionen (Abb.12/ S.20). Durch das Eindringen von Erregern in den Organismus werden in der Hämolymphe Proteasen aktiviert, die das Polypeptid *Spaetzle* proteolytisch abbauen und es dadurch aktivieren. Das prozessierte *Spaetzle* interagiert nun mit der extrazellulären Leucin-reichen Domäne des Tollrezeptors. Auf der intrazellulären Seite des Rezeptors entsteht ein Rezeptor-Adapter Komplex, der die drei *Death*-Domänen der Proteine *DmMyd88*, *Tube* und der Kinase *Pelle* enthält. Die Proteine *Tube* und *Pelle* lösen ein Signal aus, das zur Phosphorylierung des Proteins *Cactus* führt. Aufgrund der Phosphorylierung zerfällt *Cactus* und das Protein *DIF* wird freigesetzt.

DIF gelangt, auf bisher noch unbekanntem Weg, in den Nucleus und löst dort die Expression von Drosomycin aus.

Drosophila besitzt noch neun weitere Toll-Rezeptoren mit einer eigenen TIR (Toll-IL Rezeptor) Domäne. Man nimmt an, dass alle dieser Rezeptoren an der Expression von AMPs beteiligt sind. In Zellkulturexperimenten konnte man nachweisen, dass die Rezeptoren Toll 5 und 9 an der Expression von Drosomycin beteiligt sind (Kambris Z. *et al.*, 2002 & Ooj JY. *et al.*, 2002).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass in der Hämolymphe von *Drosophila* ein Proteoglykan-bindendes Protein mit dem Namen *semI* lokalisiert ist. *semI* scheint an der Aktivierung des Toll-Signalweges entscheidend beteiligt zu sein. Allerdings ist *semI* nur aktiv, wenn es zur Invasion von gram-positiven Bakterien kommt (Michel T. *et al.*, 2001). Es ist unbekannt, inwiefern *semI* an der proteolytischen Kaskade von *Spaetzle* beteiligt ist.

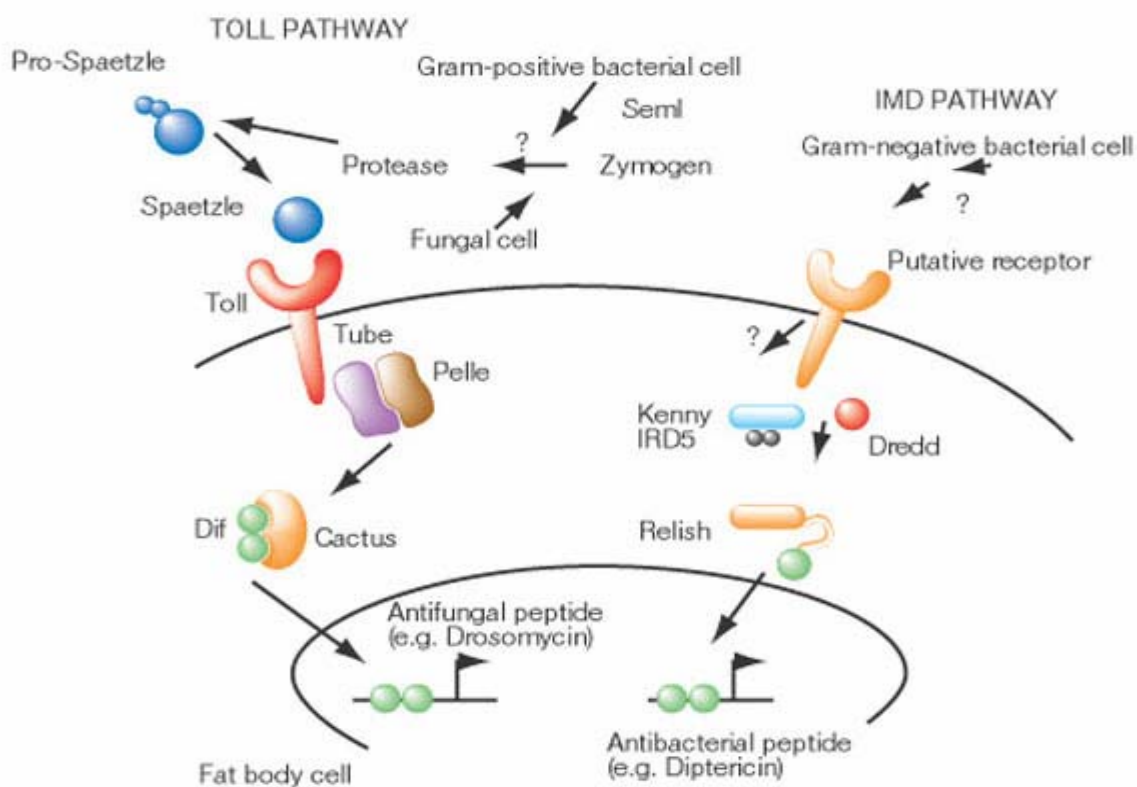


Abbildung 12: Darstellung der Toll (links) und *Imd* (rechts) Signaltransduktionswege. Die Signalkaskade findet im Fettkörper von *D. melanogaster* statt und führt zur Aktivierung von antibakteriellen Peptidgenen. Das proteolytische System für die Spaltung vom Polypeptid *Spaetzle* ist unbekannt. Die Existenz eines Rezeptors im *Imd* Kreislauf ist eine Annahme (Zasloff M., 2002).

Imd-Pathway

Die Imd Signalkaskade wird primär bei einer Infektion von gram-negativen Bakterien aktiviert, die zur Freisetzung von Diptericin oder Drosocin führt (Abb.12/S.20). Der Transmembranrezeptor für die Kaskade ist nicht identifiziert. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob der Rezeptor direkt durch eine Interaktion mit den Bakterien aktiviert wird oder durch das Endprodukt einer katalytischen Kaskade.

Das *Imd* Protein interagiert mit *dfADD* und dem Caspase-8 homolog *DREDD* (Naitza S. *et al.*, 2002). Eine zentrale Komponente der Signalkaskade ist der *IKK* (I κ B Kinase) Signalosomähnliche-Komplex. Die Aktivierung dieses Komplexes erfordert eine Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) (Vidal S. *et al.*, 2001). Das aktivierte Signalosome führt zur Spaltung des Proteins *Relish* durch eine nicht näher beschriebene Protease. Gespaltenes *Relish* aktiviert die Transkription von Genen, die z.B. für Diptericin kodieren.

Eine Überexpression der *Imd* Gene führt in transgenen Fliegen zu einer Apoptose der Fettkörperzellen (De Gregorio *et al.*, 2001).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Aufgabe der vorliegenden experimentellen Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung antibakterieller Wirkstoffe der Fliegenmade *Lucilia sericata*, die eine Rolle in der „biochirurgischen“ Wundheilung spielen könnten. Es sollten drei experimentelle Ansätze verfolgt werden:

(I)

Ausgehend von der Annahme, dass antibakterielle Peptide/Proteine nicht nur in der Hämolymphe der Fliegenmaden, sondern auch im Speichelsekret der Tiere enthalten sein könnten, sollten Speicheldrüsensekrete von *Lucilia sericata* auf ihre bakterizide Wirkung getestet werden.

(II)

Unter der Annahme, dass das Mischprodukt aus Sekret und Exkret (ES-Produkt) die wirkaktiven Komponenten enthält bzw. diese darin generiert werden, sollte das Gesamtproteom des ES-Produktes durch 2D-Gelelektrophorese/ Peptidmassenkartierung in der Massenspektrometrie charakterisiert werden, um (a) Proteasen, (b) Wachstumsfaktoren und (c) Propeptide zu identifizieren, die als Vorläufer antibakterieller Peptide fungieren könnten.

(III)

Ein dritter Ansatz verfolgte das Ziel, antibakteriell wirksame Peptide im Ultra-filtrat des ES-Produktes (<10KDa) nachzuweisen, durch mehrdimensionale Chromatographie zu reinigen und durch massenspektrometrischen Techniken zu sequenzieren.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprechen analytischem Reinheitsgrad. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit *Aqua bidest* angesetzt. Im folgenden Text werden für häufig genannte Verbindungen gebräuchliche Abkürzungen verwendet. Die ausführlichen Bezeichnungen befinden sich im Anhang unter Abkürzungen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Bioscience, Buckinghamshire, GB

Millipore; Eschborn, D

Pharmacia Biotech, Freiburg, D

C. Roth, Karlsruhe, D

E. Merk, Darmstadt, D

Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

Fluka, Deisenhofen, D

J.T.Baker, Phillipsburg, NL

Vivascience, Hannover, D

Bio-Rad, Hercules, CA

AppliChem, Darmstadt, D

VWR, Sankt Augustin, D

Bruker, Bremen, D

Roche, Basel, Schweiz

Eppendorf, Hamburg, D

2.2 Gewinnung des Exkretion-Sekretion-Produktes von *Lucilia sericata*

Bezug der Larven von *Lucilia sericata*

Larven aus dem Zweiten Larvenstadium von *Lucilia sericata* wurden steril von der Firma Biomonde GmbH aus Barsbüttel (Hamburg) bezogen.

Gewinnung des Exkretion-Sekretion-Produktes (ES-Produkt)

Die Larven wurden in sterilem *Aqua bidest* (200 µl pro g Larven) in einem 10x10 cm großen Container, für zwei Stunden bei 27°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die sterile Flüssigkeit umgefüllt, steril filtriert und für 15 Minuten, bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Lösung wurde anschließend aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

2.3 Antibakterielle Assays

Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme von *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* Xen36 und *E. coli* ATCC 25322 wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt. Die weiter unten aufgeführten antibakteriellen Tests wurden im **Institut für Medizinische Mikrobiologie** durchgeführt.

Colony-forming unit (CFU) Assay

Eine Kolonie der entsprechenden Bakterienstämme wurde in 5 ml Müller-Hinton-Bouillon Medium (MHB) in einem 12 ml Snap-Cap-Röhrchen angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das ES-Produkt in MHB-Medium aufgenommen. Ein Milliliter der Bakterienkultur wurde nun zweimal mit MHB-Medium gewaschen und auf eine Konzentration von 2×10^6 Bakterien pro Milliliter eingestellt. Im nächsten Schritt wurde eine Verdünnungsreihe in 96er-Well-Platten mit „konischen“ Wells erstellt. Die Probe wurde von einer 1:1 bis zu 1:128 Verdünnung in MHB-Medium verdünnt. 50 µl der jeweiligen Konzentration wurden mit 50 µl aus dem

entsprechenden Bakterienstamm vereinigt und über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50 µl aus der jeweiligen Konzentration entnommen und auf MHB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am dritten Tag wurden die Kolonien auf den jeweiligen Platten ausgezählt und das Wachstum der Bakterienstämme bestimmt.

Turbidometric (TB) Assay

Eine Kolonie der entsprechenden Bakterienstämme wurde in 5 ml TSB-Medium in einem 12 ml Snap-Cap-Röhrchen angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das ES-Produkt wurde anschließend in TSB-Medium aufgenommen. Die Bakterien wurden zweimal mit PBS (phosphate-buffered Saline) gewaschen und auf eine Konzentration von 2×10^6 Bakterien pro ml in frischem TSB eingestellt.

220 µl der Probe wurden nun mit 22 µl 10%-igen Peptonwasser vermischt und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. 50 µl des ES-Produktes wurden mit 20 µl Bakteriensuspension in einer 96-Well Mikrotiterplatte inkubiert. Die Proben wurden 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die optische Dichte bei 550 nm (OD_{550}) jede Stunde gemessen. Zur Kontrolle wurden die Proben auf MHB-Platten ausplattiert und die Kolonien ausgezählt.

Der *SI-Index (survival Index)* wurde folgendermaßen ermittelt:

$$SI = OD_{550} \text{ at mid-log of control bacterial growth} / OD_{550} \text{ of ES at corresponding time point} \times 100$$

Luziferase-Assay

Der Bakterienstamm wurde in MHB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelkolben inkubiert. Die Großkultur wurde in MHB-Medium angeimpft und die Kultur bis zu einer OD von 0,3 wachsen gelassen. Dann wurde der Bakterienstamm auf 5×10^4 bzw. 5×10^5 Bakterien/ml eingestellt. Jedes Well, einer 96-Well Platte, wurden mit 50 µl der jeweiligen Konzentration und 50 µl der Bakteriensuspension befüllt. Die 96-Well Platte wurde im Schüttelinkubator für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Jede Stunde wurde eine Probe entnommen und eine Lumineszenzmessung durchgeführt.

Material und Methoden

In Tabelle 1 wurde ein typisches Verdünnungsschema dargestellt das bei allen drei antibakteriellen *Assays* zum Einsatz kam.

Tabelle 1: Schema für 1. Verdünnungsreihe in 96er-Well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100µl MHB	Bakterien+ 10µg/ml L	Bakterien+ P1 1:1	Bakterien+ P2 1:1	Bakterien+ P3 1:1	Bakterien+ eno0,2mg/ml	100µl MHB	Bakterien+ 10µg/ml L	Bakterien+ P1 1:1	Bakterien+ P2 1:1	Bakterien+ P3 1:1	Bakterien+ eno0,2mg/ml
B	100µl Bakterien	Bakterien+ 5µg/ml L	Bakterien+ P1 1:2	Bakterien+ P2 1:2	Bakterien+ P3 1:2	Bakterien+ eno0,1mg/ml	100µl Bakterien	Bakterien+ 5µg/ml L	Bakterien+ P1 1:2	Bakterien+ P2 1:2	Bakterien+ P3 1:2	Bakterien+ eno0,1mg/ml
C	100µl Bakterien	Bakterien+ 2,5µg/ml L	Bakterien+ P1 1:4	Bakterien+ P2 1:4	Bakterien+ P3 1:4	Bakterien+ Eno0,05mg/ml	100µl Bakterien	Bakterien+ 2,5µg/ml L	Bakterien+ P1 1:4	Bakterien+ P2 1:4	Bakterien+ P3 1:4	Bakterien+ Eno0,05mg/ml
D	100µl Bakterien	Bakterien+ 1,2µg/ml L	Bakterien+ P1 1:8	Bakterien+ P2 1:8	Bakterien+ P3 1:8	Bakterien+ eno0,025mg/ml	100µl Bakterien	Bakterien+ 1,2µg/ml L	Bakterien+ P1 1:8	Bakterien+ P2 1:8	Bakterien+ P3 1:8	Bakterien+ eno0,025mg/ml
E	100µl Bakterien	Bakterien+ 0,6µg/ml L	Bakterien+ P1 1:16	Bakterien+ P2 1:16	Bakterien+ P3 1:16	Bakterien+ eno0,00125mg/ml	100µl Bakterien	Bakterien+ 0,6µg/ml L	Bakterien+ P1 1:16	Bakterien+ P2 1:16	Bakterien+ P3 1:16	Bakterien+ eno0,00125mg/ml
F	100µl Bakterien	Bakterien+ 0,3µg/ml L	Bakterien+ P1 1:32	Bakterien+ P2 1:32	Bakterien+ P3 1:32	Bakterien+ eno0,006mg/ml	100µl Bakterien	Bakterien+ 0,3µg/ml L	Bakterien+ P1 1:32	Bakterien+ P2 1:32	Bakterien+ P3 1:32	Bakterien+ eno0,006mg/ml
G	100µl Bakterien	Bakterien+ 0,1µg/ml L	Bakterien+ P1 1:64	Bakterien+ P2 1:64	Bakterien+ P3 1:64	Bakterien+ eno0,003mg/ml	100µl Bakterien	Bakterien+ 0,1µg/ml L	Bakterien+ P1 1:64	Bakterien+ P2 1:64	Bakterien+ P3 1:64	Bakterien+ eno0,003mg/ml
H	100µl Bakterien	Bakterien+ 0,078µg/ml L	Bakterien+ P1 1:128	Bakterien+ P2 1:128	Bakterien+ P3 1:128	Bakterien+ eno0,0015mg/ml	100µl Bakterien	Bakterien+ 0,078µg/ml L	Bakterien+ P1 1:128	Bakterien+ P2 1:128	Bakterien+ P3 1:128	Bakterien+ eno0,0015mg/ml

5x10⁴ Bakterien/Well

5x10⁵ Bakterien/Well

Pro Bakterienstamm und Substanz je eine 96er-Well-Platte (Weiß für Lumineszenz).

Alle Pipetiervorgänge fanden unter der sterilen Werkbank statt.

Der *Luziferase-Assay* wurde für die meisten Experimente verwendet, weil sich herausstellte, dass dieser *Assay* bis zu 100-mal sensitiver war als der CFU bzw. der *Turbidometric-Assay*.

2.4 Biochemische und Massenspektrometrische Methoden

Ultrafiltration

Mittels der Ultrafiltration können Proteine und Peptide aufkonzentriert und zusätzlich aufgereinigt werden. In speziellen Ultrafiltrations-Röhrchen befindet sich eine Membran mit einem *Cut Off* von z.B. 10 KDa. Beim Filtrationsvorgang werden alle Proteine die größer sind als 10 KDa oberhalb der Membran aufkonzentriert und Proteine bzw. Peptide die kleiner als 10 KDa sind, werden durch die Membran hindurchgeschleust. Somit bekommt man zwei Fraktionen, eine reine Peptid- und eine reine Proteinfraktion.

Die Proben wurden in das Ultrafiltrations-Röhrchen gefüllt und direkt für 70-80 Minuten bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Proteine, die oberhalb der Membran aufkonzentriert wurden, mit der Pipette abgenommen, aliquotiert und bei -80°C für die weitere Verwendung tiefgefroren. Mit der Peptidfraktion wurde auf die gleiche Weise verfahren.

Festphasen-Extraktion

Mit Hilfe einer *reversed Phase* C₁₈ Festphasen-Extraktions-Kartusche ist es möglich, Peptide aufzukonzentrieren und zu reinigen.

Zunächst wurde die Kartusche mit 2-3 ml der Lösung 1 aktiviert. Anschließend fand die Äquilibration der Säule mit Lösung 2 statt. Nach der Äquilibration wurde die Probe auf die Säule aufgetragen. Dabei binden die Peptide am Säulenmaterial an, welches aus Octadecyl einem C₁₈ Material, besteht. An die Auftragung schloss sich direkt das Waschen der Säule mit jeweils 1-2 ml der Lösungen 2 und 3 an. Die Elution der Säule erfolgte mit maximal 1-1,5 ml der Lösung 4. Die eluierten Peptide wurden aufgefangen, aliquotiert, eingengt und danach in 0,05%-iger TFA oder Wasser aufgenommen.

Verwendete Lösungen für die Festphasen-Extraktion:

Lösung 1: Aktivierungspuffer 60% ACN/0.1% TFA

Lösung 2: Äquilibrierungspuffer 0,1% TFA

Lösung 3: *Aqua bidest*

Lösung 4: Elutionspuffer 80% ACN/1% TFA

Reinigung von Peptiden mit PepClean C₁₈

Um Lösungen, in denen Peptide enthalten waren von Detergenzien wie z.B. Salzen zu befreien, wurden sog. PepClean C₁₈ Kartuschen verwendet. Diese Kartuschen konnten eine Peptidmenge zwischen 10 ng und 30 µg Gesamtpeptid aufnehmen. Im ersten Schritt der Reinigung wurde die Kartusche in ein fassendes 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Im zweiten Schritt kam es zur Aktivierung des Säulenmaterials in der Kartusche mittels 200 µl 50% Acetonitril (ACN). Anschließend wurde die Lösung für 20 Sekunden bei 600 rpm abzentrifugiert. An die Aktivierung schloss sich die Äquilibrierung der Säule mit 5%-igen ACN in 0,5%-iger TFA an und abermals wurde für 20 Sekunden mit 600 rpm zentrifugiert. Die Kartusche wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden 10-150 µl der Probe in 5%-igen ACN in 0,5%-iger TFA aufgenommen und auf die Säule geladen. Anschließend wurde wie oben zentrifugiert. Bei diesem Schritt binden die Peptide beim Vorgang der Zentrifugation an das Säulenmaterial. Die Kartusche wurde danach wieder in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Säule wurde dann zweimal mit 200 µl 5%-igen ACN in 0,5%-iger TFA gewaschen (zentrifugieren zwischen den Waschsritten). Direkt daran anschließend wurde die Kartusche in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen. Die an der Säule gebunden Peptide wurden mit 20 µl 70%-iger ACN eluiert, indem man bei 600 rpm für 20 Sekunden zentrifugierte.

Für die Analyse mittels ESI-MS wurde eine 0,1%-ige Ameisensäure verwendet. Hat man in seiner Probe sehr basische Peptide, so werden die 0,5%-iger TFA durch 0,2%-ige Heptafluorbuttersäure (HFBA) ersetzt. Für hydrophobe Peptide ist es ratsam im Wasch-, Äquilibrierungs- und Ladepuffer das ACN wegzulassen.

Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung der Proben erfolgte spektralphotometrisch nach der Methode von Bradford (Bradford *et al.*, 1976). Die Eichung des Photometers wurde mit einer Verdünnungsreihe von 0 - 800 µg Rinderserumalbumin (BSA) durchgeführt. Zur Messung des Proteingehaltes wurden 20 µl Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt, kräftig vortexen und 5-10 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 580 nm gegen einen Blindwert, der statt der Probe die gleiche Menge an Puffer enthielt, gemessen und in den Proteininhalt [µg/ml] umgerechnet.

Bradford Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1% (w/v)
Ethanol	5% (w/v)
O-Phosphorsäure	10% (v/v)

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die analytische Trennung von Proteinen kamen sowohl die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [Laemmli *et al.* 1970] als auch isoelektrische Fokussierung [Hübel und Beck, 1996] zum Einsatz. Verwendet wurde jeweils das Mini Protean II System von Bio Rad für Mini Gele (7 cm), das Höfer SE 600 System (16 cm) für mittlere und das Ettan Daltan 6 System (24 cm) für große Gelsysteme. Molekulargewichte verschiedener Proteine konnten nach erfolgreicher SDS-Gelelektrophorese durch Einsatz von Markerproteinen mit bekanntem Gewicht (Low Range und High Range Marker, Firma Bio Rad und Sigma) abgeschätzt werden.

Probenvorbereitung

Aliquots mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (in der Regel zwischen 1- 20 µg) wurden 1:1 mit dem entsprechenden Probenpuffer gemischt, anschließend für 5-10 Minuten bei 95°C gekocht und auf das SDS-Gel aufgetragen. Der SDS Probenpuffer enthielt Glycerin zur Beschwerung der Proben, SDS zur Denaturierung der Proteine, Mercaptoethanol zur Reduktion von Disulfidbrücken und Bromphenolblau als Laufmarker.

2x SDS Probenpuffer

Tris/HCl (pH=6,8)	100 mM Tris
SDS (10%)	1%
Glycerin (87%)	45%
β-Mercaptoethanol	10%
Bromphenolblau	0,05%

Im folgendem die Zusammensetzung der verwendeten Trenngele und Sammelgele mit unterschiedlichem Acrylamid Konzentrationen und die Puffer:

Trenngele

	3%	3,5%	4%	5%	7,5%	10%	12,5%	15%	20%
Wasser	6,4	6,2	6,1	5,7	4,9	4,1	3,2	2,5	0,7
4x TGP	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
AA-Lsg. (37,5:1)	1	1,2	1,3	1,7	2,5	3,3	4,2	5	6,7
SDS (10%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
APS (10%)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Sammelgele

	3%	3,5%	4%
Wasser	6,4	6,2	6,1
4x SGP	2,5	2,5	2,5
AA-Lsg. (30:1)	1	1,2	1,3
SDS (10%)	0,1	0,1	0,1
APS (10%)	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,01	0,01

10x Elektrodenpuffer

	Konzentration
Glycin	1,92 M
Tris	0,25 M
SDS	1%

4x Trenngelpuffer (TGP)

	Konzentration
Tris/HCl (pH=8,8)	1,5 M

4x Sammelgelpuffer (SGP)

	Konzentration
Tris/HCl (pH=6,8)	0,5 M

Zunächst wurde ein Trenngel in der gewünschten Konzentration gegossen und solange gewartet bis es aus polymerisiert war. Auf das Trenngel wurde nun das Sammelgel in der gewünschten Konzentration gegossen. Das fertige Gel wurde in die Pufferkammer gesetzt und die Pufferkammer mit Elektrodenpuffer gefüllt. An den Elektroden wurde Strom angelegt und die Probe bei 75 V ins Trenngel laufen gelassen. Danach wurde das Gel mit 200 V bis zum Ende des Gels laufen gelassen. Nach Beendigung wurde das Gel fixiert und gefärbt.

Western Blot

Zum Nachweis von glykolysierten Proteinen aus dem ES-Produkt wurden die Proteine nach der SDS-Gelelektrophorese per Western Blot auf Nitrocellulose oder PVDF Membran übertragen und anschließend immunologisch detektiert. Angewandt wurde hier ein Verfahren nach Towbin *et al.* (1979). Hierbei erfolgte das Blotting zwischen zwei Plattenelektroden in horizontaler Konfiguration. Gel- und Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm) liegen als Sandwich zwischen mit Towbinpuffer getränktem Filterpapier, welche als Ionenreservoir dient. Die beiden Elektroden bilden ein starkes elektrisches Feld, welches zu einer hohen Transferrate von Proteinen vom Gel auf die Nitrocellulose Membran führt.

Durchführung

Nach dem SDS-PAGE wurde das Gel, die Nitrocellulose-Membran und das Filterpapier zusammen für 15 Minuten in Towbinpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,03%-iger SDS; 20%-igen Methanol/pH=8,3) äquilibriert. [Minigele 15 Minuten/Mittlere Gele 30

Minuten] Der Blot wurde nach der Äquilibrierung folgendermaßen aufgebaut: 1.) Filterpapier; 2.) Nitrocellulose Membran; 3.) SDS-Gel; 4.) Filterpapier. Das Blotting der jeweiligen Proteine wurde bei 25 V, 5 mA pro cm² Gel (Minigel) und 60-70 Minuten geblotet. Für 18 cm Gele gilt: 3 mA pro cm², 90 Minuten. Nach dem Blotting wurde die Membran zur Überprüfung kurz (ca. 1 Minute) mit Ponceau angefärbt. Das Entfärben des Blots erfolgte mit Wasser und einigen Tropfen TBST oder NaOH. Das Abblocken der Membran erfolgte 1-2 Stunden lang in 5%-iger BSA-Lösung. Auftragen von Lectin von *Helix pomatia* (Zuckerspezifität: GalNac) als primärer Antikörper (50 µl Lectin in 25 ml 0,5%-igen BSA) für 3-24 Stunden bei 4°C. Nach der Inkubationszeit 2x waschen für 10 Minuten in TBST und 1x in TBS. Auftragen des sekundären Antikörpers (15 µl Antikörper in 25 ml 0,5%-igen BSA) Streptavidin AP [AP= Alkalische Phosphatase] und für 3 Stunden bei 4°C inkubieren. Zweimal in TBST und einmal in TBS für jeweils 10 Minuten nach der Inkubation waschen. Detektion der Proteine auf dem Blot mit alkalischer Phosphatase. Ein Milliliter vom 25-fachen Entwicklungspuffer wurde in 25 ml *Aqua bidest* verdünnt. Anschließend wurden jeweils 250 µl von Puffer A hinzu gegeben. Die Lösung wurde auf den Blot aufgetragen und für ca. 5-10 Minuten entwickelt. (BioRad)

2.5 2D-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese können Proteine sowohl nach ihrer Größe als auch nach ihrer Ladung aufgetrennt werden. Damit werden Proteine bei einer 2D Gelelektrophorese zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension nach ihrer Ladung, man spricht hier von der isoelektrischen Fokussierung, und in der zweiten Dimension nach der Größe. Man erhält so ein zweidimensionales Bild von Proteinen, mit den Eigenschaften Ladung und Größe.

Die Probenvorbereitung für die 2D Gelelektrophorese ist entscheidend, insbesondere sollten die Proben von Salzen und anderen Detergenzien befreit werden, weil sonst die isoelektrische Fokussierung für die 1. Dimension erhebliche Probleme bereitet und somit die Auftrennung der Proteine nicht zum erwünschten Erfolg führt.

Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)/SDS-Gelelektrophorese (2. Dimension)

Die jeweilige Probenmenge wurde in einem Rehydrierungspuffer aufgenommen und durch mehrfaches Aufziehen mit dem Puffer vermischt. Danach wurde der Puffer in dem vorbereiteten Keramikschieffchen möglichst gleichmäßig zwischen den beiden Elektroden verteilt. Die vorbereiteten Gelstreifen (IPG Strips) wurden nun mit der Gelseite nach unten auf dem Puffer platziert. Anschließend wurde der Streifen mit Mineralöl beschichtet.

Für die erste Dimension wurden IPG-Strips (z.B. pH 3-10) in 340 μ l Rehydrierungspuffer für 12 Stunden, bei RT und bei 50 V rehydriert. Die Isoelektrische Fokussierung wurde auf dem IPGphor-Gerät mit folgender Konfiguration gestartet: Bei einer Temperatur von 20°C über 1 Std. bei 500 V, über 1 Std. bei 1000 V und über 4 Std. bei 8000 V.

Zu Beginn der zweiten Dimension wurden die Streifen zunächst kurz in Wasser gewaschen und direkt im Anschluss für je 12 Minuten mit DTT und Iodacetamid äquilibriert. Der Gelstreifen wurde um 2 cm am sauren Ende abgeschnitten und auf das vorbereitete SDS-Gel aufgetragen. Die zweite Dimension wurde mit einem 12,5%-igen Polyacrylamid Gel (15x16 cm²) für ca. 5 Stunden, bei 20°C und bei 25 mA in einem Höfer-Dalt-600 Gelsystem gefahren.

Tabelle 2: Rehydrationpuffer –Volumen für IPG-Strip

IPG-Strip Länge [cm]	Gesamtvolumen für den Strip [μ l]
7	125
11	200
13	250
18	340
24	450

Material und Methoden

Tabelle 3: Proteinkonzentrationen Silber und Coomassie Färbung für 2D-Gelelektrophorese

IPG-Strip Länge	pH-Gradient	Proteinkonz. für Silber Färbung [μg]	Proteinkonz. für Coomassie Färbung [μg]
7 cm	4-7	4-8	20-120
	6-11	8-16	40-240
	3-10 NL	2-4	10-60
11 cm	4-7	10-20	50-300
	6-11	20-40	100-600
	3-10 NL	4-8	20-120
13 cm	4-7	15-30	75-450
	6-11	30-60	150-900
	3-10 NL	8-15	40-240
18 cm	4-7	30-60	150-900
	6-11	60-120	300-1500
	3-10 NL	15-30	75-450
24 cm	4-7	45-90	200-1300
	6-11	80-170	400-2000
	3-10 NL	20-40	100-600

Anmerkung: Die Proteinkonzentration für kolloidale Coomassie und Fluoreszenzfärbung liegen jeweils zwischen Silber und alkoholischer Coomassie Färbung.

Lysispuffer

	Konzentration
Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
Tris	10 mM
DTT	50 mM
Protease inhibitor Cocktail	1x
Pharmalyte	2%
CHAPS	4%

Rehydrierungspuffer mit Pharmalyte

	Konzentration
Harnstoff	8 M
CHAPS	2%
Pharmalyte	0,5%
DTT	70 mg in 25 ml
Bromphenol Blau	0,002%

Pharmalyte erst kurz vor dem Start der 1. Dimension zugeben.

Äquilibrierungspuffer mit DTT

	Konzentration
Tris/HCl (pH=8,8)	50 mM
Harnstoff	6 M
Glycerol	30% (v/v)
SDS	2% (w/v)
Bromphenol Blau	0,002%
DTT	1%

Äquilibrierungspuffer mit Iodacetamid

	Konzentration
Tris/HCl (pH=8,8)	50 mM
Harnstoff	6 M
Glycerol	30% (v/v)
SDS	2% (w/v)
Bromphenol Blau	0,002%
Iodacetamid	4%

2.5.1 Färbung von Polyacrylamid Gelen

Proteinfärbung

Entweder wurden SDS-Gele für Western-Blot-Experimente verwendet oder mit *Coomassie Brilliant Blue*, Silber- oder Fluoreszenz-Färbung gefärbt. Mit diesen Methoden konnten Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung dauerhaft im Gel angefärbt werden. Hierfür wurden nach Ende der Elektrophorese die entsprechenden

Gele zunächst für 1-6 Stunden in der jeweiligen Fixierlösung fixiert. Im folgendem sind die verwendeten Färbemethoden aufgeführt.

Coomassie Färbung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele zunächst für mindestens 1 Stunde in 40% Ethanol/10% Essigsäure Lösung fixiert. Nach Beendigung der Fixierung wurden die entsprechenden Gele zwischen 30 Minuten und 2 Stunden auf einem Schüttler in der Färbelösung inkubiert. Dadurch wurden Proteinbanden durch den Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G-250* gefärbt und gleichzeitig in der Gelmatrix durch Essigsäure fixiert wurden. Anschließend wurden die Gele mehrfach mit Wasser gespült und mit Entfärberlösung (10%-iger Essigsäure) unter mehrfachen Wechsel der Lösung entfärbt.

Färbelösung

<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	0,25% (w/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Ethanol	40% (v/v)

Die Färbung mit Coomassie schont die Proteine im Gel und lässt sie weitest- gehend in ihrem nativen Zustand im Gel. Damit werden massenspektrometrische Arbeiten erheblich erleichtert.

Silber Färbung nach Blum *et al.* (1987)

Die Färbung mit Silber ist sicherlich die sensitivste Färbemethode, um Proteine in einem Gelsystem sichtbar zu machen. Allerdings ist bei dieser Methode nicht unbedingt gegeben, dass Proteine ihren nativen Zustand im Gel behalten, weil die verwendeten Detergenzien, das Protein denaturieren. Deshalb sind massenspektrometrische Arbeiten bei Silber gefärbten Gelen schwierig. Im Folgenden das Protokoll:

<u>Schritt</u>	<u>Behandlung</u>	<u>Zeit</u>
Fixierung	40% EtOH/ 10% Essigsäure	1 Stunde; Übernacht
Waschen	30 % Ethanol	2x20 Minuten
Waschen	Aqua bidest	20 Minuten
Vorbehandlung	0,2 g/l Natriumthiosulfat	1 Minute
Spülen	Aqua bidest	3x20 Sekunden
Silber	2 g/l Silbernitrat	20 Minuten
Spülen	Aqua bidest	3x20 Sekunden
Entwickeln	30 g/l Natriumcarbonat, 500 µl/l Formaldehyd, 4 mg/l Natriumthiosulfat	Ungefähr 2-10 Minuten
Stop	10% Essigsäure	10 Minuten und mehr
Waschen	Aqua bidest	3x5 Minuten
Konservierung	25% Ethanol/ 3% Glycerin	

Coomassie Färbung nach Neuhoff (Kolloidales Coomassie)

Die kolloidale Coomassie Färbung ist eine Alternative zur alkoholischen Coomassie-Färbung, weil sie erheblich sensitiver und im Gegensatz zur Silberfärbung für massenspektrometrische Untersuchungen gut geeignet war.

Das entsprechende Gel wurde mit Lösung 5 für 2 Stunden fixiert. Daran anschließend setzte die Färbung mit Lösung 4 für mindestens 12 Stunden ein. Nach der Färbung wurde das Gel dreimal kurz mit Wasser gewaschen und in der Färbelösung gelagert.

Lösungen für die kolloidale Coomassie-Färbung:

Lösung 1: 212,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [Ammoniumacetat]

20 g 85% H_3PO_4 [Phosphorsäure]

add 1000 ml

Lösung 2: 1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 add 20 ml Wasser

Lösung 3: 20 ml Lösung 2+980 ml Lösung 1

Lösung 4: 800 ml Lösung 3+200ml MeOH [Färbelösung]

Lösung 5: 40% Methanol, 7% Essigsäure [Fixierlösung]

Fluoreszenzfärbung nach Rabilloud *et al.* (2001)

Die Fluoreszenzfärbung ist eine Alternative sowohl zur Silber- als auch zur Coomassie-Färbung. Sie ist zwar nicht sensitiver als die Silberfärbung aber sie ist erheblich sensitiver als beide Coomassie Färbungen und daher sehr gut geeignet für massenspektrometrischen Untersuchungen. Ein Nachteil dieser Färbung ist, dass Proteinbanden nur über spezielle Fluoreszenz-Scanner oder UV-Tische detektiert werden konnten.

Die Gele wurden über Nacht in 20%-igem Methanol/2%-iger Phosphorsäure fixiert. Nach dem ersten Fixierungsschritt wurden die Gele für 1 Stunde in 20%-igem Ethanol abermals fixiert. Für die anschließende Färbung wurde der Fluoreszenz-Farbstoff 1:100000 in 20%-igen Ethanol aufgenommen. Die Gele wurden für mindestens 6 Stunden in vollständiger Dunkelheit gefärbt. Entfärbt wurden die Gele in 10%-igem Methanol für mindestens 2 Stunden. Nach dem Entfärben können die Proteinspots entweder unter einem Fluoreszenz-Scanner oder einem UV-Tisch sichtbar gemacht werden. Wichtig war bei dieser Färbung, dass sowohl die Färbung als auch die Lagerung ohne Lichteinwirkung stattfand.

Der Fluoreszenz-Farbstoff basiert auf einem Ruthenium-Reagenz, das nach der Veröffentlichung von Rabilloud *et al.* (2001) in unserem Labor hergestellt worden war.

2.4.3 Fällung von Proteinen

Trichloressigsäure/Natriumdeoxycholat Fällung

Mittels dieser Methode ist es möglich geringe Proteinmengen von Salzen oder anderen Detergenzien zu reinigen.

Zum einfachen Volumen der Proteinlösung gibt man 1/100 Volumenanteil einer 2%-igen Natriumdeoxycholat Lösung und 1/10 Volumenanteil einer 100%-igen Trichloressigsäure (TCA) hinzu, vortext die Lösung kräftig und inkubiert sie für 30 Minuten bei 4°C. Anschließend wurde die Probe für 15 Minuten bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet zweimal mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen und für 5 Minuten bei 15000 rpm und

4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet für 3-5 Minuten getrocknet. Das Pellet wurde dann im Probenpuffer aufgenommen.

Trichloressigsäure/Natriumdeoxycholol Aceton Fällung

Eine gute Methode, um Proteine aufzukonzentrieren und störende Salze und/ oder Detergenzien zu entfernen ist die Trichloressigsäure/Natriumdeoxycholol-Aceton-Fällung.

Zu einer 100 µl Probe wurde 1 µl einer 2%-igen Natriumdesoxycholol gegeben, gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von TCA mit einer 10%-igen Endkonzentration. Die Probe wurde gevortext und für 1 Stunde bei (RT) inkubiert. Anschließend wurde sie für 10 Minuten bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann mit 200-400 µl eiskaltem Aceton gewaschen, für 15 Minuten auf Eis gelagert und abschließend für 10 Minuten bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für ca. 3-5 Minuten getrocknet und in den Probenpuffer aufgenommen.

2D *Clean-Up Kit* für die erste Dimension (IEF)/Amersham

Die Probenvorbereitung für 2D-Gelelektrophorese wurde mit dem *Clean-Up-Kit* von Amersham durchgeführt.

Die 100 µg Probe wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 300 µl vom *Precipitanten* zur Probe gegeben und das Gemisch anschließend für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Daran anschließend wurden 300 µl vom *Co-Precipitanten* hinzugeben, kräftig gevortext und für 5 Minuten bei 4°C und bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und für 2 Minuten zentrifugiert, um den Rest von der Flüssigkeit abzutrennen. Danach wurde der restliche Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Das Pellet wurde mit 40 µl *Co-Precipitanten* bedeckt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es wurde für 5 Minuten bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Dieses Pellet in 25 µl *Aqua bidest* aufnehmen und kräftig vortexten. Die Flüssigkeit wurde milchig aber das Pellet sollte sich nicht lösen! Dann gab man 1 ml eiskalten Waschpuffer hinzu, für 30 Minuten bei -20°C lagern und nach jeweils 10 Minuten für 20-30 Sekunden kräftig

vortexten. Anschließend für 5 Minuten bei 15000 rpm und 4°C zentrifugieren und der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Pellet für ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur trocknen lassen und dann im IEF-Rehydrierungspuffer resuspendieren. Optional kann die Probe im Rehydrierungspuffer kurz abzentrifugiert und der Überstand für die erste Dimension verwendet werden.

2.6 In-Gel Digestion/Trypsinverdau

Die jeweiligen Spots wurden aus dem Gel gestochen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Sie wurden anschließend bei 4°C gelagert.

Waschen des Gelspots aus coomassiegefärbten Gelen

Die Stücke wurden mit dem ca. 2-fachen Volumen der Lösung 2 für 15 Minuten bei 30°C und 800 rpm gewaschen. Alternativ, vor allem bei sehr stark gefärbten Spots, konnten Temperatur, Zeit und Volumen erhöht werden (z.B. 50°C, 30 Minuten). Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abgenommen und das jeweilige Gelstück wurde mit 100%-igen Acetonitril bedeckt. Wenn das Gel weiß wurde, Acetonitril vorsichtig abnehmen. Direkt danach den Spot mit Lösung 1 bedecken und für 5 Minuten rehydrieren lassen. Gleiches Volumen von ACN zugeben und 15 Minuten bei RT inkubieren. Die Flüssigkeit abnehmen und den Spot in der *Speed vac* trocknen.

Waschen des Gelspots aus silbergefärbten Gelen

Die Spots wurden mit Entfärbungslösung bedeckt und für 1-2 Minuten inkubieren. Die Lösung wurde abgenommen und kurz den Spot und das Reaktionsgefäß mit Wasser ausspülen. Die Stücke wurden mit dem ca. 2-fachen Volumen von Lösung 1 gewaschen und für 15 Minuten bei 30°C und 800 rpm zentrifugiert. Alternativ, vor allem bei sehr stark gefärbten Spots, konnten Temperatur, Zeit und Volumen erhöht werden. (z.B. 50°C, 30 Minuten) Die Flüssigkeit wurde abgenommen und direkt einmal für 15 Minuten mit Lösung 2 gewaschen. Die Lösung wurde abgenommen und die Probe in *Speed vac* trocknen.

Lösungen zum Waschen des Gelspots aus silbergefärbten Gelen:

Lösung 1: 50 mM NH_4HCO_3 [Ammoniumhydrogencarbonat]

Lösung 2: Wasser-Acetonitril Gemisch (1:1)

Lösung 3: 30 mM $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ [Kaliumhexacyanoferrat]

Lösung 4: 30 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ [Natriumthiosulfat]

Lösung 5: Lösung 3 und Lösung 4 im Verhältnis 1:1
mischen (Entfärbungslösung für silbergefärbte Gele)

Reduktion und Alkylierung der Spots

Reduziert und alkyliert wurden Proteinspots aus 1D Gelen. Die Spots aus 2D Gelen wurden nicht diesem Schritt unterworfen, weil sie bereits für die Vorbereitung der 2-ten Dimension reduziert und alkyliert wurden. (Abschnitt 2.5 / S.33)

Die Gelstücke wurden vollständig mit der Reduktionslösung bedeckt und für 45 Minuten bei 56°C inkubieren. Die Probe auf RT abkühlen lassen, die Flüssigkeit wurde abgenommen und durch gleiches Volumen Alkylierungslösung ersetzt. Für 30 Minuten in völliger Dunkelheit inkubieren. Die Lösung wurde abgenommen und Gelspots wie oben beschrieben gewaschen.

Reduktionslösung: 7,5 mg DTT in 5 ml 50 mM NH_4HCO_3

Alkylierungslösung: 50 mg Iodacetamid in 5 ml 50 mM NH_4HCO_3

In-Gel *Digestion* mit Trypsin

Das Gelstück wurde in 8-10 μl Reaktionspuffer A aufgenommen und für 1 Stunde auf Eis rehydriert; für 2D Gele gilt: 45 Minuten auf Eis inkubieren. Der Puffer A wurde abgenommen und durch 6 μl Puffer B ersetzt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Dann gab man 3 μl einer 1%-igen TFA hinzu und für 30 Minuten wurde bei RT inkubiert und anschließend auf das MALDI-*Target* auftragen.

Reaktionspuffer A: je 100 μl 10 mM NH_4HCO_3 + 1 μl verdünnte Trypsinlösung

Reaktionspuffer B: 100 μl 10 mM NH_4HCO_3

Target Präparation zur MALDI-MS Messung

Zu einem *Peptid Mass Fingerprint* wurde für die *Target* Präparation ein Anchortarget verwendet. Als Matrix diente 2,5 Dihydroxybenzoelsäure (DHB)

Bei einer Massenbestimmung, die auf einem Stahltarget stattfand, wurde Sinapinsäure verwendet.

<u>DHB (Peptide)</u>	<u>Sinapin (Proteine)</u>
DHB 5 mg/ml in ACN/0,1% TFA (1:2) Darin <i>Peptid Calibration Standard</i> aufnehmen (5 µl+95µl DHB) <i>Target:</i> 4 µl Standard auf 0,4 Anchortarget Je zwei Proben haben zwischen sich jeweils einen Standard	Sinapin / ACN/TFA 0,1% (2:1) Standard: Stocklösung 100 pmol (1:10 verdünnen: 0,5 µl Standard+4,5 µl Matrix) <i>Target:</i> Standard: 1 µl Matrix+1µl Standard Probe: 1 µl Matrix+2 µl Probe
DHB 2,5 mg/ml in ACN/0,1% TFA (1:2) 2 µl DHB+0,4 µl Probe auf 0,8 Anchortarget	

Reinigung der Proben mit C₁₈ Zip-Tips

Um Peptide für eine MALDI-MS-Messung besser darstellen zu können wurden die Peptide über sogenannte C₁₈-Zip-Tips aufgereinigt. Diese Zip-Tips enthielten eine C₁₈-Säule in Miniformat mit denen Peptide zusätzlich aufgereinigt und aufkonzentriert wurden.

Durchführung:

Im ersten Schritt wurden die Zip-Tips mit der Elutionslösung (ACN/0,1% TFA) aktiviert. Direkt danach, im zweiten Schritt, wurde die Säule mit 0,1%-iger TFA mehrmals gewaschen. Im dritten Schritt wurde die Probe mehrmals mit der Pipette aufgezogen und so die Peptide an der Säule gebunden. Zu beachten ist hierbei, dass bei diesem Vorgang keine Luft mit eingezogen wird.

Nun wurden 2,5 µl der Matrixlösung auf das *Target* vorgelegt und die Probe mit der Waschlösung und Matrixlösung auf dem *Target* vermischt. Anschließend wurde die Lösung getrocknet und dann vermessen.

***Target* Reinigung:**

Das *Target* mit Methanol abspülen und anschließend mit weichem Tuch abwischen. In eine Schale wurde mit Isopropanol (2-Propanol) das *Target* hinein gegeben und für 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde das Isopropanol abgenommen das *Target* mit Wasser bedeckt und wiederum für 10 Minuten ins Ultraschallbad platziert. Das Wasser wurde abgenommen und das *Target* auf einem Tuch trocknen gelassen.

Optional (ca. 1x im Monat):

Heptan:

Nach Reinigung mit Wasser die Platte kurz in Heptan schwenken und trocknen lassen. Die Platte wird dadurch wieder hydrophob und die Probe zieht sich auf dem hydrophilen *Anchor* zusammen.

Ammoniumacetat:

Nach Reinigung des Targets mit Isopropanol werden mit Ammoniumacetat bedecken und für 10 Minuten ins Ultraschallbad stellen. Danach Reinigung mit Wasser (10 Minuten Ultraschall). Bei diesem Reinigungsschritt wurden Metallionen, insbesondere K^+ und Na^+ Ionen, entfernt.

2.7 Probenvorbereitung für ESI-MS/MS-Messung aus In-Gel *Digestion*.

Waschen, reduzieren, alkylieren und spalten der Proteine mit Trypsin verlief mit dieser Probe wie oben bereits beschrieben. Nach dem „Verdau“ der Probe, verbleibt der Reaktionspuffer B auf der Probe, und es wurde das einfache Volumen einer 1%-igen TFA-Lösung auf das Gelstück gegeben. Die Probe wurde bei 35°C und 850 rpm für 30 Minuten inkubiert und anschließend für zwei Minuten mit Ultraschall behandelt. Der Überstand wurde abgenommen, aber nicht verworfen und das Gelstück mit ACN/1% TFA-igen (im Verhältnis 1:1) bedeckt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine zweiminütige Ultraschallbehandlung. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem ersten Überstand vereinigt. Die Lösung wurde auf ungefähr 10 µl eingengt und wieder mit 1%-iger TFA auf 20-30 µl aufgefüllt. Die gesamte Flüssigkeit wurde dann in speziellen Probenvials (möglichst blasenfrei!) überführt, die der ESI-MS/MS Messung zur Verfügung stand.

2.8 Chromatographische Trennungsmethoden

Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie gehört zu den physikalischen-chemischen Trennverfahren, die auf Verteilung eines Stoffes zwischen einer flüssigen mobilen Phase und einer festen stationären Phase beruhen. Die feste stationäre Phase besteht aus einem organischen Ionenaustauscher, der auf der Oberfläche eine elektrische Ladung trägt. Die mobile Phase enthält Ionen, die mit ionischen Probemolekülen um einen Platz auf der Oberfläche der stationären Phase konkurrieren. Man unterscheidet zwischen Kationen- und Anionenaustauschern. In den durchgeführten Experimenten wurde ein Kationenaustauscher verwendet. Getrennt wurden basische Peptide mit einem starken Kationenaustauscher (Polysulfoethyl A; PolyLC Inc.). Die Probe wurde in der *Speed vac* getrocknet und in Puffer A aufgenommen. Vor dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit Puffer A äquilibriert. 20 µl der Probe wurde mittels der HPLC auf den Kationenaustauscher geladen. Eluiert wurde die Probe mit Puffer B. Die Flussrate betrug 100 µl pro Minute und der Gradient stieg innerhalb von 10 Minuten auf 50%-igem Puffer B, um dann

für 5 Minuten auf 100%-igem Puffer B zu steigen. Der Gradient bei 100% Puffer B wurde für 10 Minuten aufrecht gehalten. Die UV Detektion fand bei 220 nm statt. Während die Probe eluiert wurden die Peptide in Fraktionen gesammelt.

Puffer A: 30% ACN; 20 mM 85% Orthophosphorsäure

Puffer B: 50% ACN; 20 mM 85% Orthophosphorsäure
pH 3 einstellen mit 2 M Ammoniumchloridlösung

Reverse-Phase-Chromatographie

Bei dieser Chromatographie-Methode werden niedermolekulare Komponenten wie z.B. Peptide oder Aminosäuren anhand ihrer hydrophoben Eigenschaften getrennt. Die Reverse-Phase-HPLC ermöglicht eine schnelle Auftrennung und eine gute Auflösung der Einzelkomponenten. Als stationäre Phase wurde ein relativ unpolares Medium verwendet, wie z.B. Silica-Gel. Die mobile hydrophile Phase besteht aus einem organischen Lösungsmittel in wässriger Lösung (ACN oder Methanol).

Für die Trennung mittels Reverse-Phase-(RP) HPLC wurde eine C₁₈ Säule (Ultrasphere Beckmann) verwendet. Die Probe wurde in der *Speed vac* getrocknet und in Puffer A aufgenommen. Die Säule wurde vor dem RP-Lauf mit Puffer A für 20 Minuten äquilibriert. Auf die Säule wurden 10-50 µl aufgetragen und es wurde mit Puffer B eluiert. Die Flussrate betrug 300 µl pro Minute. Der Gradient verlief je nach Probe entweder von 1-90%-igen ACN oder 6-60%-igen ACN. Die gebunden Peptide wurden eluiert und fraktioniert. Detektiert wurde bei einer UV- Wellenlänge von 214 nm.

Puffer A: 2-5% ACN (je nach Säule); 95-98% H₂O; 0,1% TFA

Puffer B: 80% ACN; 20% H₂O; 0,1% TFA

Hydrophile Interaktionschromatographie

Bei den meisten Proteinen sind die hydrophoben Reste eher im Inneren des Proteins zu finden, während die hydrophilen Reste auf der Außenseite liegen. Einige Proteine und auch Peptide haben aber hydrophobe Reste auf ihrer Oberfläche und lassen sich über die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) isolieren. Die HIC ist im Prinzip der RP-Chromatographie (RPC) sehr ähnlich, bei der die Interaktion hydrophober Reste mit der Säulenmatrix ausgenutzt wird. Während die HIC unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde, ist die RPC unter nicht nativen Bedingungen durchgeführt worden. Das bedeutet, dass lediglich die Oberfläche des Proteins für die hydrophobe Interaktion verantwortlich ist und das Protein seine Integrität und Aktivität behält. Bei der RPC treten die hydrophoben Reste im Inneren des Proteins mit dem Säulenmaterial in Kontakt und damit wird die Integrität des Proteins zerstört.

Zur Trennung von Peptiden wurde eine HIC Säule mit dem Material Polyhydroxyethyl A (PolyLC Inc.) verwendet. Bevor die Probe auf die Säule aufgetragen wurde, wurde sie mit Puffer A 30 Minuten lang äquilibriert. Anschließend wurden 40 µl der Probe auf die Säule aufgetragen und mit zunehmenden Salzgradient (Puffer B) eluiert. Die Elution begann bei niedrigem Salzgehalt und hohem ACN-Gehalt. Während der Chromatographie sank der ACN-Gehalt und der Salzgehalt stetig stieg. Die Peptide, die weniger hydrophob sind, eluieren zu Beginn und die stark hydrophoben Peptide werden erst bei hohem Salzgehalt eluiert. Die Peptide wurden wieder fraktioniert.

Puffer A: 85% ACN; 10 mM Triethylaminophosphat

(TEAP aus 1 M Stammlösung) pH 2,8 (mit Phosphorsäure einstellen)

Puffer B: 250 mM NaCl; 10 mM TEAP

3. Ergebnisse und Diskussion

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Identifizierung eines antibakteriellen Wirkstoffes aus dem exkretorischen-sekretorischen Produkt (ES-Produkt) der Schmeißfliegenlarve *Lucilia sericata*. Das ES-Produkt ist das Verdauungs- und Ausscheidungssekret der Larven, während diese in der Wunde ihre klinische erprobte Aufgabe erfüllen. Aus der Literatur ist bekannt, dass das ES-Produkt antibakterielle Wirkung auf gram-positive (*Staphylococcus aureus*) und gram-negative Bakterien (*E. coli*) hat (Thomas S. *et al.* 1999 & Bexfield A. *et al.* 2004). Um die Frage nach dem antibakteriellen Wirkstoff in *Lucilia sericata* ES-Produkten bzw. Sekreten zu beantworten, werden im Wesentlichen drei unterschiedliche experimentelle Versuchansätze durchgeführt. Der erste experimentelle Ansatz zielt auf das Sekret der Speicheldrüse ab. Die Grundlage des zweiten und dritten experimentellen Versuchansatzes ist das ES-Produkt. Im ersten und dritten Ansatz wird zunächst die biologische Aktivität anhand von *in vivo* Studien untersucht. Aufgrund der dort erhaltenen Ergebnisse wurde bei beiden Proben (ES und S) eine Peptidomanalyse vom jeweiligen Ausgangsmaterial durchgeführt. Beim zweiten Versuchansatz wurde das ES-Produkt einer typischen Proteomanalyse unterzogen. Ziel der Analyse war es, eine möglichst große Zahl der Proteine im ES-Produkt zu identifizieren sowie der Proteine aufzufinden, aus denen Peptide mit antimikrobieller Wirkung prozessiert werden könnten.

3.1 Untersuchungen des Sekrets aus den Speicheldrüsen von *Lucilia sericata*

Die erste Versuchsreihe konzentrierte sich auf das Sekret der Speicheldrüsen. Unserer Hypothese zufolge produzieren die Tiere in ihren Speicheldrüsen antibakteriell wirksame Peptide oder Proteine, die auf der Wundoberfläche wirksam sind. Der erste Schritt im experimentellen Vorgehen befasst sich mit der Präparation der Speicheldrüsen aus den Tieren. Es werden aus ca. 1800-2000 Tiere beide Speicheldrüsen (Die Larven besitzen zwei Speicheldrüsen) herauspräpariert und aufgearbeitet. Die Präparation verläuft nach folgenden Schema: Zunächst werden die Tiere auf Schweinelebern bis zum Ende des zweiten Larvenstadiums gezogen. Zur Vorbereitung der Präparation werden die Larven kurz einem Kälteschock ausgesetzt und unter ein Binokular gelegt. Anschließend wird das erste Drittel der Made entfernt und aus dem Kopfbereich die beiden Speicheldrüsen herauspräpariert. Die Drüsen werden samt Inhalt anschließend direkt bei -80°C eingefroren. Auf diese Weise werden 3000-4000 Drüsen gesammelt. Um Proteine und Peptide in Lösung zu bringen, werden die Drüsen in 1%-iger Ameisensäure aufgeschlossen. Die Ameisensäure bereitet ein saures Milieu, um die Aktivität der Sekret-Proteasen zu verringern.

Das so erhaltene Material wird zentrifugiert und mittels Ultrafiltration in zwei Fraktionen getrennt, in eine Proteinfraction ($\text{MW} < 10 \text{ KDa}$) und in eine Peptidfraktion ($\text{MW} > 10 \text{ KDa}$). Die Peptidfraktion wird anschließend über eine C_{18} -Säule durch *reversed-phase* Festphasenextraktion aufkonzentriert. In Abbildung 13 (S.49) ist die experimentelle Vorgehensweise zusammengefasst.

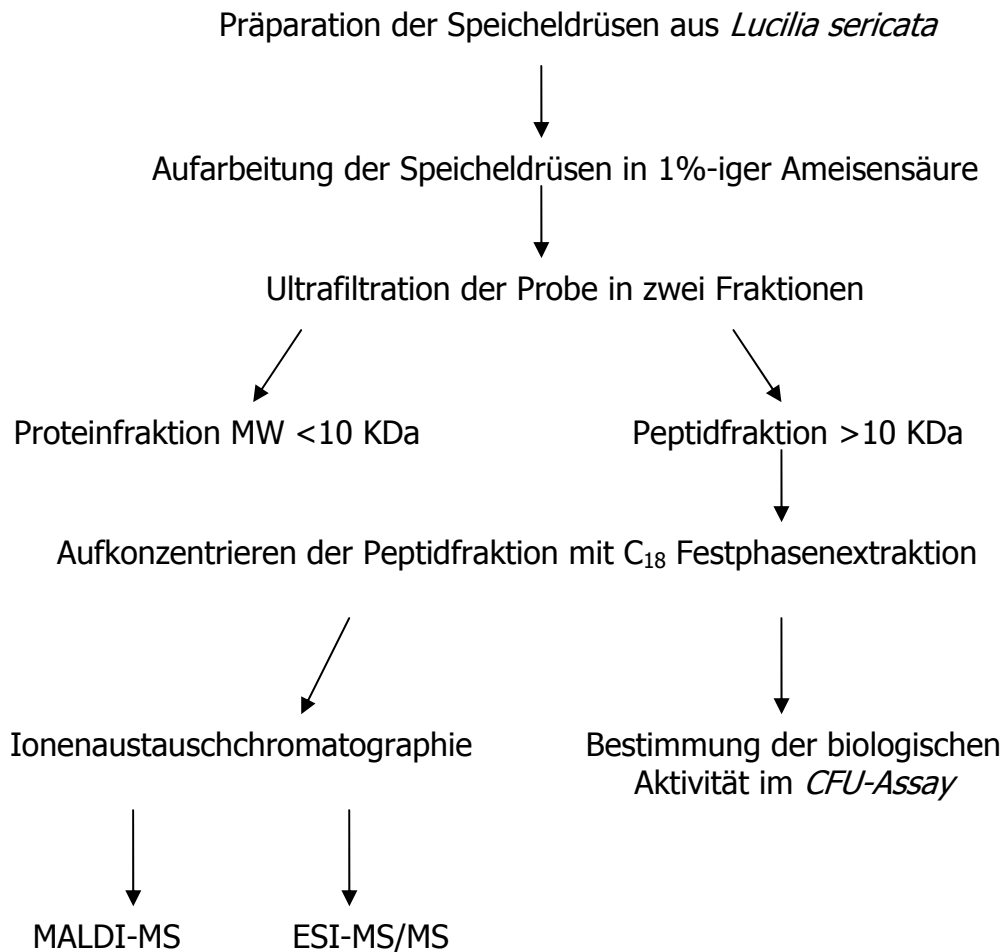


Abbildung 13: Darstellung der experimentellen Vorgehensweise zur Identifizierung des antibakteriellen Wirkstoffes aus den Speicheldrüsen.

3.1.1 Antibakterieller *Assay* unter Einsatz von Speicheldrüsensekret

Die Proben aus dem Speichelsekret wurden auf ihre Aktivität gegenüber pathogenen Erregern getestet. Dazu wird der antibakterielle Test *Colony-forming unit Assay* (CFU-*Assay*) verwendet. Beim CFU-*Assay* werden die Proben in einem Bakterienmedium mit $5 \cdot 10^4$ Bakterien aufgenommen. Im darauf folgenden Schritt wird die Probe in Verhältnissen 1:1 bis zu 1:32 mit Bakterienmedium verdünnt. Nach Inkubation über Nacht wird aus den jeweiligen Verdünnungen ein Aliquot entnommen und auf eine Müller-Hinton-Bouillon-Medium (MHB)-Platte ausplattiert. Nach einer erneuten Inkubation über Nacht werden die Kolonien auf den Platten ausgezählt. Getestet werden zum einen der Rohextrakt und zum anderen die aufkonzentrierten Peptide. Die Peptidfraktion wird mit Hilfe einer Ionenaustauschkartusche, auf Basis einer Festphasenextraktion, in eine Fraktion mit

sauren Peptiden und eine Fraktion alkalischer Peptide getrennt. Die Fokussierung auf Peptide hatte den Grund, dass bekanntermaßen die immuninduzierte Abwehr gegen Erreger in einem Insektenorganismus auf Peptidbasis erfolgt. Viele der Peptide, die die Immunabwehr gegen Bakterien durchführen, weisen eine positive Nettoladung auf, sind also „basische“ Peptide.

Vier Fraktionen werden gegen *Staphylococcus aureus* (gram-positiv) und *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativ) getestet. Als Negativkontrolle dient das kationische Peptid VTP21 (Sequenz: VPTASSRRPQRPHRVHSLTA), welches keine antibakterielle Wirkung hat.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Ergebnis des *CFU-Assays* mit *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*

+ = Bakterienwachstum/ - = Lyse der Bakterien/ (+) = Inhibition des Bakterienwachstums

Probe	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Verdünnung der Probe
Kontrollpeptid VTP21 mit $5 \cdot 10^4$ Bakterien	+	+	1:1
	+	+	1:2
	+	+	1:4
	+	+	1:8
	+	+	1:16
	+	+	1:32
Rohextrakt mit $5 \cdot 10^4$ Bakterien	-	-	1:1
	-	-	1:2
	-	-	1:4
	-	-	1:8
	+	(+)	1:16
	+	+	1:32
Peptidfraktion mit $5 \cdot 10^4$ Bakterien	-	-	1:1
	-	-	1:2
	+	-	1:4
	+	+	1:8
	+	+	1:16
	+	+	1:32
Basische Peptide mit $5 \cdot 10^4$ Bakterien	+	(+)	1:1
	+	+	1:2
	+	+	1:4
	+	+	1:8
	+	+	1:16
	+	+	1:32
Saure Peptide mit $5 \cdot 10^4$ Bakterien	+	(+)	1:1
	+	(+)	1:2
	+	+	1:4
	+	+	1:8
	+	+	1:16
	+	+	1:32

Die Tabelle 4 (S.51) zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsmessung. Zwei Proben zeigen über mehrere Verdünnungsstufen Aktivität im Sinne einer Lyse der Bakterien. Der Rohextrakt zeigt bei beiden Bakterienspezies bis zu einer Verdünnung von 1:8 eine Lyse der Keime. Bei *P. aeruginosa* wird eine Inhibition des Wachstums bei einer Verdünnung von 1:16 beobachtet. Inhibition bedeutet, dass Bakterien vorhanden sind aber sich nicht replizieren können. Im Falle der Peptidfraktion ist bei beiden

Bakterienspezies eine erhebliche Abnahme der Aktivität zu sehen. So ist die Peptidfraktion gegen *S. aureus* nur bis zu einem Verdünnungsverhältnis von 1:2 aktiv. Gegen *P. aeruginosa* ist das Speicheldrüsensekret nur noch bis zu einer Verdünnung von 1:4 aktiv. Die Peptidfraktion verliert gegenüber dem Rohextrakt um die Hälfte ihrer Aktivität. Gegenüber *S. aureus* zeigt weder die Fraktion mit sauren Peptiden noch die Fraktion mit basischen Peptiden Aktivität. Im Gegensatz zu *S. aureus* wird bei *P. aeruginosa* eine Aktivität, in Form einer Inhibition des Bakterienwachstums, bei einer Verdünnung von 1:1 der basischen Fraktion detektiert. Die Fraktion mit sauren Peptiden zeigt ein ähnliches Ergebnis, nur wurde hier die Inhibition in einer Verdünnung im Verhältnis von 1:2 beobachtet.

3.1.2 Die Fraktionierung der Peptide

Das Ergebnis aus dem antibakteriellen *Assay* machte deutlich, dass die Peptidfraktion aus den Speicheldrüsen eine antibakterielle Wirkung hat. Die Peptidfraktion zeigt eine Lyse bzw. ein Inhibition des Bakterienwachstums. Um die Träger der biologischen Aktivität zu identifizieren, wird die Peptidfraktion chromatographisch aufgetrennt. Zur Aufreinigung wird zunächst mit einer Ionenaustauschchromatographie begonnen. Das charakteristische Prinzip für den Ionenaustausch ist die reversible ionische Bindung der Analyte, d.h. die Trennung von geladenen Molekülen. Eine Trennung des Substanzgemisches erfolgte dann, wenn die einzelnen Komponenten sich in ihren elektrischen Eigenschaften so unterscheiden, dass sie unterschiedlich stark an den Austauscher gebunden werden. Beim durchgeführten Versuch wird ein Kationenaustauscher in Verbindung mit einem Mikro HPLC System verwendet. Die jeweilige Probe wird in 30%-igen Acetonitril und 20 mM Phosphorsäure aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Das Eluieren der Probe erfolgt mit Phosphorsäure und Ammoniumchlorid und die UV-Detektion erfolgt bei 214 nm.

Abbildung 14 (S.53) zeigt das Ergebnis der Reinigung der Peptidfraktion mit einem Kationenaustauscher. Es ist zu erkennen, dass in der Peptidfraktion eine Reihe basisch geladener Peptide vorhanden ist. Die Peptide eluieren über einen Zeitraum von 2 bis zu 25 Minuten bei steigendem Salzgehalt. Es ist eine deutliche Komplexität geladener Moleküle zu erkennen. Die getrennt Peptidfraktion wird fraktioniert, gesammelt und für die Analyse mittels MALDI-MS vorbereitet.

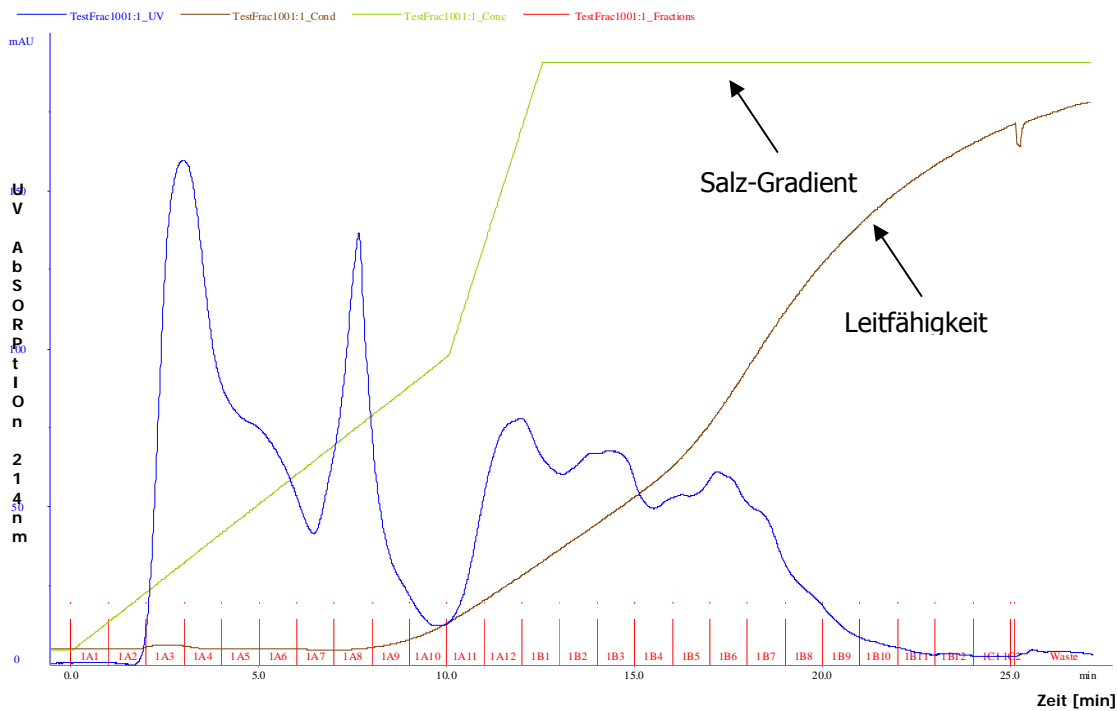


Abbildung 14: Kationenaustauschchromatographie der Peptidfraktion (grün= Gradient; braun= Leitfähigkeit).

3.1.3 Die MALDI-MS Analyse

Die gesammelten Fraktionen werden mittels MALDI-MS vermessen. Die Messung wird durchgeführt, um zu klären, in welchem Massenbereich sich die Peptide befinden und um zweitens nachzuweisen, ob es sich tatsächlich um Peptide handelte. Bei der Betrachtung der MALDI-Spektren fällt auf, dass in jeder Fraktion viele Peptide mit unterschiedlichen Massen vorhanden sind. Die Massen streuen im Größenbereich zwischen 0,9 und 3,5 KDa. Die Abbildung 15 (S.54) zeigt exemplarisch ein MALDI-Spektrum aus der Fraktion (A3) der HPLC-Trennung. Im MALDI-Spektrum werden Massen zwischen 1000 und 1400 Da registriert. Die Ergebnisse der MALDI-Analysen der verschiedenen Fraktionen zeigen, dass in jeder Fraktion mehr als 10 Peptide vorhanden sind. Ein Indikator für das Vorhandensein von Peptiden in der Probe ist das Auftauchen von $M+H$ -Ionen und $M+Na$ -Ionen. Diese Ionen konnten wir in unseren Spektren wieder finden.

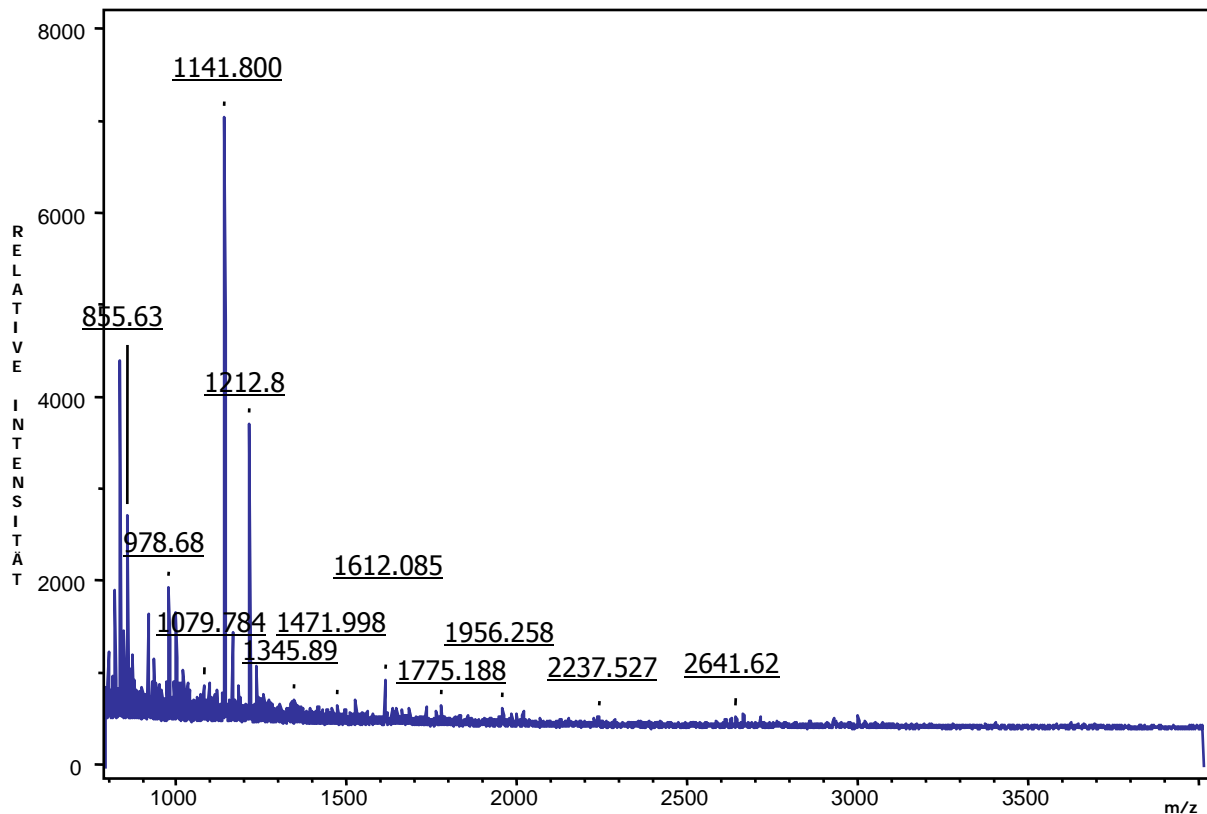


Abbildung 15: Das MALDI-MS-Spektrum der Peptidfraktion A3 (siehe Abbildung 15). Die Peptide wurden über einen Kationenaustauscher getrennt. Es dominieren Peptide mit $MH < 2000$

3.1.4 Elektrospray-Ionisation-MS/MS Analyse

Nachdem die aufkonzentrierten Peptide über eine Mikro-HPLC (Kationenaustauschchromatographie) fraktioniert werden konnten sollte versucht werden, Hauptkomponenten durch LC-ESI-MS/MS *de novo* zu sequenzieren und damit zu identifizieren. Dazu werden drei HPLC-Fractionen zu einer Fraktion vereinigt und diese dann über eine Nano-LC mit Qtof-Elektrospray-MS vermessen. Unter CID- (*collision-induced-dissociation*) Bedingungen kommt es zu einer Fragmentierung der Peptide in der Kollisionzelle, so dass man nach TOF-Trennung der Fragmente Sequenzinformationen der jeweiligen Peptide erhält. Mit den erhaltenen Aminosäuresequenzen wird in der Datenbank von *Drosophila melanogaster* nach homologen Proteinen bzw. Peptiden gesucht. Die Analyse war erfolgreich in der Hinsicht, dass Sequenzinformationen für verschiedene Peptide ermittelt worden sind. Für einen großen Teil der Peptide konnten keine ausreichende Sequenzinformation erhalten werden, da die MS/MS-Spektren nicht aussagekräftig genug waren. Deshalb konnten diese Peptide bei der Datenbanksuche nicht berücksichtigt werden. Im

Folgenden sind die Ergebnisse der Datenbanksuche mit einem eindeutigen Sequenzvorschlag in Tabelle 5 (S.57) zusammengefasst. In der Tabelle werden die jeweilige Peptidsequenzen, die Eigenschaften und die Funktion des identifizierten Proteins dargestellt.

In den Abbildungen 16 und 17 (S.55/56) sind die MS/MS-Spektren von zwei Peptiden aus der Fraktion A4 (Abbildung 15) dargestellt.

5 ul von 50

KOPF_6 1 (31.086) M3 [Ev151297,It50,En1] (0.050,200.00,0.200,1400.00,2,Cmp)

4: TOF MSMS 986.39ES+
22.3

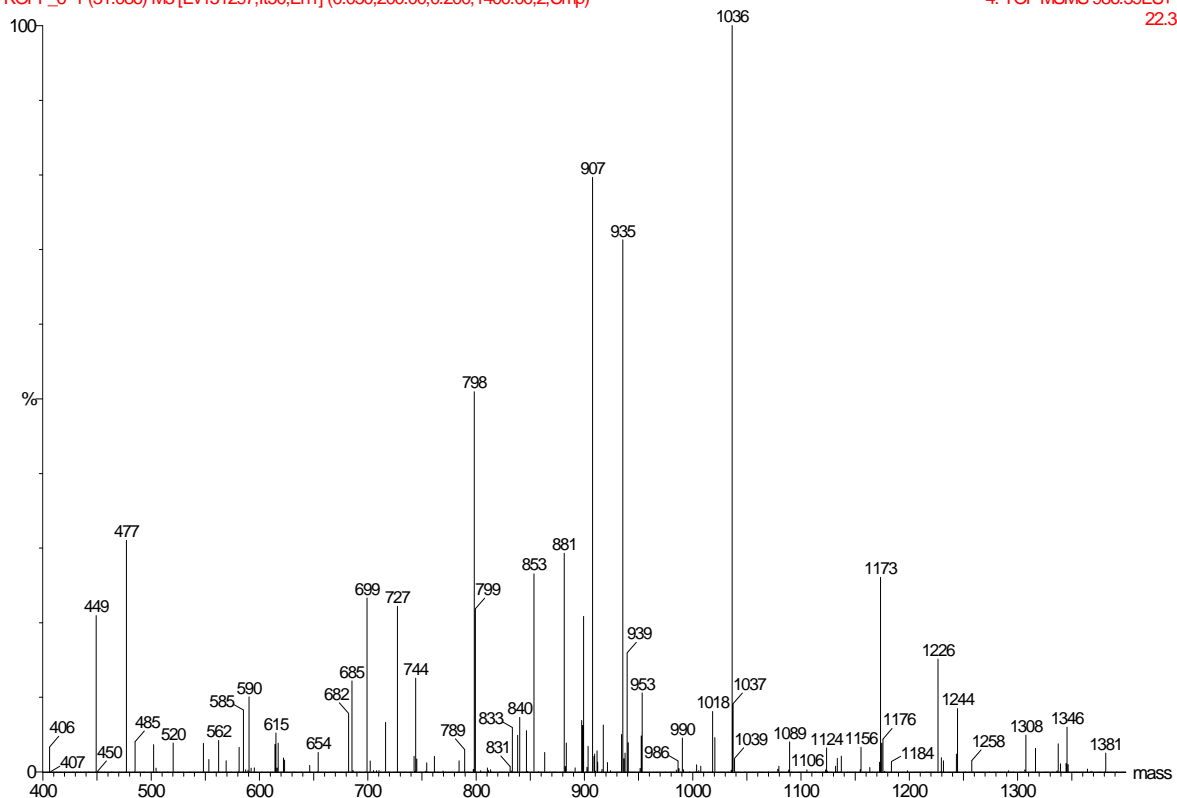


Abbildung 16: Das MS/MS-Spektrum eines Peptids mit der Masse m/z 1971 in Fraktion A4 . Die Analyse der MS/MS-Daten ergab den Sequenzvorschlag: **YFFFFLNLQLFKCV**

5 of 50

KOPF_3_1 (16.941) M_k [Ev410081,It50,En1] (0.050,200.00,0.200,1400.00,2,Cmp); Sm (Mn, 2x3.00)

2: TOF MS/MS 581.20ES+

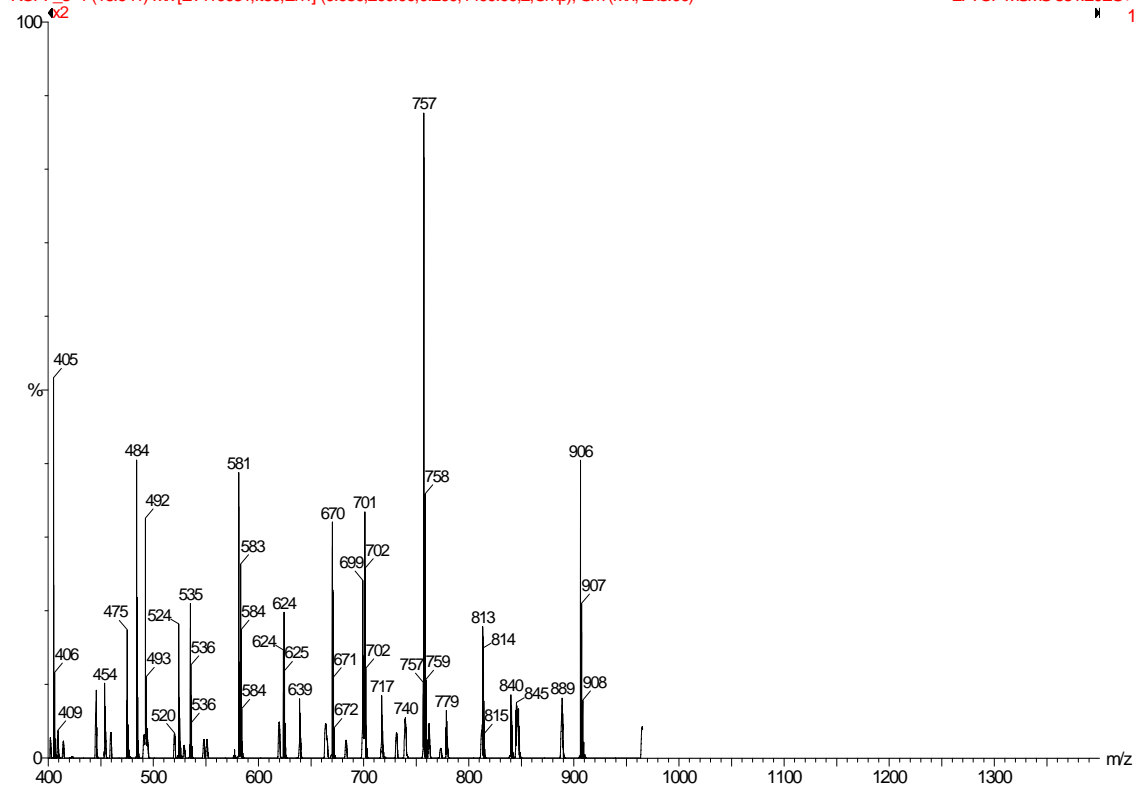


Abbildung 17: Das MS/MS-Spektrum eines Peptids mit der Masse m/z 2321,8 in Fraktion A5.. Die Analyse der MS/MS Daten ergab den Sequenzvorschlag: **RRESREGRRRRRRRRARRRRRTAG**

Die Mehrzahl der Proteine, die über die Peptidomanalyse des Speicheldrüsensekrets identifiziert werden konnten, können entweder zum Stoffwechsel oder sind am Vorgang der Transkription und Translation zugeordnet werden. Ein gemeinsames Merkmal aller charakterisierten Proteine ist ihr basischer pH-Wert. Eine Ausnahme stellt die Decarboxylase dar, die einen leicht sauren pH-Wert aufweist. Das Molekulargewicht der identifizierten Proteine liegt zwischen 26 und 137 KDa. Als Ausnahme ist hier ein Protein der Masse 5,5 KDa zu nennen. Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass zwei der identifizierten Proteine im Kontext dieser Arbeit von Interesse sind. Dem Peptid (Protein) mit der Sequenz YFFFFLNLQLFKCV konnte ein Protein zugeordnet werden, das einen hohen Anteil aromatischer Aminosäuren aufweist, wie sie für einige antibakterielle Peptide typisch sind. Die Funktion des Proteins in *Drosophila* ist aber noch nicht geklärt. Das Peptid mit der Sequenz RRESREGRRRRRRRRARRRRRTAG konnte dem Protein Inhibin zugeordnet werden, welches in Insektenzellen das Zellwachstum stimuliert.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Das Ergebnis der Datenbanksuche Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von Peptiden, die eine eindeutige Sequenzvorschlag aus dem MS/MS-Spektrum ergaben. (AA= Aminosäuren)

Peptidsequenz	Länge	Molekular- gewicht [KDa]	pI	Funktion
YFFFFLNLQLFKCV	49 AA	5,5	8,77	In <i>Drosophila</i> noch nicht bekannt
RRESREGRRRRRRRRRARRRRRT AG	946 AA	108,8	9,62	Inhibin β -Untereinheit [Protein] Am Zellwachstum entscheidend beteiligt
QSTNQFNY	264 AA	30,2	6,9	CG17189-PA Transkriptionsfaktor
RDERRRLRLMTQ	236 AA	26,3	5,41	Dopa-Decarboxylase (Stoffwechselprotein)
LELYLLEFELLLFEVTN	2272 AA	26	8,42	CG14967-PA Am Vorgang der Transkription beteiligt
RRRRRRELGYREQ	822 AA	94,5	9,07	Komplex Protein 3
FYLLVFLLLDYKFYRLMY	477 AA	55	8,41	Protein LP11230p ist an der Transkription beteiligt
KRRRLRAQ	1091 AA	124,1	8,27	Protein ist ein Transposonelement
SQLLTLLYRDLLLVLLEYFENLYL LWLA				Die Sequenz kann keinem homologen Protein in <i>Drosophila</i> zugeordnet werden
YFLLTGRLRSVALLQL	1233 AA	137,7	9,06	Proteinfragment ENSANGP00000020064 ist an der Proteinbiosynthese beteiligt
RLMRRLRSQ				Die Sequenz kann keinem homologen Protein in <i>Drosophila</i> zugeordnet werden

Die Sequenzen von zwei Peptiden können überhaupt keinen homologen Proteinen zugeordnet werden, so dass die Funktion dieser Proteine nicht angegeben werden kann.

Eine Identifizierung bekannter antibakterieller Proteine/Peptide wird durch die MS/MS-Datenbanksuche nicht erreicht.

3.1.5 Diskussion

Im Rahmen einer Peptidomanalyse des Speicheldrüsensekrets von *Lucilia sericata* wurden mehr als 11 Peptide erfasst, deren Sequenzvorschläge sie Proteine zuordnen ließen, die funktionell mit zentralen Stoffwechselwegen, der Transkription oder Translation in Zusammenhang stehen.

Dieses Ergebnis ist teilweise zu erwarten, wenn man davon ausgeht, dass die Larven sich im Wachstum befinden und so diese Proteine verstärkt exprimiert werden. Die Speicheldrüsen sind Organe, die in starken Maßen Proteine und Peptide sezernieren. Demzufolge ist das Gewebe dieser Drüsen reich an sekretorisch aktiven Zellen. Viele antibakterielle Peptide werden in solchen Sekretorzellen exprimiert (Hancock & Daimond 2000) und in sekretorischen Vesikeln gesammelt. Die Expression der antibakteriellen Peptide wird nicht induziert sondern läuft ständig ab (Hancock & Daimond 2000 & Kerridge A. *et al.*, 2005). Es ist durchaus denkbar, dass in den Speicheldrüsen von *Lucilia* AMPs konstitutiv synthetisiert, gesammelt und abgegeben werden und so als Bestandteil des ES-Produktes auf der Wundoberfläche wirksam sind. Der begleitend zur Peptidomanalyse durchgeführte biologische Test, zeigte eine deutliche antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* sowohl im Rohextrakt der Drüsen als auch in der Peptidfraktion. Nach Reinigung der Peptidfraktion über einen Kationenaustauscher konnten wir keine Aktivität in der getrennten Peptidfraktion mehr nachweisen. Infolge der Trennung kann die erforderliche Konzentration der Peptide, die für den antibakteriellen Effekt verantwortlich sind, so gesenkt worden sein, dass keine antibakterielle Wirkung erzielt bzw. gemessen werden konnte.

Die anschließende Analyse der Peptidfraktion brachte keinen direkten Hinweis auf ein homologes AMP aus *Drosophila*. Allerdings kann ein Sequenzvorschlag, der ein Peptid mit hohem Anteil aromatischer Aminosäuren anzeigte, einem kleinen Protein in *Drosophila* mit der Größe von 5,5 KDa zugeordnet werden. Leider kennt man die Funktion dieses Proteins/Peptids in *Drosophila* nicht. Es ist möglich, dass aus diesem Protein ein oder mehrere antibakterielle Peptide generiert werden können. Da eine Klasse von AMPs reich an aromatischen Aminosäuren ist, kann diese Sequenz durchaus zu einem antibakteriellen Peptid gehören, das von den Speicheldrüsen zusammen mit den Verdauungsenzymen bei der extrakorporalen Verdauung

sezerniert wird. Eine andere Möglichkeit wäre darin zu sehen, dass das Protein sezerniert wird und durch die Proteasen im Verdauungsssekret der Larven auf der Wundoberfläche prozessiert wird. Das Protein aus *D. melanogaster* ist kationisch, die vorgeschlagene Sequenz des Peptids nicht. Eine mögliche antibakterielle Wirkung des Peptids könnte mit einer Häufung aromatischer Aminosäuren in Zusammenhang stehen (*extended peptides*).

Leider konnte der Trennung der Peptidfraktion über einer Ionenaustauschersäule die Aktivität in der Peptidfraktion nicht mehr nachgewiesen werden. Ein Grund für die negativen Ergebnisse biologischer Tests nach partieller Peptidreinigung war sicherlich, dass nicht genug Material (Sekret) beschafft werden konnte, um die Verluste der Reinigungsschritte zu kompensieren. Es wurden 3000-4000 Drüsen aus knapp 1500 Tieren präpariert, eine größere Zahl zu präparieren war aus technischen Gründen nicht möglich.

Ein weiteres Protein, das im Rahmen dieser Peptidomanalyse identifiziert wurde, ist das Inhibin. Inhibin ist ein dimeres Glykoprotein, das aus einer α -Untereinheit und einer β -Untereinheit besteht. Interessant sind die beiden Isoformen des Proteins, Inhibin A und Inhibin B. Beide Isoformen werden von einem größeren Propeptid prozessiert. Die Größe der Proteine liegt zwischen 32-34 KDa und sie sind glykosyliert (Cook RW. *et al.*, 2004). Die β -Untereinheit des Inhibins enthält ein homodimeres Protein, das als Activin bezeichnet wird. Beide Proteine sind typische Vertreter der *Transforming growth factor* β (TGF β) Superfamilie (Cook RW. *et al.* 2004). Activin hat viele physiologische Aufgaben im Organismus. Eine wichtige Rolle spielt das Activin bei der Wundheilung. Da bekannt ist, dass die Larven der Schmeißfliege *Lucilia sericata* einen wundheilungsfördernden Effekt haben, ist das Activin ein wichtiger Hinweis den es gilt im Kontext der Wundheilung näher zu betrachten.

Das Activin aus den Maden könnte die Wirkung des Wirtactivins in der Wunde verstärken.

Bis heute sind drei unterschiedliche Formen des Activin bekannt, das Activin A ($\beta\alpha\beta\alpha$), das Activin B ($\beta\beta\beta\beta$) und das Activin AB ($\beta\alpha\beta\beta$) (Munz B. *et al.*, 1999). In *in-vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass Activin in Fibroblasten und aktivierten Makrophagen exprimiert wird. (Erämna M. *et al.*, 1992 & Hübner & Werner 1996). Trotzdem stellt sich die Frage, welcher Faktor die Expression von Activin im Wundgewebe induziert. Man weiß, dass eine positive Regulation der

Expression von Activin durch das Zytokin Interleukin-1 und durch den Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) stattfindet (Munz B. *et al.*, 1999). Unmittelbar nach der Entstehung einer Wunde kommt es zu einer erhöhten Expression von Zytokinen und gleichzeitig zur Expression von Activin in der Wunde (Hübner G. *et al.*, 1996). Cytokine spielen also eine mögliche wichtige Rolle bei der Induktion des Activin während der Wundheilung (Munz B. *et al.*, 1999).

Mumcuoglu *et al.* (2000) konnte in einer *in-vitro* Studie nachweisen, dass im ES-Produkt der Larve *Lucilia sericata* spezielle Zytokine mit sezerniert werden. In seiner Studie konnte er Interleukin-10 nachweisen (Mumcuoglu *et al.*, 2000/ Vortrag auf der 5-ten internationalen Konferenz der Biotherapie). Die Zytokine sind ein weiterer Faktor, der die schnelle Bildung von Granulationsgewebe in der Wunde fördert (Grassberger M. *et al.*, 2003). Man kann davon ausgehen, dass die Larven Inhibin, Zytokine und Proteasen auf die Wundoberfläche sezernieren. Die Proteasen prozessieren aus dem Inhibin das Activin und die Zytokine erhöhen die Expression von Activin in Fibroblasten und Keratinocyten. Es ist somit ein doppelter unterstützender Effekt des ES-Produktes auf die Wundheilung zu verzeichnen. Zum einen führt das zusätzliche Activin zu einer zusätzlichen Stimulation der Keratinocyten-Proliferation und Differenzierung (Munz B. *et al.*, 1999) und zum anderen bewirken die Zytokine eine erhöhte Expression von Activin in der Wunde. Beide Effekte führen dazu, dass es zu einer vermehrten Bildung von Granulationsgewebe kommt und damit zu einer schnelleren Wundheilung. Darüber hinaus induziert das Activin extrazelluläre Matrixmoleküle (Munz B. *et al.*, 1999). Dabei kommt es zu einem stimulierenden Effekt auf die Expression von Fibronectin in embryonalen 3T3 Fibroblasten (Hübner G. nicht veröffentlichte Daten). Da das ES-Produkt zu einer vermehrten Fibroblastenmigration führt (Horobin A. *et al.*, 2005), ist es durchaus plausibel, dass das Activin noch diesen zusätzlichen Effekt in der Wunde auslöst.

Eine Forschergruppe aus Kanada konnte den stimulierenden Effekt von Hämolymphe, Larvenssekreten und dem Insektenhäutungshormon 20-Hydroxyecdysol auf das Wachstum der Fibroblastenkulturen nachweisen (Prete P. 1997). Zwar entsprach die maximale Stimulation nur 12% der durch *Epidermal Growth Factor* (EGF) erreichten, jedoch stieg die Wachstumsrate von EGF stimulierenden Fibroblasten nach Zugabe von Larvenssekreten, Hämolymphe und 20-Hydroxyecdysol signifikant an. Ebenso

konnte eine Steigerung der Wachstumsrate von IL-6-stimulierten Fibroblasten unter Zugabe von Larvensekreten nachgewiesen werden (Prete P.1997).

Eine Studie mit der verwandten Schmeißfliegenart *Lucilia cuprina* konnte zeigen, dass es zu einer polyklonalen Aktivierung von T-Zellen in der Wunde kommt (Bowles VM. *et al.*, 1992).

Livingston (1932), der moderne Gründer der Madentherapie, beschrieb seine Vorstellung vom heilungsfördernden Effekt so: „.....maggots are fly embryos and, therefore, of necessity are rich in complex organic substances which, because of their embryonic nature, are growth stimulating (Livingston SK. 1932).“

3.2 Die Proteomanalyse des Exkretions-Sekretions-Produktes

Im zweiten Teilprojekt wird versucht, das Gesamtproteom des ES-Produktes von *Lucilia sericata* zu analysieren. Nach unserer Vermutung befinden sich im ES-Produkt nicht nur Proteasen (Horobin A. *et al.* 2003), sondern auch sog. Propeptide, aus denen mit Hilfe der Proteasen aktive antibakterielle Peptide generiert werden. Für diese neue Strategie wird ein klassischer Gel-basierender *Proteomics-Workflow* angewendet. Dieser beinhaltet die Gewinnung und Aufarbeitung der Proteinfraktion, die Auftrennung mittels 2D Gelelektrophorese, den tryptischen In-Gel-Verdau, eine Peptidmassenkartierung und Datenbanksuche.

In Abbildung 18 (S.62) wird ein solcher Workflow zur Analyse des Gesamtproteoms am Beispiel des ES-Produktes von *Lucilia sericata* gezeigt.

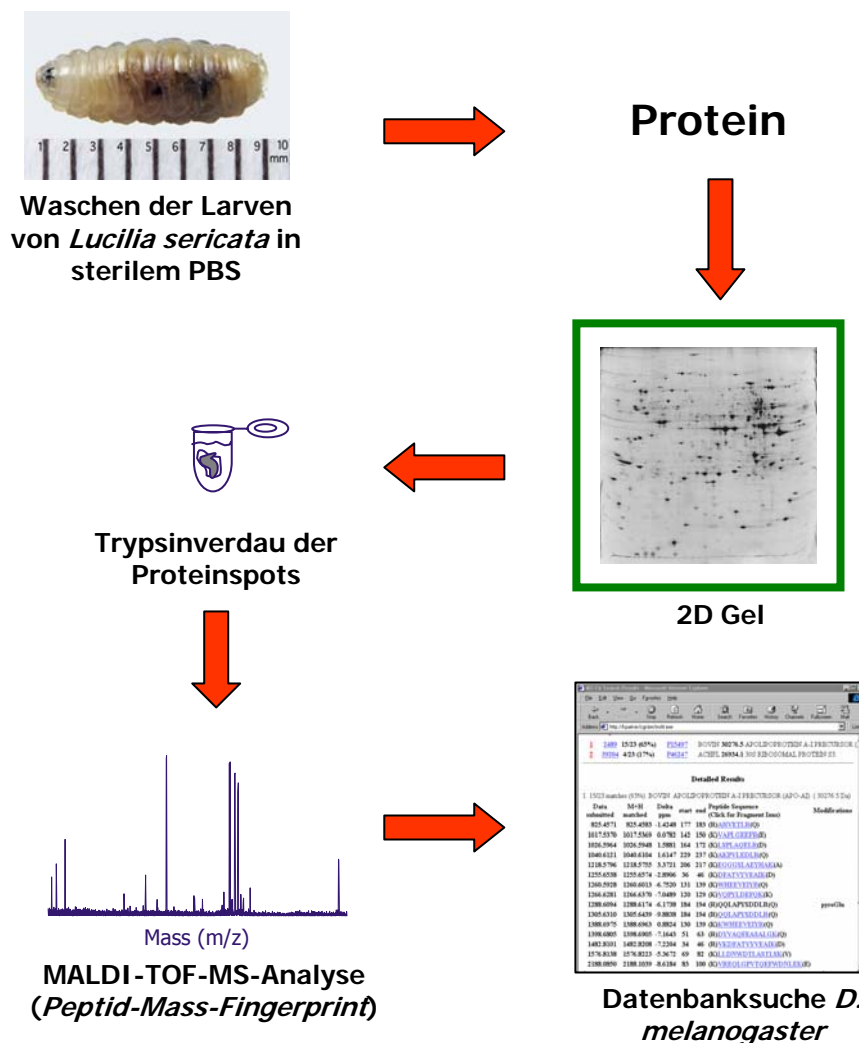


Abbildung 18: Ablauf der Analyse des Gesamtproteoms am Beispiel des ES-Produktes von *Lucilia sericata*.

3.2.1 Identifizierung der Proteine im ES-Produkt

Um Proteine aus dem ES-Produkt zu gewinnen, werden die Fliegenlarven in sterilem PBS bzw. Wasser gewaschen und die Waschlösung (ES-Produkt) gereinigt. Die gereinigten Proteine werden in einem 2D-Gel aufgetrennt, die Coomassie-gefärbten Proteinspots gestochen, mit Trypsin verdaut und mittels MALDI-TOF-MS vermessen. Die Identifizierung der jeweiligen Proteine erfolgt über *Peptidmassenkartierung* und eine anschließende Datenbanksuche (*Peptid-Mass-Fingerprint* [PMF]). Die Suche nach homologen Proteinen wird in der Datenbank von *D.melanogaster* durchgeführt. Abbildung 19 (S.64) zeigt das Ergebnis anhand eines 2D-Gels der Proteine im ES-Produkt. Der globale Proteomansatz ergibt, dass es sich bei dem Proteingemisch im ES-Produkt um eine außerordentliche komplexe Mischung handelt. Es konnten knapp 200 Proteine im Gel detektiert und für die Identifizierung gestanzt werden. Auffällig bei der Verteilung der Proteine im Gel ist die Tatsache, dass die meisten Proteinspots im basischen Bereich des Gels lokalisiert sind. Es fällt gleichfalls auf, dass das Größenspektrum zu kleinen Proteinmassen verschoben ist (20-40 KDa). Proteine, die größer als 40 KDa, befinden sich überwiegend im basischen Bereich des Gels. Proteine unter 20 KDa sind im basischen Bereich des Gels erheblich mehr vertreten als im sauren Bereich.

Die Datenbanksuche auf der Grundlage des *D. melanogaster*-Genoms führte zwar zur Identifizierung einer ganzen Reihe von Proteinen jedoch ist der Erfolg eingeschränkt. Beide Fliegenarten gehören zwar zu den sog. *Diptera*, aber das Genom von *Lucilia* ist nicht sequenziert. Die Datenbanksuche blieb damit auf hoch konservierte homologe Proteine beschränkt.

Der größte Teil der identifizierten Proteine sind Enzyme, die Funktionen im Stoffwechsel wahrnehmen. Daneben findet man auch Proteine, die an der Entgiftung beteiligt sind, aber auch Proteine wie Aktin oder Tropomyosin. Einige Proteine gehörten funktionell zu anderen Proteingruppen. Die Exodeoxyribonuklease, die Aminopeptidase, das Tropomyosin I und als interessanter Befund das Dermaseptin. Die Exodeoxyribonuklease und die Aminopeptidase sind im basischen Bereich des Gels zu finden, während das Tropomyosin im sauren Bereich und das Dermaseptin im schwach basischen Bereich lokalisiert sind. Die Datenbankeinträge zeigen die Eigenschaften und die jeweilige Funktion der Proteine an. Exemplarisch zeigt

Abbildung 20 (S.65) vier Proteine (s.o.), ihre Verteilung im Gel, die Eigenschaften und die Funktion der Proteine im Organismus. Eine Liste weiterer signifikant identifizierter Proteine ist in Tabelle 6 (S.67) zusammengefasst.

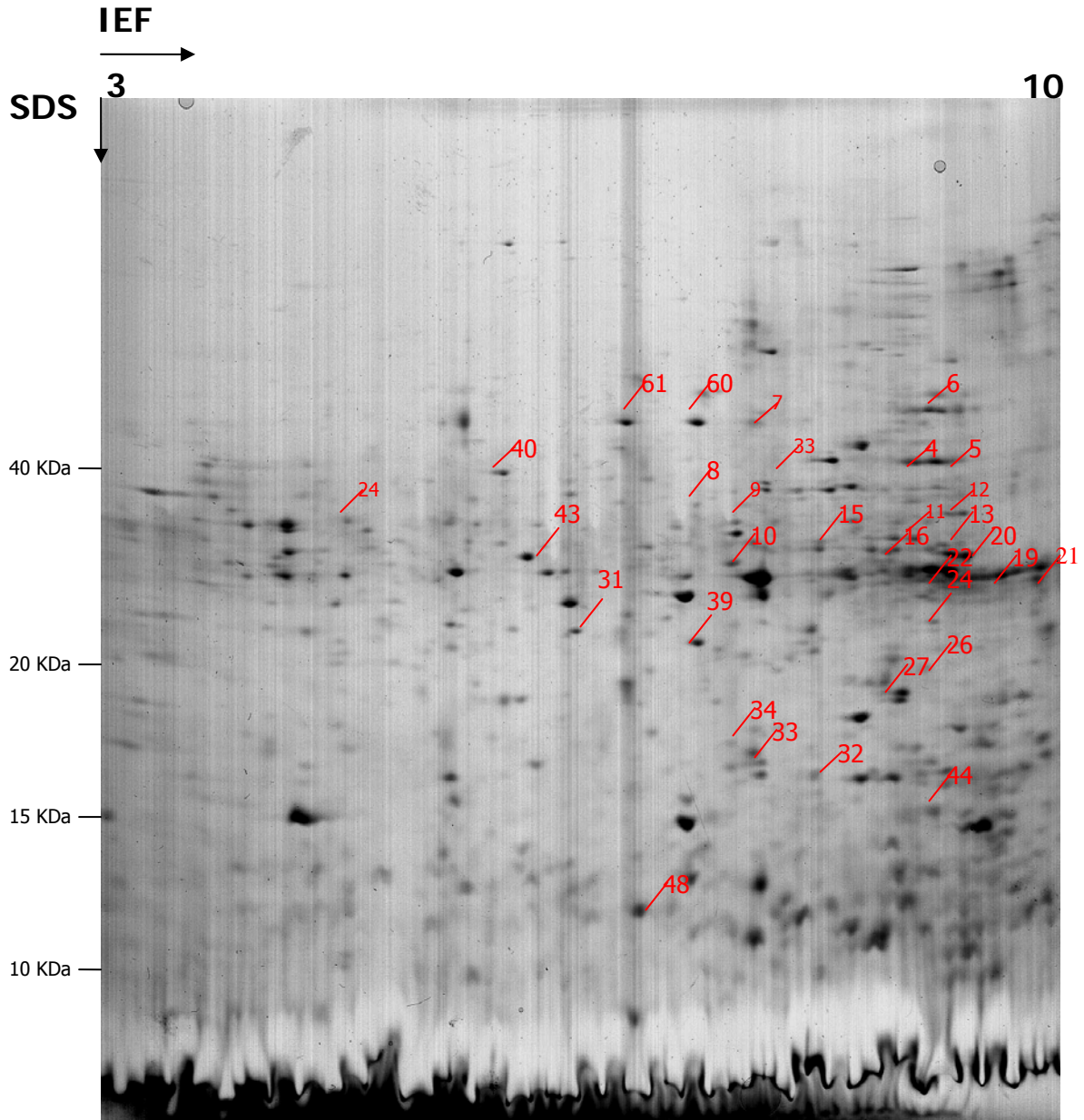
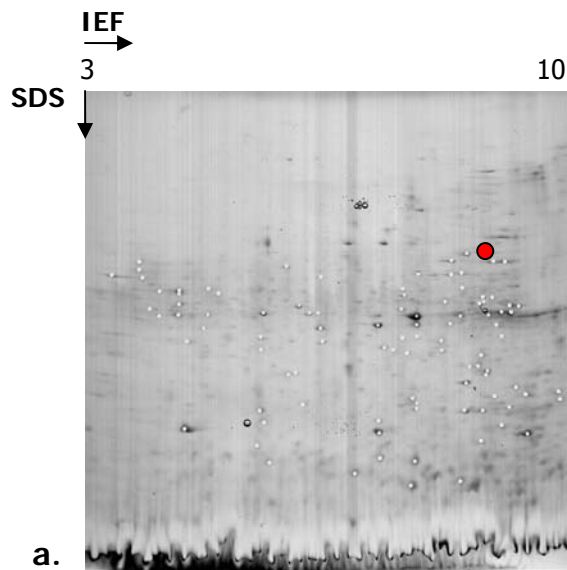
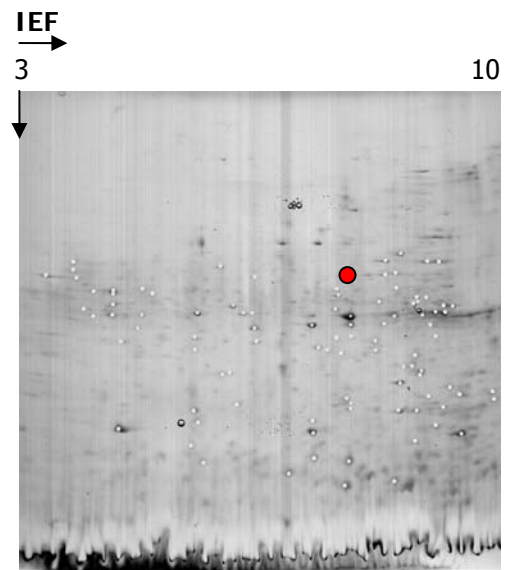


Abbildung 20: Zweidimensionale IEF/PAGE der Proteine aus dem ES-Produkt von *Lucilia sericata*. Dargestellt ist ein 12,5%-iges Gel auf das 240 µg Protein aufgetragen wurden. Das Gel wurde mit Coomassie-gefärbt. Die Auftrennung der Proteine des ES-Produktes zeigt ein komplexes Gemisch aus Proteinen bis zu 10 kDa. Viele der detektierten Proteinspots sind zwischen 20 und 40 kDa zu finden. Insbesondere im basischen Bereich des Gels sind viele Proteine lokalisiert. Die Verteilung der Proteinspots geht im basischen Bereich bis zu 10 kDa während im sauren Bereich erheblich weniger Proteine unter 20 kDa zu finden sind. Oberhalb von 40 kDa findet man Proteine fast nur noch im basischen Bereich des Gels. (IEF= Trennung der Proteine nach Ladung (Isoelektrische Fokussierung)/ SDS-PAGE= Trennung der Proteine nach Größe)



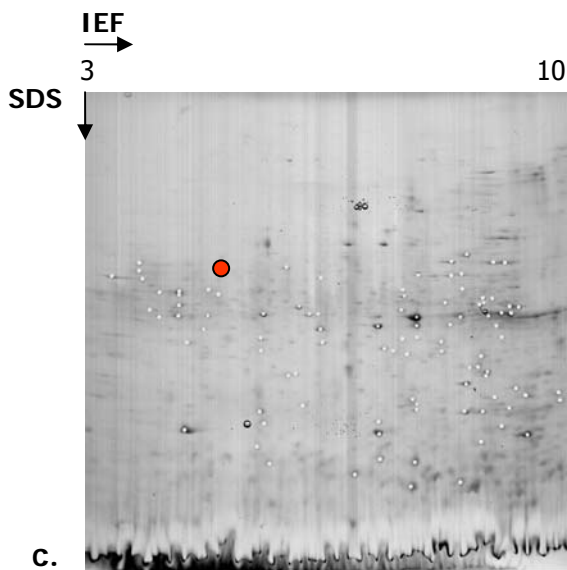
a.

Datenbankeintrag: Exodeoxyribonuklease
Eigenschaften des Proteins:
 Länge: 413 AA
 MW: 41,2 KDa
 pI: 9,25
Funktion:
 Spaltet die DNA an der Purin-Pyrimidin-Seite.



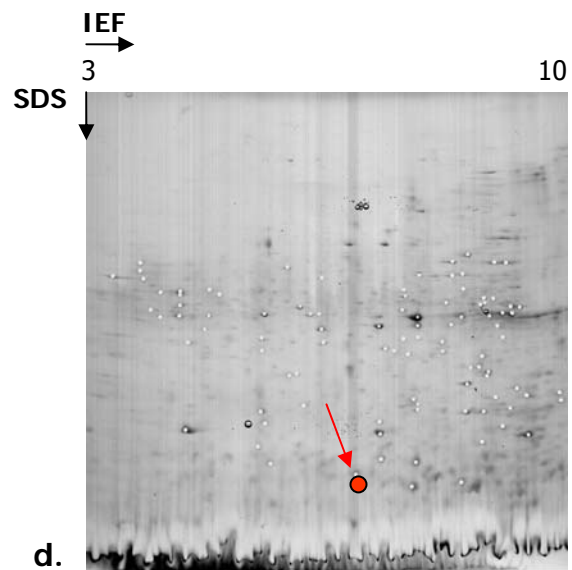
b.

Datenbankeintrag: Leu-Aminopeptidase (Metalloprotease)
Eigenschaften des Proteins:
 Länge: 393 AA
 MW: 34,5 KDa
 pI: 8,9
Funktion: Ist an Prozessierung von Proteinen beteiligt, indem sie diese spezifisch am N-Terminus spaltet.



c.

Datenbankeintrag: Tropomyosin I
Eigenschaften des Proteins:
 Länge: 285 AA
 MW: 29,4 KDa
 pI: 4,7
Funktion:
 Muskelkontraktion/Cytoskelett. Ist an der Phagozytose beteiligt



d.

Datenbankeintrag: Dermaseptin
Eigenschaften des Proteins:
 Länge: 77 AA
 MW: 8,5 KDa
 pI: 5,12
Funktion:
 Das Protein ist **Propeptid** für ein **antibakterielles Peptid**. Aktiv gegen gram-positive und gram-negative Bakterien.

Abbildung 21: Beschreibung der Abbildung siehe Seite

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 21: Die Abbildung zeigt 2D Gelbilder des ES-Produktes. In Abbildung 21 (a) ist Position des Proteins Exodeoxyribonuklease im Gel zu sehen. Es ist 41 KDa groß, basisch und hat die Funktion DNA hinter den Purin- bzw. Pyrimidinbasen zu spalten. Abbildung 21 (b) zeigt die Position der Leu- Aminopeptidase. Das Protein ist 34 KDa groß und basisch. Die Aminopeptidase ist an der Prozessierung von Proteinen beteiligt, indem sie Proteine spezifisch spaltet. Abbildung 21 (c) zeigt die des Muskelprotein Tropomyosin I. Tropomyosin I ist leicht sauer und knapp 33 KDa groß. Seine Funktion nimmt es im Muskel wahr, wo es entscheidend an der Kontraktion beteiligt ist. Abbildung 21 (d) zeigt das Propeptid Dermaseptin. Dermaseptin ist leicht sauer und ein sehr kleines Protein von 8,5 KDa. Durch enzymatischen Abbau ist es möglich, antibakterielle Peptide zu generieren. Anzumerken ist hierbei, dass die Daten für das Protein nicht aus der Datenbank von *Drosophila* stammen, sondern aus der Datenbank für Amphibien (Score 48).

Die Tabelle 6 (S.67) enthält alle relevanten Daten, die zur Identifizierung der Proteine herangezogen werden konnten. Einige der identifizierten Proteine findet man in verschiedenen Spots wieder. Der Grund hierfür liegt darin, dass Proteine eine Veränderung ihrer physikochemischen Eigenschaften durch posttranslationale Modifikation erfahren haben. Das bedeutet, dass sich durch die Veränderung des *pI*s und des Molekulargewichtes der Spot im Gel verschiebt. Ein anderer Grund ist die biologische Prozessierung von Proteinen durch Proteasen. Diese Gründe machen sicherlich eine Interpretation der 2D-Gelexperimente schwieriger, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Teil der Proteine durch Proteolyse teilweise abgebaut werden.

Die Suche nach homologen Proteinen in der Datenbank von *D. melanogaster* für Proteine unter 20 KDa hatte keinen Erfolg. Aus diesem Grund suchten wir in anderen Datenbanken nach eventuellen homologen Proteinen. In der Datenbank der Amphibien fanden wir den Hinweis auf das Propeptid Dermaseptin, aus dem antibakterielle Peptide generiert werden.

Der Fokus beim Proteomansatz lag auf der Identifizierung von biologisch aktiven antibakteriellen Proteinen/Peptiden.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6: Liste der statistisch signifikanten identifizierten Proteine aus dem ES-Produkt von *Lucilia sericata*. Die Proteinspots stammen aus der SDS-PAGE-Analyse, welche in Abbildung 20 dargestellt ist. CG= Beschreibt die Gennummer aus dem komplett sequenzierten Genom von *Drosophila melanogaster*; SWISS-PROT= Nummer in der Datenbank SWISS-PROT, unter dem das Protein verzeichnet ist. Masse= Größe des Proteins gemessen mit MALDI-TOF-MS; pI-Wert= Gibt den in der Datenbank für das Protein angegebenen pI-Wert an. Die identifizierten Proteine hatten einen Score von 65 oder in der Datenbank von *Drosophila*. In der Datenbank für Amphibien hatte das identifizierte Protein Dermaseptin einen Score von 48.

Spots	Gen Name	SWISS PROT	Masse [Da]	pI-Wert	Protein Name
9	CG8992	P10333	28916	10.0	Speicheldrüsen spezifisches Peptid 26A
11	CG8937	P29843	48174	5.0	Hsp70-Protein
12	CG11793	P61851	15705	8.0	Cu/Zn-superoxid-Dismutase
4	CG11154	Q05825	54074	5.0	ATP-Synthase beta Kette [Propeptid]
5	CG8189	Q94516	53544	5.0	ATP-Synthase beta Untereinheit
6	CG12101	P35380	9134	5.0	Aktin E3
7	CG10777	Q9W3M7	41995	5.0	Aktin E2
16	GA15350	Q296S7	82580	5.0	GA154350 Protein
40	CG32031	P48610	40126	6.0	Arginin-Kinase
32	AT28277	Q8T3N2	45271	10.0	AT28277-Protein
24	CG4898	P06754	39405	5.0	Tropomyosin I
21	CG10287	Q9VNL0	29372	5.0	CG10287 Protein
44	CG3612	P35381	59612	10.0	ATP-Synthase alpha Kette mitochondriales Propeptid
20	CG3560	Q9VXI6	13617	8.0	Cora A Familie mitochondriales Membranprotein
19	CG7642	Q5IEV2	56820	6.0	Xanthin Dehydrogenase
34	LD08911	Q8SXN0	8408	12.0	LD08911-Protein
26	GA18143	Q29J93	104131	5.0	GA18143-Protein
8	CG9125	Q9VXA8	43332	9.0	CG9125-Protein
39	CG11808	Q9V797	25697	11.0	CG11808-Protein
10	CG5320	P54385	61442	9.0	Glutamat Dehydrogenase
13	CG3881	Q9VLA1	38115	9.0	UDP-Glucuronosyltransferase S
61	GA17736	Q29IJ0	50341	9.0	GA17736-Protein
43	CG17654	Q29J18	46861	6.0	CG17654-Protein
31	CG2674	P40320	22536	6.0	Glutathion-S-transferase
27	CG9245	P13706	39325	9.0	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
22	CG3127	Q01604	44236	8.0	Phosphoglycerat-Kinase
15	CG10501	P18486	38620	6.0	Alpha-Methyldopa-Hypersensitives Protein
60	AT37597	P4568	41151	9.0	Exodeoxyribonuklease
33	CG6291	Q9VJG0	34543	9.0	Leu-Aminopeptidase
48	CG1805	Q93226	8464	5.0	Dermaseptin

3.2.2 Diskussion

Berücksichtigt man die Datenbanksituation, war die Proteomanalyse des ES-Produktes durchaus erfolgreich. Es wurden 30 Proteine von über 200 im Gel detektierten Proteinspots sicher identifiziert. *Drosophila* und *Lucilia*, trotz ihrer taxonomischen und anatomischen Unterschiede, weisen einen hohen Grad an homologen Proteinen auf. Ein großer Teil der identifizierten Proteine stellt Enzyme dar. Dies war zu erwarten, da die Larven von *Lucilia sericata* auf eine extrakorporale Verdauung angewiesen sind. Das bedeutet, dass sie ihre Nahrung außerhalb des Körpers enzymatisch vorverdauen müssen, um sie aufnehmen zu können. Das ES-Produkt, das auch Enzyme aus dem Darm der Tiere enthält, sollte daher reich an Hydrolasen sein. Es ist bekannt, dass im ES-Produkt eine Serinprotease und eine Aminopeptidase vorhanden ist (Horobin A. *et al.*, 2003). Die Aminopeptidase konnte auch in unserer Proteomanalyse identifiziert werden. Die Aufgabe beider Proteine ist die Spaltung von Proteinen der Extrazellulären Matrix (ECM). Die Serinprotease erfüllt dabei eine besondere Rolle. Neuere Arbeiten zeigen, dass die Aktivität der Serinprotease mitverantwortlich ist für das Auslösen einer Fibroblasten-Migration (Horobin A. *et al.*, 2005). Die Protease spaltet Fibronectin, eine Komponente der ECM. Durch die enzymatische Spaltung entstehen Fibronectin-Fragmente die eine Fibroblasten-Adesion, -Chemotaxis und -Migration auslösen (Postlethwait AE. *et al.*, 1981 & Livant DL. *et al.*, 2000). Die Serinprotease im ES-Produkt induziert die Aktivierung von sog. Protease-aktivierenden Rezeptoren (PAR) in der ECM (Horobin A. *et al.*, 2005). Die PARs sind verwickelt in die Regulation des Zellwachstums und beteiligt an der Entstehung von Entzündungsprozessen (Dery O. *et al.*, 1999). Die Arbeitsgruppe aus Nottingham geht davon aus, dass die Aminopeptidase im ES-Produkt ähnliche Effekte auslösen kann. Allerdings liegen dazu noch nicht ausreichende experimentelle Daten vor (Horobin A. *et al.*, 2005). Neben den oben beschriebenen Funktionen der Proteasen im ES-Produkt können sie auch noch andere Aufgaben wahrnehmen, wenn man an die Immunantwort gegen Mikroorganismen denkt. So findet man bei *D. melanogaster* in der Hämolymphe Serinproteasen nach der Infektion durch *S. cerevisiae*. Sie unterstützen die Immunantwort, indem sie antibakterielle Peptide prozessieren und Zytokine aktivieren (Vierstraete E. *et al.*, 2004). Tatsächlich fand man bei der Proteomanalyse der Hämolymphe von

Drosophila zwei Serinproteasen *Psh* und *Nec*. Man geht davon aus, dass *Psh* eine essentielle Komponente des *Toll Pathways* ist (Ligoxygakis P. *et al.*, 2002). *Nec* hingegen scheint eine wichtige Rolle in der proteolytischen Kaskade zu spielen, die zur Aktivierung von *Spaetzle*, des *Toll* Liganden, führt (Levy F. *et al.*, 2004). Es ist anzunehmen, dass ähnliche Prozesse auch in *Lucilia sericata* ablaufen, denn die Larven befinden sich in einer Umgebung, die mit pathogenen Mikroorganismen kontaminiert ist. Dieser Einfluss kann zur verstärkten Synthese von AMPs durch den *Toll*- bzw. *Imd*-Pathway führen. Der *imd*- und *Toll Pathway* sind im übrigen hoch konservierte Signaltransduktionswege. Man findet sie in ähnlicher Form auch in Säugetierzellen. Die Aminopeptidase kann das entsprechende Propeptid so prozessieren, dass daraus ein aktives antibakterielles Peptid entsteht, das gezielt gegen Bakterien wirkt.

Neben der beschriebenen Aminopeptidase findet man noch andere identifizierte Enzyme im ES-Produkt. Dazu zählen sicherlich die beiden Proteine Cu/Zn-Superoxid Dismutase und die Glutathion-S-Transferase. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Erkenntnis, dass die Glutathion-S-Transferase nach einer Infektion mit einem Erreger auch in der Hämolymphe von *Drosophila* zu finden ist (Vierstraete E. *et al.*, 2003). Sie spielt eine wichtige physiologische Rolle bei der Entgiftung von Peroxidase-Produkten in *Drosophila* und anderen Organismen (Vierstraete E. *et al.*, 2003). Ferner hat sie eine schützende Funktion bei oxidativem Stress (Singh SP. *et al.*, 2001). Die Cu/Zn-Superoxid Dismutase ist für die Eliminierung von freien Radikalen zuständig. Da die Larven von *Lucilia* sich in einer pathogenen Umgebung befinden, wird mit großer Wahrscheinlichkeit das Immunsystem der Larven durch die Erreger stimuliert oder aktiviert. Durch die Invasion der Erreger kommt es auch zur zellulären Apoptose und damit zur Freisetzung von Radikalen und toxischen Substanzen. In einer chronischen Wunde, in der sich die Larven bei therapeutischem Einsatz befinden, sind viele toxische Substanzen und Radikale vorhanden. Die beiden Proteine im ES-Produkt könnten schon im Vorfeld toxische Substanzen binden und eliminieren.

Wenden wir uns nun den identifizierten Stoffwechsellzymen zu. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase und die Phosphoglycerat Kinase gehören der Glykolyse an, d.h., die Enzyme sind an der Bereitstellung von Energie in Form von ATP beteiligt. Enzyme zentraler metabolischer Stoffwechselwege sind, obwohl sie

topologisch ins Cytosol gehören, häufige Komponenten in Sekretomen. Eine interessante Beobachtung stammt aus dem Immunsystem von *Drosophila*. Bei einer Infektion mit gram-positiven Bakterien wurde eine verstärkte Expression von Enzymen aus der Glykolyse beobachtet (Vierstraete E. *et al.*, 2004). In zwei anderen Studien wurde nach Infektion mit gram-negativen Bakterien eine deutliche Zunahme von Glykolyseenzymen, insbesondere die Fructose 1,6 bisphosphat Aldolase, beobachtet (Vierstraet E. *et al.*, 2003 & Levy F. *et al.*, 2004). Die Invasion von Erregern scheint eine Zunahme des katabolen Stoffwechsels zu induzieren, denn die Bekämpfung von potentiellen Erregern kostet Energie. *Lucilia* ist in der Wunde ebenfalls von potentiellen Erregern umgeben, die ihr Immunsystem heraus fordern. Demzufolge scheint es sinnvoll zu sein, dass eine erhöhte Stoffwechselrate nicht nur das Wachstum der Tiere forciert, sondern zur effektiven Immunabwehr der Larven beiträgt. Ähnliches gilt auch für die identifizierte UDP-Glucuronosyltransferase, die an der Bereitstellung von Glukose für den Stoffwechsel beteiligt ist.

Etwas anders verhält es sich mit der Glutamat Dehydrogenase. Dieses Enzym katalysiert die reversible Reaktion von Glutamat zu α -Ketoglutamat. Bei dieser Reaktion kommt es zur Freisetzung von Ammoniumionen. Es wird von mehreren Autoren vorgeschlagen, dass die Larven Ammoniumbikarbonat ausscheiden und so den physiologischen pH-Wert in der Wunde erhöhen (Baer WS., 1931; Robinson W. *et al.*, 1939 & 1940). Ammonium ist aber toxisch für die Zellen. Also muss der Organismus der Larven diese Ammoniumionen eliminieren. Folglich müssen sie ausgeschieden werden und vielleicht noch im Darm reagiert das Ammoniumion mit Karbonat das dann auf die Wundoberfläche ausgeschieden wird. Dort kann es nun seine Wirkung entfalten, indem es den pH-Wert erhöht und in einem gewissen Umfang antibakterielle Wirkung hat.

Die Xanthin Dehydrogenase ist Bestandteil des Abbaus von Nukleotiden in der Zelle. Das Endprodukt es Abbaus ist Harnsäure oder Urat. Da man annimmt, dass 2,5-Dixo-4-imidiazolidinyl-Harnstoff von den Larven ausgeschieden wird und eine wundheilungsfördernde Wirkung hat (Robinson W., 1940), scheint dieses Enzym ein Hinweis zu sein, woher der Harnstoff bezogen wird.

Die Proteomanalyse des ES-Produktes zeigte das vorliegen der Arginin Kinase an. Die Aufgabe dieses Proteins ist die Phosphorylierung von Argininresten in Proteinen. Die posttranslationale Modifikation könnte einen Schutz gegen enzymatischen Abbau

darstellen. Die Arginin Kinase phosphoryliert zum Beispiel ein antibakterielles Peptid, das im ES-Produkt lokalisiert ist, um es gegen die Aktivität von Proteasen, die im ES-Produkt zu finden sind, zu schützen. Einen ähnlichen Mechanismus findet man auch bei *D. melanogaster* nach einer Pilzinfektion. In einer Proteomstudie fand man in der Hämolymphe nach Infektion das Enzym Peptidylglycin α -hydroxy Monooxygenase (*Phm*) (Levy F. *et al.*, 2004). *Phm* führt eine C-terminale Amidierung durch, die spezifisch und notwendig ist für eine Reihe von sekretorischen Peptiden (Jiang N. *et al.*, 2000). Viele AMPs haben eine C-terminale Amidierung, die sie vor enzymatischer Proteolyse schützt (Bulet P. *et al.*, 1999).

Das Auftauchen der Proteine Aktin und Tropomyosin im ES-Produkt ist schwer zu erklären. Diese Proteine scheinen jedoch eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von infektiösen Erregern zu spielen. Wenn man Larven von *Drosophila* mit pathogenen Erregern infiziert, beobachtet man eine Zunahme des Proteins Aktin 5C in der Hämolymphe der Tiere (Vierstraete E. *et al.*, 2003). Aktin 5C ist eines von zwei Cytoskelettproteinen in der Zelle. Wenn man die Tiere einer Stresssituation aussetzt, kommt es zu einer verstärkten Synthese von Aktin (Courgeon AM. *et al.*, 1993). Vierstraete *et al.* (2004) konnte in einer Studie die Rolle von Aktin 5C bei der Immunantwort beschreiben. Das Erkennen und die Phagozytose von Mikroorganismen ist ein grundlegender Aspekt der angeborenen Immunantwort bei Insekten bis hin zum Menschen. Die Forschergruppe um den Wissenschaftler Ramet (2002) konnte zeigen, dass unter den Cytoskelettstruktur- und Regulationsproteinen, die an der Phagozytose beteiligt sind, Aktin enthalten ist. Ein Phagozytose Rezeptor steuert die Reorganisation der Cytoskelettkomponenten, die zur Ausscheidung von Fremdpartikeln führt (Ramet M. *et al.*, 2002). Für die Phagozytose sind zwei koordinierte zelluläre Prozesse entscheidend: die Veränderung des Cytoskeletts und das sogenannte Membran *trafficking*. In Vertebraten erfordert die Phagozytose in Makrophagen eine Veränderung von Aktin (Castello F. *et al.*, 2001). Behandelt man Hämocyten ähnliche SL2 Zellen von *Drosophila* mit Lipopolysacchariden (LPS), die in *D. melanogaster* das Immunsystem anregen, kommt es zu einer Stimulation der Expression von Cytoskelettproteinen (Boutros M. *et al.*, 2002). In einer *Microarray*-Studie mit *mbn-2* Zellen konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Hochregulierung von Genen kommt, die an der Cytoskelett-Organisation beteiligt sind

(De Gregorio E. *et al.*, 2001). Loseva *et al.* (2004) behandelte mbn-2 Zellen mit LPS und stellte fest, dass es zu einer verstärkten Expression von Tropomyosin/Cofilin und Profilin kommt. Alle drei Proteine sind wichtige Spieler im Zyklus der Aktin-Polymerisierung und Depolymerisierung (Baum B. *et al.*, 2001). Profilin ist in *Drosophila* und *Dictyostelium* direkt involviert im Prozess der Phagozytose (Ohashi K. *et al.*, 2000).

Das Cofilin kann in zwei Isoformen auftreten, eine phosphorylierte und eine nicht phosphorylierte Form. In der Proteomstudie von Loseva *et al.* (2004) war die phosphorylierte Form nach LPS Behandlung der mbn-2 Zellen hochreguliert. Diese Form des Cofilin inaktivierte die Aktin-Polymerisierung. Im übrigen findet man in der Hämolymphe von *D. melanogaster*, nach Anregung durch LPS, eine hohe Konzentration an Aktin 5C und Cofilin (Vierstraete E. *et al.*, 2003).

Aktin und Cofilin nehmen in *Lucilia* wahrscheinlich die gleichen Funktionen wahr, wie in *Drosophila*, denn beide Proteine kommen sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten vor. Das spricht dafür, dass diese Proteine homolog und in der Evolution konserviert worden sind. Es ist also durchaus im Bereich des Möglichen, dass in *Lucilia* diese Proteine maßgeblich an der Immunantwort beteiligt sind.

Ein weiteres häufig identifiziertes Protein ist die ATP-Synthase. Die ATP-Synthase stellt dem Organismus Energie in Form von ATP zu Verfügung. Sie nutzt dabei einen Protonenfluss, um ATP freizusetzen. Die Protonen werden von einem sekundären Transportmechanismus genutzt, der zum Beispiel Aminosäuren aus der Zelle transportiert (aus Dissertation, I. Bellahn, 2002). In *Lucilia* können Propeptide, die in der Zelle synthetisiert worden sind, über ähnliche Transporter aus der Zelle hinaus transportiert werden, um extrazellulär prozessiert zu werden.

3.2.2.1 Dermaseptin

In unserer Proteomanalyse fanden wir den interessanten Hinweis auf ein Protein mit antimikrobieller Aktivität gegen eine ganze Reihe von Mikroorganismen. In der Datenbank für Amphibien fanden wir den Hinweis auf das Protein Dermaseptin (Score von 48). Dieses kleine Protein ist 8,5 kDa groß und ist ein Propeptid für vier antibakterielle Peptide. Das Propeptid wurde bei dem südafrikanischen Frosch

Phyllomedusa sauvagii auf der Haut und im Gastrointestinalsystem beschrieben (Mor A. *et al.*, 1991 & Mor A. *et al.*, 1994). Es gehört zu einer Gruppe von AMPs, die an der Immunabwehr gegen pathogene Mikroorganismen bei Amphibien beteiligt sind. Dazu gehören die Bombinins von der europäischen Kröte *Bombina variegata* (Gibson B. *et al.*, 1991) und die gut untersuchten Maganine des afrikanischen Frosches *Xenopus laevis* (Zasloff M., 1987). Diese Peptide kommen, wie das Dermaseptin, auf der Haut und im Gastrointestinaltrakt vor. Die AMPs werden nur dann exprimiert, wenn die Tiere sich in einer Umgebung befinden, in der sich infektiöse Mikroorganismen befinden (Matutte B. *et al.*, 2000). In einer „sterilen“ Umgebung findet man keine AMPs in den Tieren (Mangoni ML. *et al.*, 2001). Gemeinsam ist allen drei Peptiden, dass sie eine linear-kationische- (besonders reich an Lysin und Arginin) Struktur haben und eine amphipatische α -helikale Konformation aufweisen, die sie für die Interaktion mit der Lipiddoppelschicht der Bakterienmembran benötigen (Mor A. *et al.*, 1994 & Rinaldi A. 2002). Damit stellen diese Peptide ein typisches kationisches antibakterielles Peptid dar. Ein Merkmal des Dermaseptins ist es, dass aus dem Propeptid mehrere Peptide generiert werden, die entweder einzeln oder zusammen gegen eine große Bandbreite von Mikroorganismen wirken (Mor A. *et al.*, 1994). Das bekannteste Peptid aus der Dermaseptinfamilie ist das Dermaseptin s1. s1 besteht aus 34 Aminosäureresten und enthält sechs Lysine und hat eine breite antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien, Hefeorganismen und Protozoen. Neben dem Dermaseptin s1 sind noch vier weitere Peptide, s2, s3, s4, s5, aus der Familie bekannt. Ihre Aminosäuresequenzen sind mit s1 bis zu 94% identisch, sind zwischen 28-34 Aminosäuren lang und besitzen 3-6 Lysinreste. Alle fünf Peptide der Familie sind aktiv gegen infektiöse Mikroorganismen. Die Effektivität der Dermaseptinpeptide erhöht sich deutlich durch die Kombination der fünf Peptidderivate (Mor A. *et al.*, 1994). Die Gründe für diesen Mechanismus sind klar. Damit sind die Tiere in der Lage sich optimal an die sich verändernde Umwelt anzupassen und damit eine schnelle und effektive Bekämpfung gegen ein breites Spektrum von pathogenen Erregern zu bewältigen (Mor. A *et al.*, 1994 & Rinaldi A. 2002).

Da bekannt ist das *Lucilia* sowohl gram-positive (z.B. *S. aureus*) und gram-negative (z.B. *P. aeruginosa*) Bakterien problemlos bekämpfen kann (Thomas S. *et al.*, 1999 & Bexfield A. *et al.*, 2004), könnten Dermaseptin-ähnliche Peptide auf unterschiedliche Mikroorganismen wirken.

Mit der vorverdauten Nahrung nehmen die Maden auch Bakterien auf, die nicht abgetötet werden. Die kontaminierte Nahrung gelangt in den Vorderdarm, wo Dermaseptin-ähnliche Peptide wirken könnten. Tatsächlich konnte eine Arbeitsgruppe aus Israel zeigen, dass die Maden mit ihrer Nahrung auch Bakterien (*E.coli*) aufnehmen, die zunächst in den Vorderdarm der Larven gelangten (Mumcuoglu KY. *et al.*, 2001).

Die Bakterien gelangen in den Mitteldarm, wo sie sich anreichern, während die Nahrung weiter verdaut wird. Mumcuoglu *et al.* (2001) konnte zeigen, dass sich die Bakterien zu Kolonien anhäufen, die je weiter diese Kolonien im Darm wandern kleiner werden. Eine Besonderheit dabei war, dass sich auf der Vorderseite des Mitteldarms die Bakterien aufkonzentrierten, während auf der Unterseite kaum Bakterien zu sehen waren. Auf der Oberfläche der Vorderseite des Mitteldarms befinden sich Lektine (Peters W. *et al.*, 1983). Da Bakterien von einer Lipopolysaccharidhülle umgeben sind, bleiben sie an der Darmwand hängen. Die Polysaccharidhülle der Bakterien bietet eine ideale Angriffsfläche für kationische α -helikale Peptide. In dem Moment, wo die Bakterien aufgrund des Lektins sich im Mitteldarm anhäufen, setzt unmittelbar der antibakterielle Effekt ein (Mumcuoglu KY. *et al.*, 2001). Im Enddarm fand man überhaupt keine Bakterien mehr. Das bedeutet, es müssen im Mitteldarm antibakterielle Stoffe vorhanden sein, welche die Bakterien abtöten. Mumcuoglu und Friedman *et al.* (1998/Vortrag auf dem 3-ten Kongress der Biotherapie) gehen beide davon aus, dass es sich dabei um ein Protein bzw. Peptid handelt. So reinigte Friedman *et al.* (1998) ein Propeptid, dem er antibakterielle Wirkung zuschrieb. Einen ähnlichen Effekt beschrieb auch eine Arbeitsgruppe aus Regensburg (Lerch K. *et al.*, 2002). Es ist nicht auszuschließen, dass das in unserer Proteomstudie gefundene Dermaseptin-ähnliche-Propeptid die wirksame Substanz darstellt, die Friedmann (1998) beschrieben hat. Aus diesem Propeptid können mehrere Peptide mit antibakterieller Wirkung generiert werden. Die Peptide könnten durch die im ES-Produkt vorhandenen Proteasen prozessiert werden. Das kann schon im Darm der Larven passieren, da dort teilweise das ES-Produkt entsteht, das die Tiere dann ausscheiden.

3.2.2.2 Der Wirkungsmechanismus

Über den Wirkungsmechanismus kationischer Peptide als antibakterielle Peptide ist intensiv geforscht worden. Der Mechanismus beginnt damit, dass das Peptid mit der Membran interagiert.

Die Peptide assoziieren mit der Membran durch elektrostatische Interaktionen zwischen den kationischen Peptiden und den anionischen Lipopolysacchariden der äußeren Bakterienmembran (Abb. 21/S.75). Diese Interaktion führt zu einer Störung des Gleichgewichts des Membranpotentials. Die kationischen Peptide haben eine höhere Affinität als die divalenten Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} in der Lipopolysaccharidschicht der äußeren Bakterienmembran (Hancock REW. *et al.*, 1999).

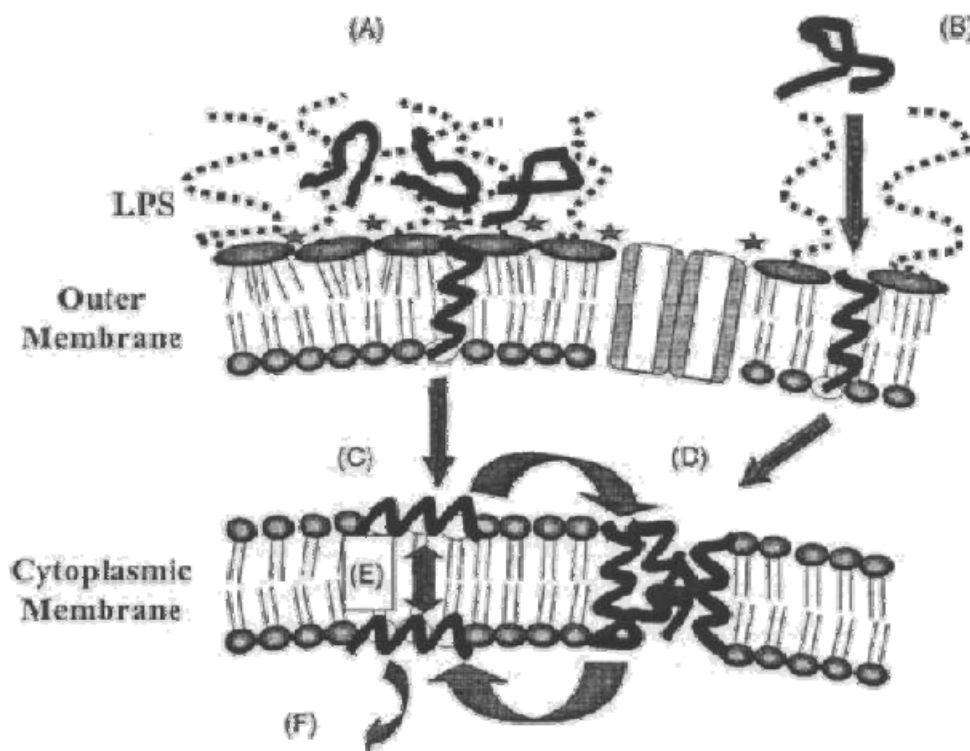


Abbildung 21: Vorgeschlagener Mechanismus der Interaktion kationischer Peptide mit der Bakterienmembran. (A) Die kationischen Peptide interagieren mit der negativ geladenen Hülle der äußeren Bakterienmembran oder neutralisieren diese Ladung. Als Folge davon entstehen Löcher in der Membran und die Peptide können in die äußere Membran eindringen. (B) Sie binden an der Bindungsstelle für divalente Kationen der Lipopolysaccharidhülle und zerstören so die Membran. (C) Nachdem die Peptide die äußere Membran passiert haben binden sie an der negativ geladenen Oberfläche der Zytoplasmamembran. Die amphipathischen Peptide verankern sich in der Oberfläche der Membran, indem sie mit den Hauptgruppen von Phosphatidylglycerol und Cardiolipin reagieren. (D) Viele Peptide bilden einen micellen-ähnlichen Komplex aus, der die Membran umspannt, und verankern sich so in die Zytoplasmamembran. (E) Es findet ein Flip-Flop Mechanismus über die Membran statt, der zu einer Veränderung des Membranpotentials führt. (F) Durch die beschriebenen Effekte von (D) und (E) gelangen die Peptide in das Zytoplasma der Bakterien. Dort dissoziieren sie von der Membran und binden an zelluläre Anionen wie DNA und RNA (Powers JPS. *et al.*, 2003 & Hancock REW. *et al.*, 1999).

Diese Kationen werden durch die Peptide ersetzt, was zur Zerstörung der äußeren Membran führt. Dieser Mechanismus unterstützt die Ausbildung von destabilisierenden Räumen in der Membran, durch die die Peptide zur Zytoplasmamembran gelangen (Hancock REW. *et al.*, 1997). Die Peptide interagieren dann mit der Lipiddoppelschicht der Zytoplasmamembran. Ab diesem Punkt unterscheidet man zwischen zwei Peptidgruppen; (I) den Membran zerstörenden Peptiden und (II) den Membran nicht zerstörenden Peptiden (Powers JPS. *et al.*, 2003). Membran zerstörende Peptide haben generell eine α -helikale Struktur. Es gibt bis heute drei Modelle die den Wirkungsmechanismus beschreiben:

Beim *Barrel-Stack* Modell (Ehrenstein G. *et al.*, 1977) richten sich die amphipathischen Peptide senkrecht zur Membran aus und orientieren dabei ihre hydrophoben Seitenketten in der Lipiddoppelschicht nach außen, während die polaren Seitenketten nach innen zeigen und so eine Transmembranpore bilden. Die Folge davon ist ein Loch in der Zytoplasmamembran, das zur Zerstörung des Membranpotentials führt.

Das *Micellar Aggregate Model* beschreibt einen anderen Wirkungsmechanismus (Matsuzaki K. *et al.*, 1997). Bei diesem Modell bilden die Peptide eine formlose Membran umspannende Micelle. Die Micelle gelangt auf bisher unbekanntem Wege durch die Membran. Die Micelle kollabiert und damit gelangen die Peptide in das Zytoplasma der Bakterien.

In einem dritten Modell, das sog. *Carpet Model* (Pouyet Y. *et al.*, 1992), dringen die Peptide nicht in die Membran ein. Sie richten sich parallel zur Lipiddoppelschicht der Membran aus, bleiben aber mit den Hauptgruppen der Lipide (Phosphatidylglycerol und Cardiolipin) in Kontakt. Diese Orientierung führt zu einem lokalen Abbruch der Membranstabilität. Dadurch entstehen Löcher in der Zytoplasmamembran, die zum Abbruch des Membranpotentials und schließlich zum kompletten Zerstörung der Membran führen.

Mehrere Experimente haben gezeigt, dass die N-terminale Domäne des Dermaseptins mit ihren basischen und amphipathischen Eigenschaften für die Bindung und Anhäufung des Peptids an der Membran verantwortlich ist (Hernandez C. *et al.*, 1992 & Mor A. *et al.*, 1994). Da das Dermaseptin, wie oben beschrieben, ein typisches kationisches Peptid ist, wird es zu den Membran zerstörenden Peptiden zugeordnet, die nach dem beschriebenen *Barrel-Stack* Modell aktiv sind.

Darüber hinaus gibt es kationische Peptide, die nicht gezielt die Membran zerstören, sondern im Zytoplasma der Bakterienzelle Angriffspunkte haben. In *in-vitro* Studien konnte nachgewiesen werden, dass sie an DNA und RNA binden (Park CB. *et al.*, 1998). Ein anderes Beispiel ist das Prolin-reiche Insektenpeptid Pyrrhocoricin, dass an das Heatshock Protein *DnaK* bindet und so die Faltung des Proteins inhibiert (Kragol G. *et al.*, 2001).

3.2.2.3 Anmerkungen zur Proteomstudie

Der ermittelte pI-Wert von Proteinen im Gel weicht häufig von dem in der Datenbank kalkulierten pI ab. Viele Proteine besitzen posttranslationale Modifikation (z.B. Phosphorylierung oder Glykolysierung) (Vierstraet E. *et al.*, 2003). Diese verändern den pI des entsprechenden Proteins. Die gleichen Modifikationen beeinflussen auch das Molekulargewicht der Proteine. So können Proteine in Polyarylamidgel größer bzw. kleiner erscheinen als sie wirklich sind. Ein anderer Aspekt ist die Aktivität von Proteasen. Durch ihre *in-vivo* Prozessierung von Proteinen verändern sie das Molekulargewicht der Proteine (Vierstraete E. *et al.*, 2004). Findet man in einem 2D-Gel viele Proteine unter 20 KDa kann man davon ausgehen, dass viele von ihnen nur das Produkt eines teilweise proteolytischen Abbaus sind. Das Auftauchen von Proteinenspezies in verschiedenen Proteinspots, im Gel, ist z.T. auch auf posttranslationale Modifikation zurückzuführen, weil sie das Molekulargewicht und den pI verändert (Vierstraet E. *et al.*, 2004). Bei Auftrennung in der IEF kommt es häufig zu multiplen Banden eines Proteins (sog. *Spot strains*), wenn unterschiedliche Faltungszustände des Proteins in verschiedenen Maße Ampholine aufnehmen.

Ein typisches 2D-PAGE Gel kann maximal 30-50% (abhängig von der jeweiligen Probe) eines Proteoms darstellen. Gerade Proteine, die in extrem niedriger Konzentration vorkommen, können mit einem 2D Gel sehr schwer dargestellt werden aufgrund der physiochemischen Eigenschaften (pI, Hydrophobizität, Molekulargewicht und Färbeverhalten) (Gygi SP. *et al.*, 2000). In der Regel bedeute das, dass Membranproteine und Proteine unter 10 KDa nur eingeschränkt dargestellt werden können (Baggermann G. *et al.*, 2005).

3.3 Peptidom-Analyse und *Screening* nach anti-bakteriellen Peptiden im ES-Produkt von *Lucilia sericata*.

Die Zielsetzung des dritten experimentellen Versuchansatzes dieser Arbeit war die Identifizierung von biologisch aktiven antibakteriellen Peptiden im ES-Produkt von *Lucilia sericata*.

3.3.1 Der biologische Test auf der Grundlage einer Biolumineszenz-Reaktion

Der erste Schritt zur Untersuchung der biologischen Aktivität im ES-Produkt war die Gewinnung des Ausgangsmaterials. Zu diesem Zweck, werden die Maden (ca. 30000 Stück) in sterilem PBS gewaschen. Nach dem Waschen wird die Flüssigkeit von den Maden getrennt und zentrifugiert. Die zentrifugierte Waschlösung (ES-Produkt) wird anschließend direkt in einem antibakteriellen *Assay* auf ihre Aktivität hin getestet (Abb.23/S.79). Der antimikrobielle Test, der sog. *Luziferase-Assay* (Abb.22/S.78), wird mit *Staphylococcus aureus* durchgeführt. Die Staphylokokken exprimieren eine rekombinante Luziferase und diese katalysiert die Biolumineszenz-Reaktion von Luziferin zu Oxyluziferin. Das Ergebnis dieser Reaktion ist ein Leuchtsignal, welches durch ein Luminometer detektiert werden kann. Die antibakterielle Wirkung des ES-Produktes wird durch eine Abnahme der Biolumineszenz beobachtet werden.

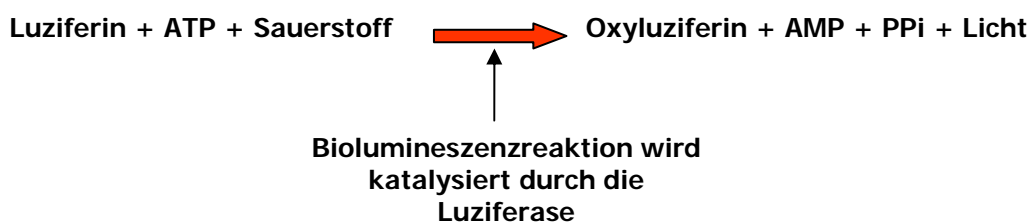


Abbildung 22: Darstellung der Luziferase-Reaktion in *S. aureus*. Der *Luziferase-Assay* ist bis zu 100-fach sensitiver als andere antibakterielle *Assays*.

Der Vorteil vom Luziferase Test liegt in seiner Sensitivität und Selektivität. Zum einen ist der antibakterielle Test um das 100-fache sensitiver als der *CFU-Assay* und der

turbidometrische Test, zum anderen kann mit diesem Test zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden.

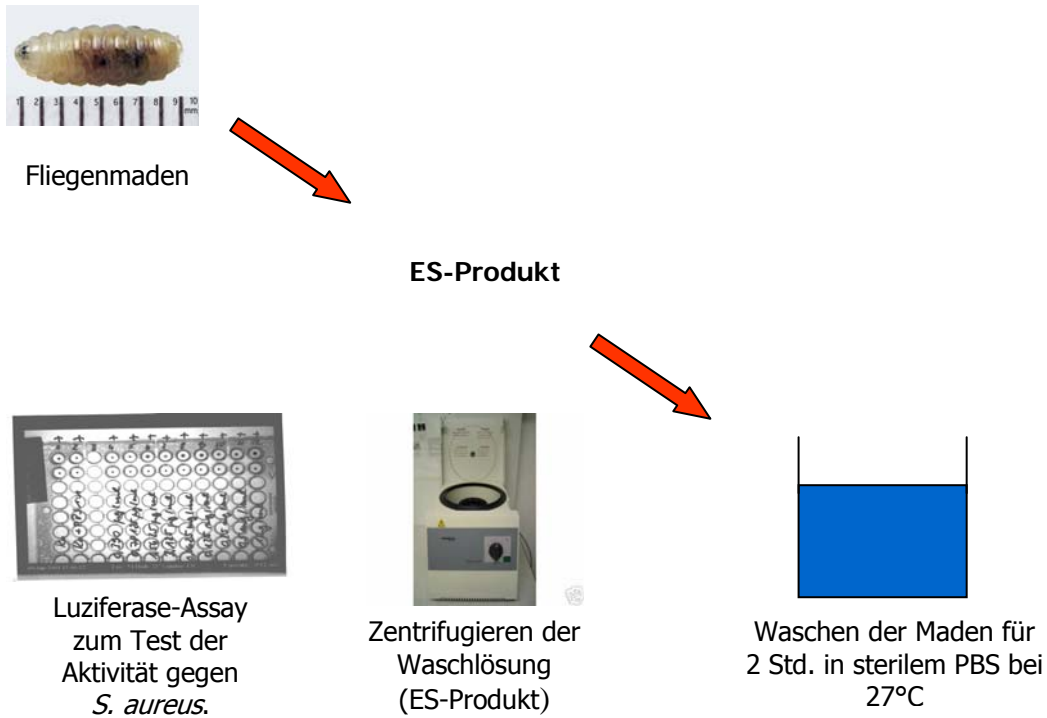
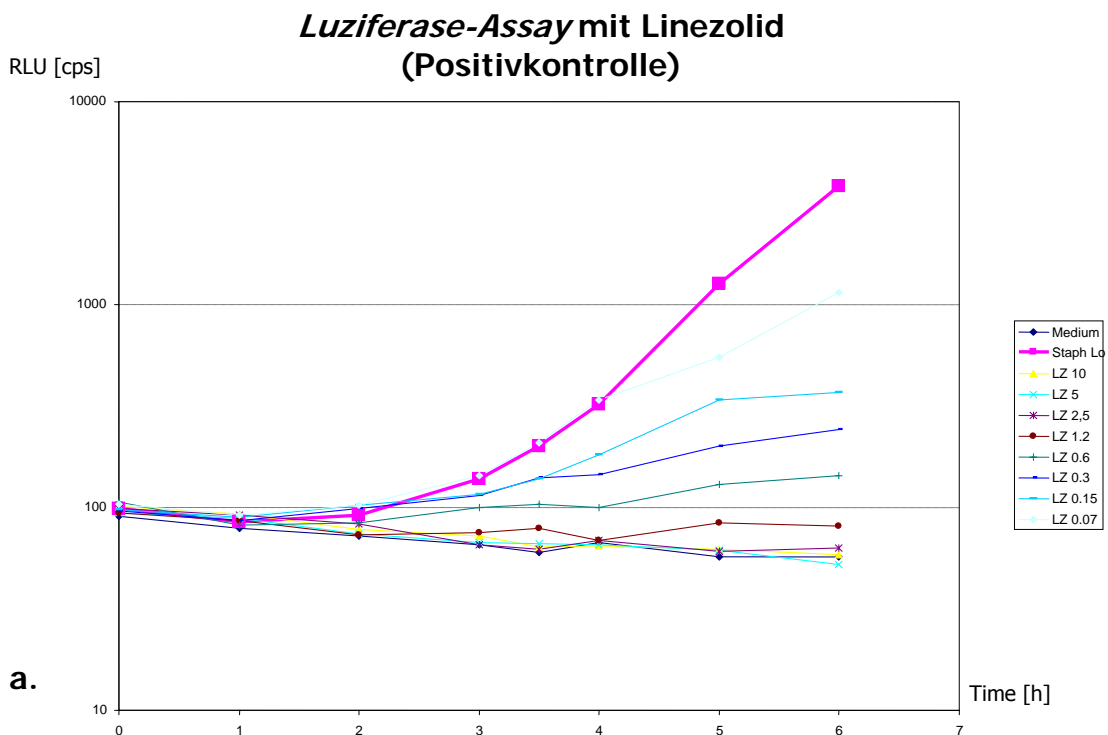


Abbildung 23: Gewinnung Testung des ES-Produktes

Als Positivkontrolle wird das Antibiotikum Linezolid eingesetzt. Die Probe und die Positivkontrolle werden 8 Stunden mit *S. aureus* inkubiert. Beide Substanzen werden bis zu einer Verdünnung von 1:128 getestet.



Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 24: (a) *Luziferase Assay* mit Positivkontrolle Linezolid. Die unterschiedlichen Graphen markieren die Ergebnisse für unterschiedliche Verdünnungen der Kontrolle des Antibiotikums.

In Abbildung 24 (S.79) wird das Ergebnis des *Luziferase-Assays* für das ES-Produkt dargestellt. Die Positivkontrolle (Abb.24a/S.79) zeigt einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der Staphylokokken. In Abbildung 24b (S.80) ist der Effekt des ES-Produktes auf das Wachstum der Staphylokokken zu sehen. Deutlich ist hier zu erkennen, dass das Produkt einen stark hemmenden Einfluss auf das Wachstum der Bakterien hat. Das Wachstum der Bakterien ist bis zu einer Verdünnung von 1:8 vollständig gehemmt und bei einer Verdünnung von 1:16 verlangsamt.

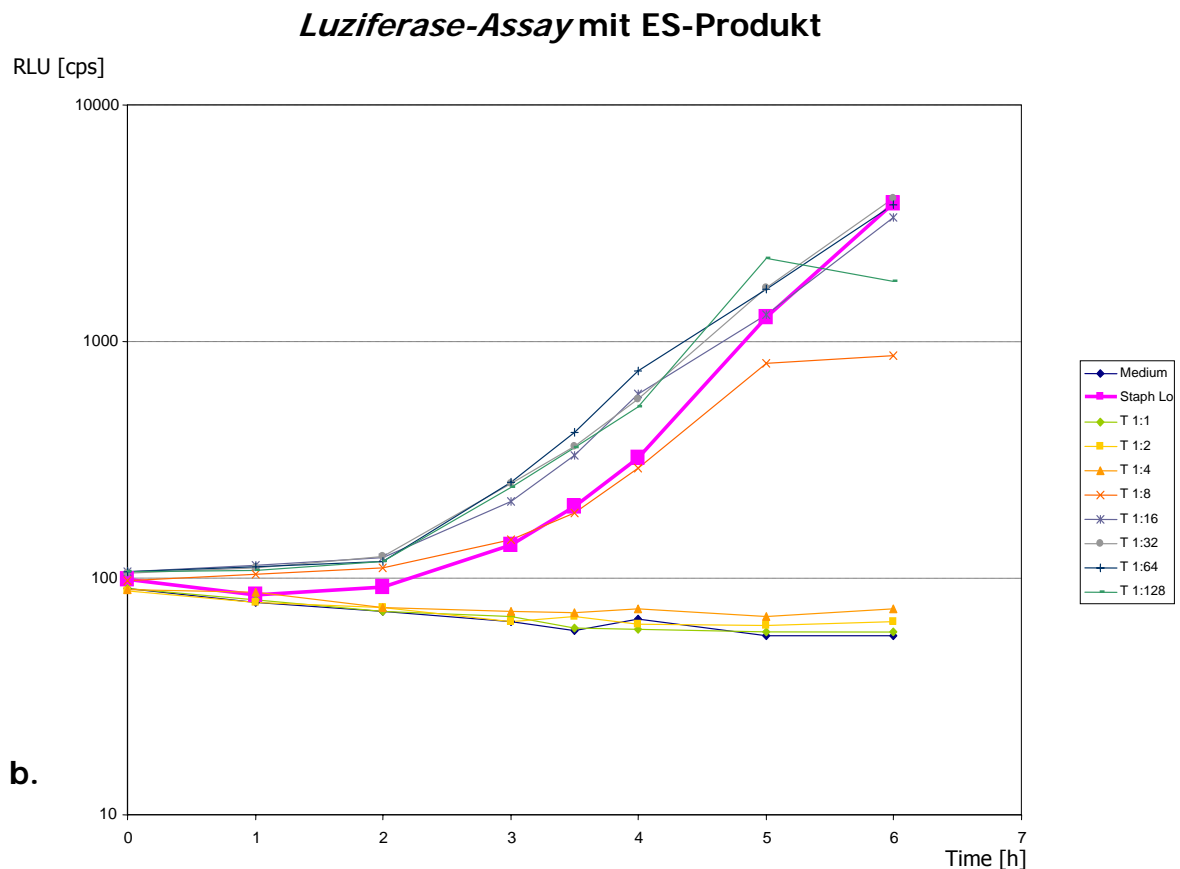


Abbildung 24: (b) *Luziferase-Assay* mit ES-Produkt. Die Probe wird bis zu einem Verhältnis von 1:128 verdünnt. Bis zu einer Verdünnung von 1:8 ist das Wachstum von *S. aureus* gehemmt. Die 1:16 Verdünnung zeigt leichte Inhibition des Wachstums von *S. aureus*.

3.3.2 Trennung des ES-Produktes in Proteine und Peptide

Nachdem die Aktivität im ES-Produkt nachgewiesen worden war, stellte sich die Frage, welche Moleküle für diesen Effekt verantwortlich sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass es sich dabei entweder um Proteine oder Peptide handeln muss (Bexflied A. *et al.* 2004 & Kerridge A. *et al.* 2005). Zur Identifizierung der aktiven Stoffgruppe wurde das ES-Produkt in zwei Fraktionen, in eine Peptidfraktion (MW <10 KDa) und eine Proteinfraction (MW >10 KDa), durch eine Ultrafiltration getrennt. Die Peptidfraktion wird anschließend durch *reversed-phase*-Festphasenextraktion über eine C₁₈-Säule aufkonzentriert. Im *Bio-Assay* (*Luziferase-Assay*) werden anschließend das ES-Produkt, die Proteinfraction und die Peptidfraktion getestet. Die Proben werden mit $5 \cdot 10^5$ Bakterien ausgemessen. Der *Bio-Assay* (Abb.25/S.81) zeigt eine deutliche Aktivität der Peptidfraktion gegen *Staphylococcus aureus*. Ein ähnlich starker Effekt wird auch für das ES-Produkt beobachtet, während die Proteinfraction keinerlei Aktivität zeigt. Als Positivkontrolle dient das Linezolid und als Negativkontrolle die Antienolase.

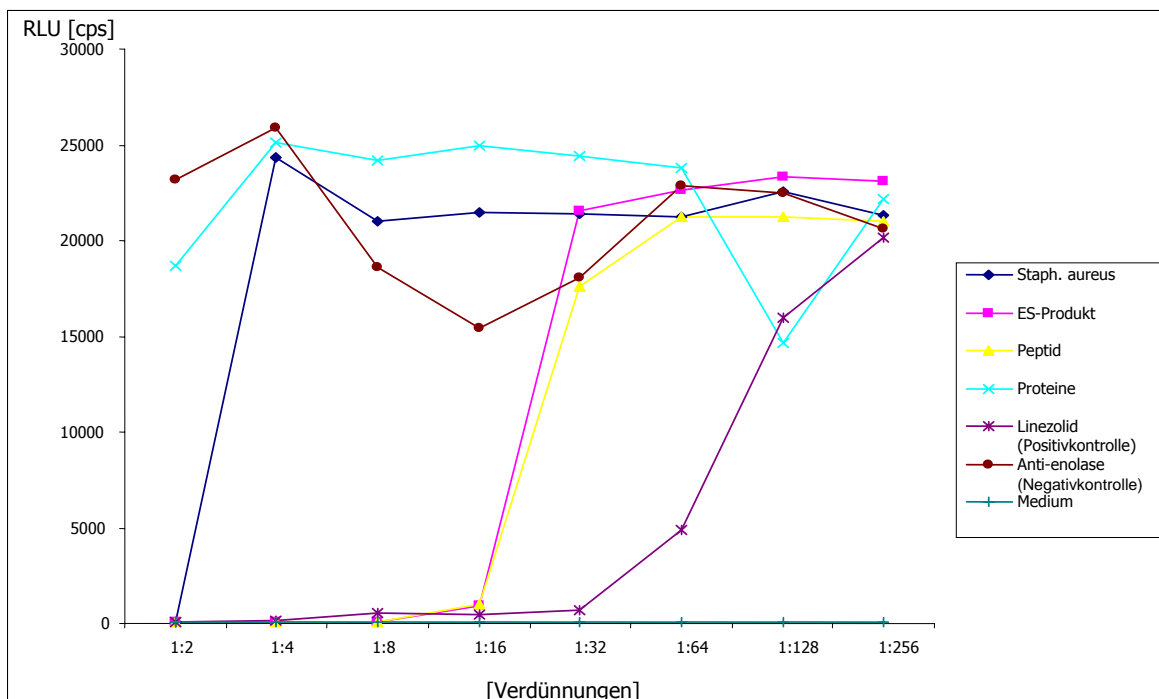


Abbildung 25: Ergebnis des *Luziferase-Assay* mit *Staphylococcus aureus*. Antibakterieller Effekt des ES-Produktes (rot), der Proteinfraction (türkis) und der Peptidfraktion (gelb). Es geht ein deutlicher antibakterieller Effekt von der Peptidfraktion aus, während die Proteinfraction keine Aktivität zeigt. Linezolid ist die Positivkontrolle (Lila) und die Antienolase (braun) die Negativkontrolle..

3.3.3 Trennung der Peptidfraktion mit *Reversed-phase- und hydrophiler Interaktions-Chromatographie*

Nach der Identifizierung der Peptide als wirkstoffhaltige Fraktion wird im Folgenden eine Subfraktionierung mit dem Ziel der Reindarstellung einzelner Peptide unternommen. Die aufkonzentrierten Peptide werden zunächst durch HPLC *Reversed-Phase*-Säule getrennt, fraktioniert und gesammelt. In der *Reversed-Phase*-Chromatographie werden die Komponenten nach ihren hydrophoben Eigenschaften getrennt. Die gesammelten Fraktionen werden anschließend wieder im antibakteriellen *Luziferase-Assay* auf ihre Aktivität gegen gram-positive (*Staphylococcus aureus*) und gram-negative (*Salmonella typhi*) Bakterien getestet. Fraktionen, die Aktivität zeigen, werden über eine hydrophile Interaktionschromatographie getrennt. Die hydrophile Interaktionschromatographie funktioniert auf der Grundlage polarer Interaktionen des Analyten mit der stationären Phase, allerdings wird hierbei die Integrität der Proteine/Peptide bewahrt. In Abbildung 26 (S.83) wird das HPLC-Profil der Peptidfraktion nach Trennung über eine C₁₈ *Reversed-Phase*- HPLC-Säule (Gradient:1-90% ACN) gezeigt. Das Chromatogram zeigt an, dass in der analysierten Probe eine komplexe Mischung aus Peptiden vorhanden ist. Vier der getesteten Fraktionen zeigen jeweils einen antibakteriellen Effekt gegen *S. aureus* und *Salmonella typhi*.

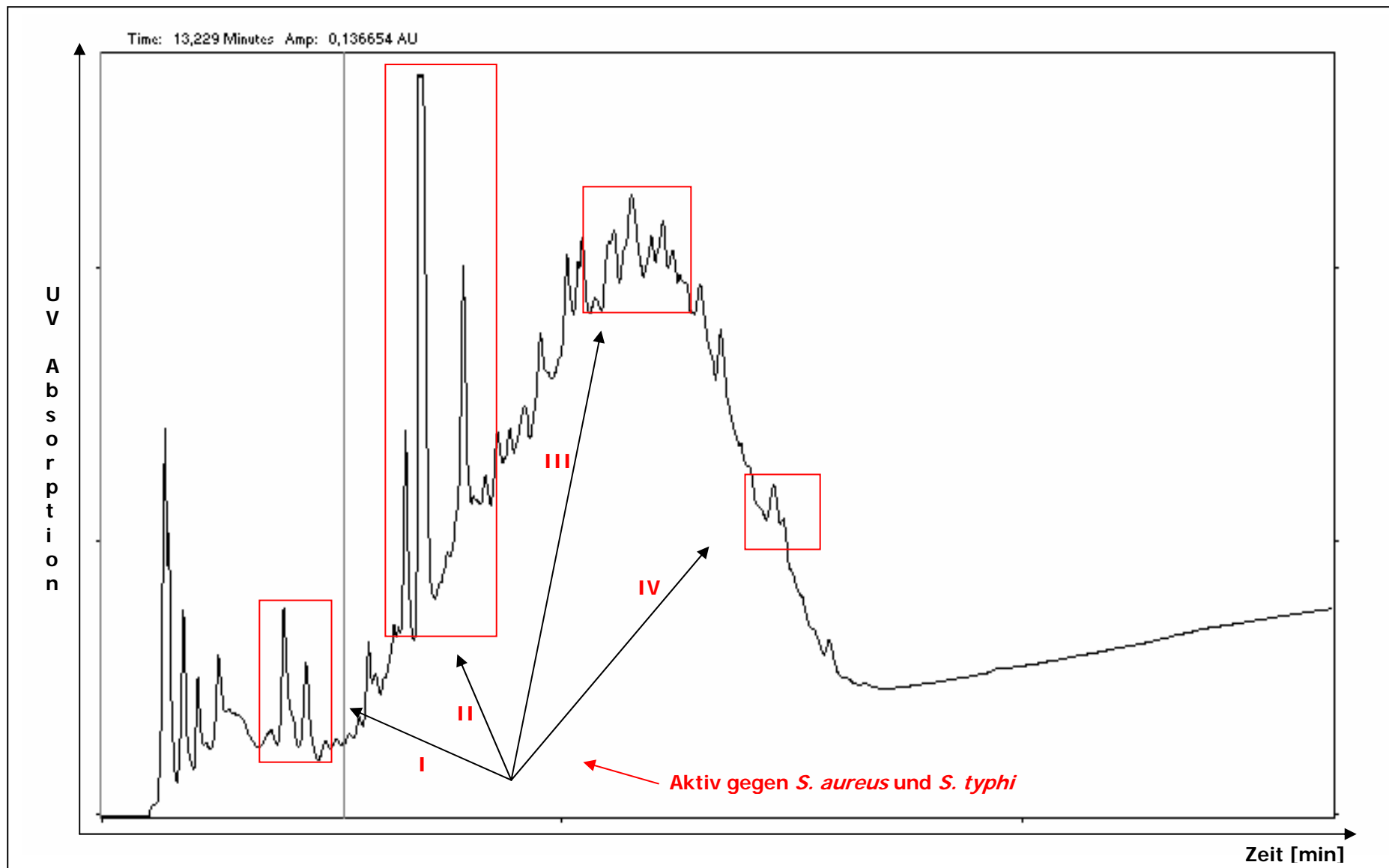


Abbildung 26: Fraktionierung der Peptide über eine *Reversed-phase-C₁₈* Säule. Die aufgefängenen Fraktionen werden im *Luziferase-Assay* ausgetestet. Vier Fraktion (I-IV) zeigen Aktivität.

Die vier aktiven Fraktionen werden anschließend über eine hydrophile Interaktionschromatographie (HIC) subfraktioniert und abermals in Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen werden gegen *S. aureus* getestet. Die Reinigung der Fraktion II (Abb.27/S.84) mittels HIC brachte einen positiven Befund im Luziferase Test. Die Fraktionen I, II und IV zeigen nach Trennung mit der hydrophilen Säule keine messbare Aktivität mehr. Die aktive, getrennte Fraktion (Fraktion A2) wird durch MALDI-MS vermessen. Das Spektrum zeigt ein intensives Ionensignal mit der Masse (Abb.:28/S.85) 1060 Da.

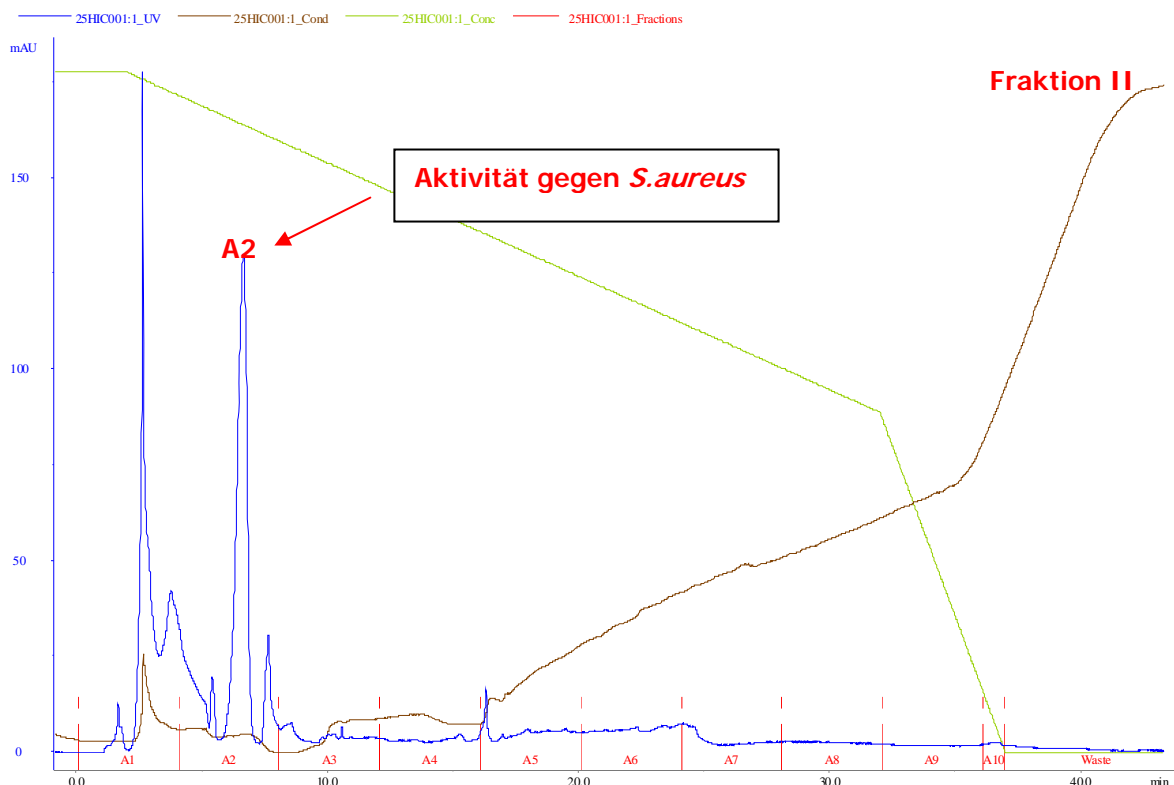


Abbildung 27: HPLC-Profil der aktiven Fraktion II getrennt auf einer hydrophilen Interaktionssäule. Fraktion A2 zeigt Aktivität gegen *S. aureus*.

3.3.4 Fraktionierung der Peptide mit hydrophiler Interaktions- und *Reversed-phase*-Chromatographie

Um das oben gezeigte Ergebnis zu bestätigen wurde die Peptidfraktion des ES-Produktes in umgekehrter Reihenfolge über HIC und RPC fraktioniert. Zunächst wird eine MALDI-Analyse (Abb.33/S.89) der gesammelten Peptidfraktion durchgeführt. Dabei konnte unter anderem das Peptid mit

der Masse 1060 Da detektiert werden. Die Peptide in der Peptidfraktion werden anschließend zuerst mittels einer hydrophilen Interaktionschromatographie getrennt, das Eluat fraktionsweise gesammelt und die Fraktionen im antibakteriellen *Assay* (*Luziferase-Assay*) auf ihre Aktivität hin getestet. Die aktiven Fraktionen werden anschließend über eine *Reversed-Phase*-Chromatographie gereinigt, peakweise fraktioniert und wieder auf ihre Aktivität hin geprüft. Die aktiven Fraktionen werden einer MALDI-MS und danach einer ESI-MS/MS-Analyse unterzogen, um die Sequenz der Peptide zu bestimmen.

Bei der Trennung der Peptide mittels HIC konnten 9 Fraktionen nach steigender Polarität getrennt werden, die jeweils auf ihre Aktivität gegen *S.aureus* und *S.typhi* (gram-negativ) überprüft werden (Abb.29/S.86). Das Ergebnis des *Luziferase-Assays* zeigt, dass in vier Fraktionen Aktivität vorhanden ist.

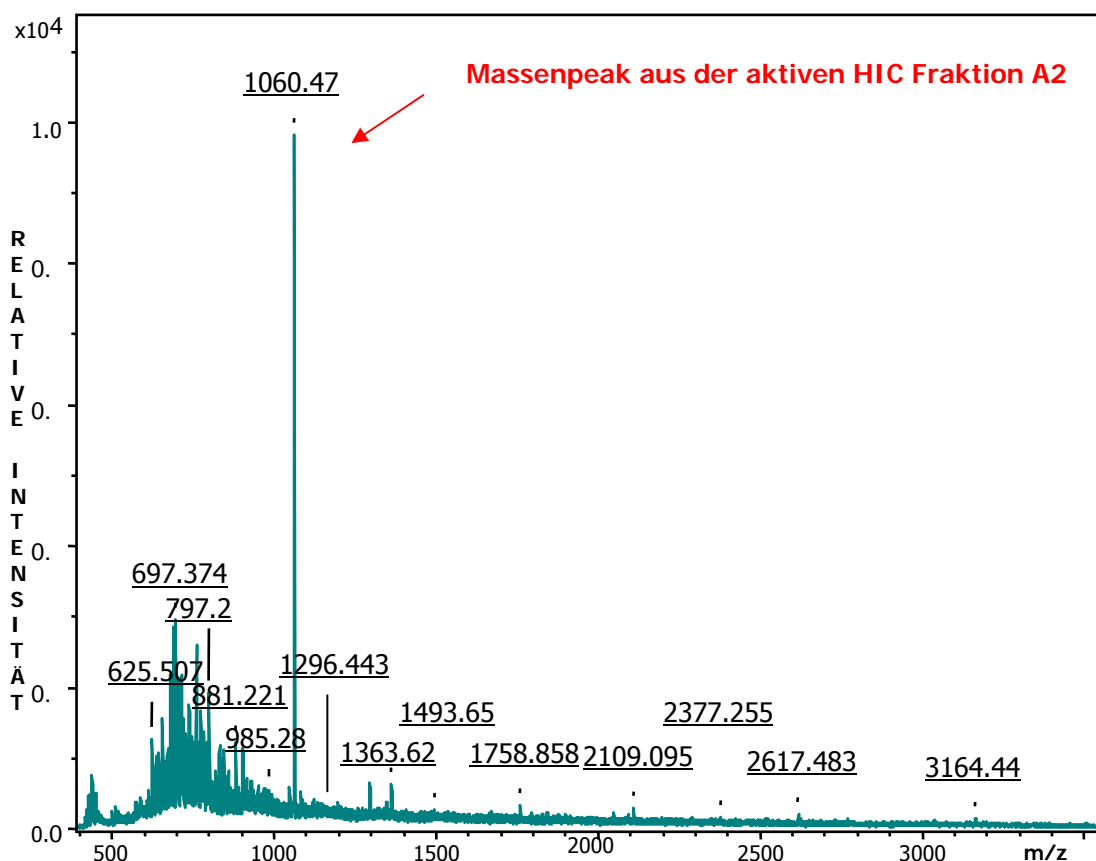


Abbildung 28: MALDI-MS Spektrum der Fraktion A2. Es dominiert ein Ionensignal bei 1060 Da.

Insbesondere mit den Fraktionen A3 und A7 konnte eine deutliche Inhibition des Wachstums von *S. aureus* und *Salmonella typhi* erzielt werden. Mit den Fraktionen A4 und A5 ist hingegen nur eine unspezifische Hemmung gegen *S. aureus* zu beobachten.

Die Peptide die sich in der Fraktion A7 befinden werden sehr spät von der HIC-Säule eluiert. Das bedeutet, dass diese Peptide einen stark hydrophilen Charakter haben sollten, während Peptide in der Fraktion A3 eher hydrophob sind.

Das Ergebnis der sich anschließenden Trennung durch *Reversed-Phase*-Chromatographie zeigt für Fraktion A3 ein komplexes HPLC-Bild. Keines der getrennten Peptide zeigt einen Effekt weder gegen gram-negative noch gegen gram-positive Bakterien. In einer Subfraktion von A7 (Abb.31/S.88) jedoch konnte Aktivität gegen *S. aureus* nachgewiesen werden.

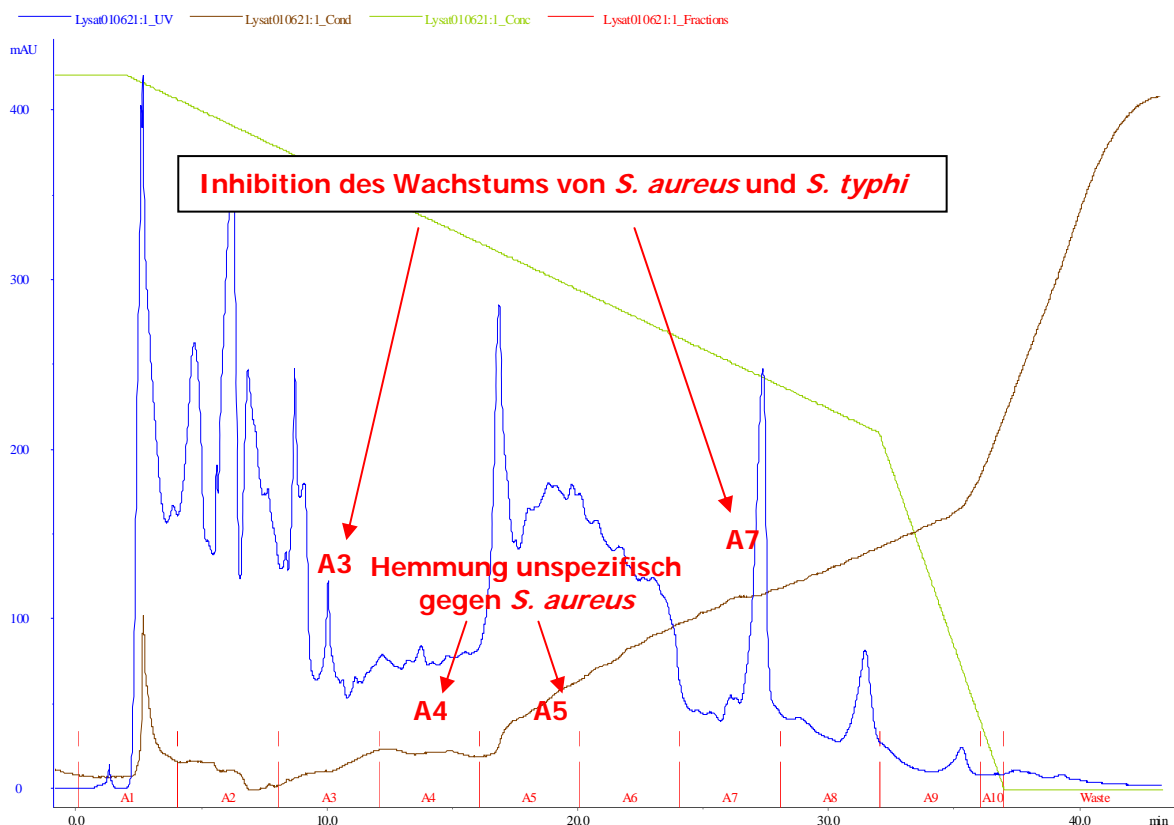


Abbildung 29: Trennung der Peptidfraktion mittels hydrophiler Interaktionschromatographie. Die Elution der Peptide erfolgt mit fallendem ACN-Gradienten und steigendem NaCl Gehalt. Insgesamt werden neun Fraktionen gesammelt und auf ihre Aktivität hin getestet. Die Fraktionen A3 und A7 zeigen in der Aktivitätsmessung eine Inhibition des Wachstums von *S. aureus* und *S. typhi*. Für A4 und A5 konnten eine leichte Hemmung beobachtet werden.

Die Fraktion A7 zeigte nach der Trennung über HIC und *Reversed-Phase* einen antibakteriellen Effekt. Die aktiven Peptide werden mittels MALDI-MS (Abb.31/S.87) vermessen. Das Ergebnis der Messung ist (Abschnitt 3.3.3) ein dominantes Ionensignal mit der Masse 1060 Da.

Ergebnisse und Diskussion

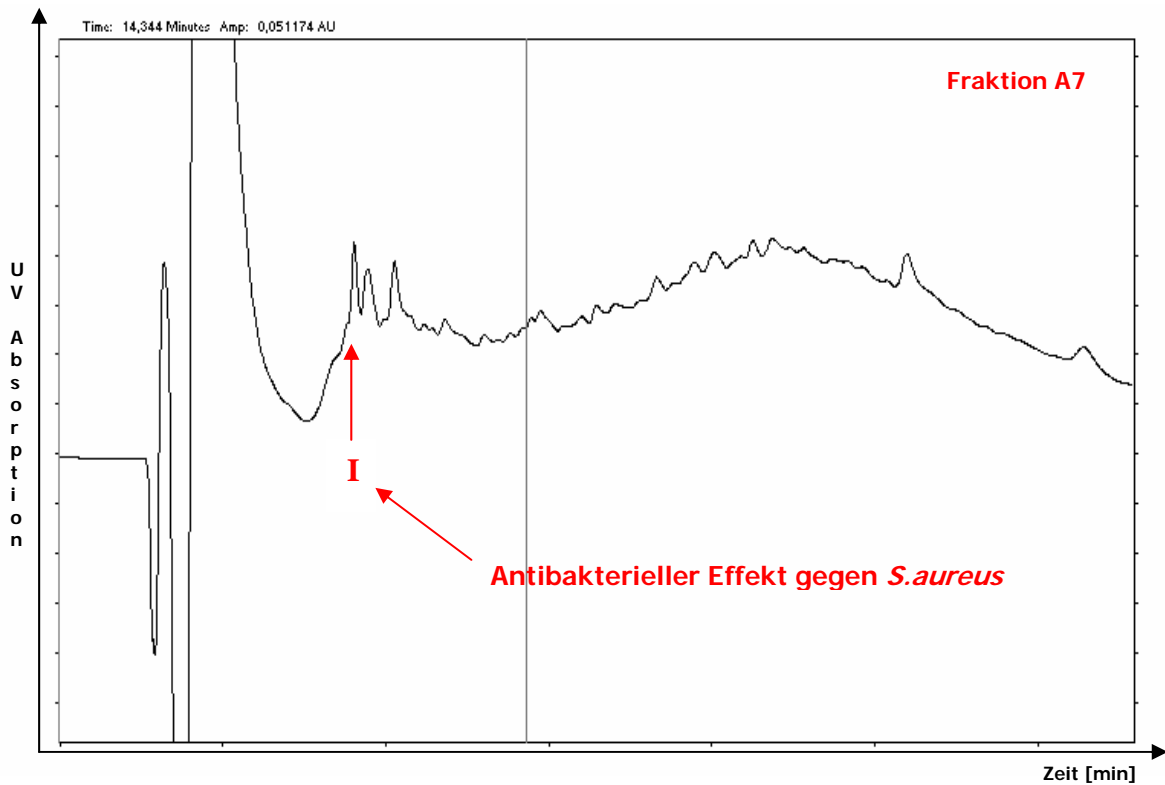


Abbildung 30: Subfraktionierung der Fraktion A7 über eine C₁₈-Säule. Man erkennt eine ganze Reihe von Peptidpeaks über das ganze HPLC-Profil verteilt. Die Peptidpeaks werden einzeln gesammelt im *Luziferase-Assays* ausgetestet. Es konnte in Peak I eine schwache Aktivität gegen *S. aureus* nachgewiesen werden.

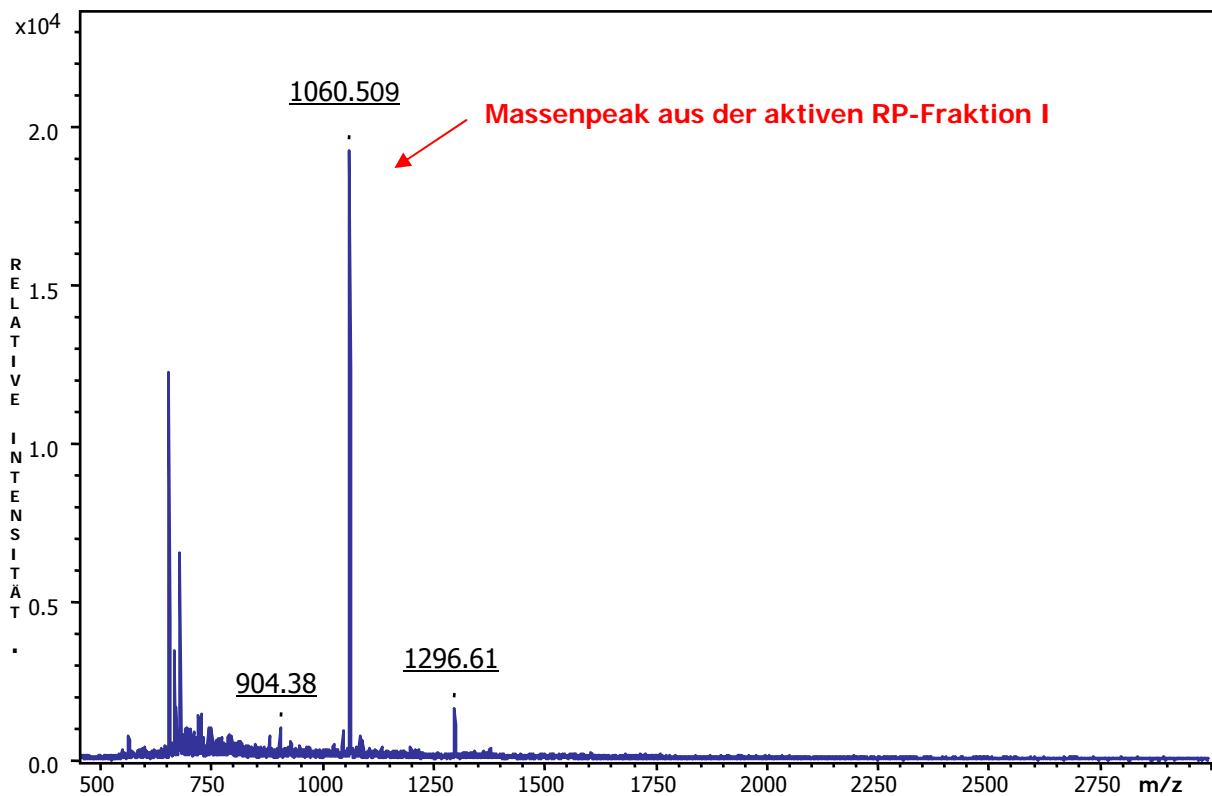


Abbildung 31: Darstellung des MALDI-Spektrums aus der aktiven Fraktion A7 nach chromatographischer Trennung.. Im Spektrum dominiert ein Ionensignal mit einer Masse von 1060 Da.

3.3.5 Analyse der aktiven Fraktionen mittels LC-ESI-MS/MS

Nach Trennung der Peptidfraktion über zweidimensionale Chromatographie, schloss sich nun die Identifizierung der Peptide an. Die Analyse der Fraktion mittels MALDI-MS zeigt ein Peptid mit der Masse 1060 Da an. Zur Identifizierung des Peptids erfolgte eine Messung mit Nano-LC und Qtof-Elektrospray-MS/MS. Das Ergebnis dieser Messung stellen Sequenzvorschläge für das Peptid dar, die aus dem MS/MS-Spektrum durch die MassLynx-Software interpretiert wird. Es werden 20 Sequenzvorschläge, geordnet nach Wahrscheinlichkeit, für ein Nonapeptid gemacht (Abb.32/S.88):

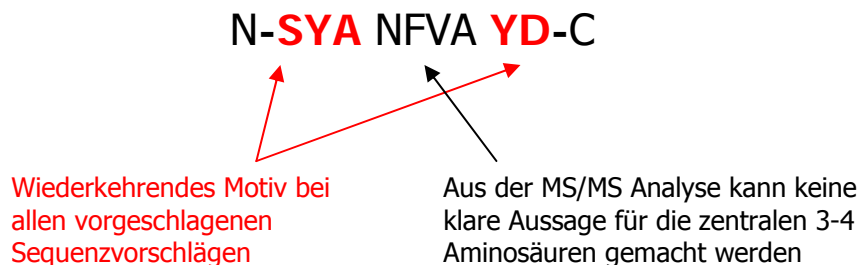


Abbildung 33: Sequenzvorschläge nach MS/MS-Daten. Es gibt insgesamt 20 Sequenzvorschläge und jede Sequenz des Peptids enthält 3 aromatische Aminosäuren. Deutlich ist zu erkennen, dass bei allen Vorschlägen der N-Terminus mit Serin, Tyrosin und Alanin beginnt, während der C-Terminus durchgehend mit Aspartat und Tyrosin anfängt. Die zentralen 3-4 Aminosäuren tauchen in unterschiedlicher Reihenfolge in anderen Sequenzvorschlägen auf. Die gesicherten Aminosäurenmotive am C- und N-Terminus sind aus den der b- und y-Ionen im MS/MS-Spektrum abgeleitet.

Gemeinsames Merkmal aller Vorschläge ist, dass die Sequenzen drei aromatische Aminosäuren enthalten und zwar Tyrosin und einen Phenylalanin-Rest. Am N-Terminus bestehen bei allen Sequenzvorschlägen die ersten drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Alanin, während am C-Terminus Aspartat und Tyrosin bei allen Vorschlägen zu finden sind. Allerdings kann durch die MS/MS Analyse keine klare Aussage für die zentralen 3-4 Aminosäuren gemacht werden (Abb.34/S.90).

Ergebnisse und Diskussion

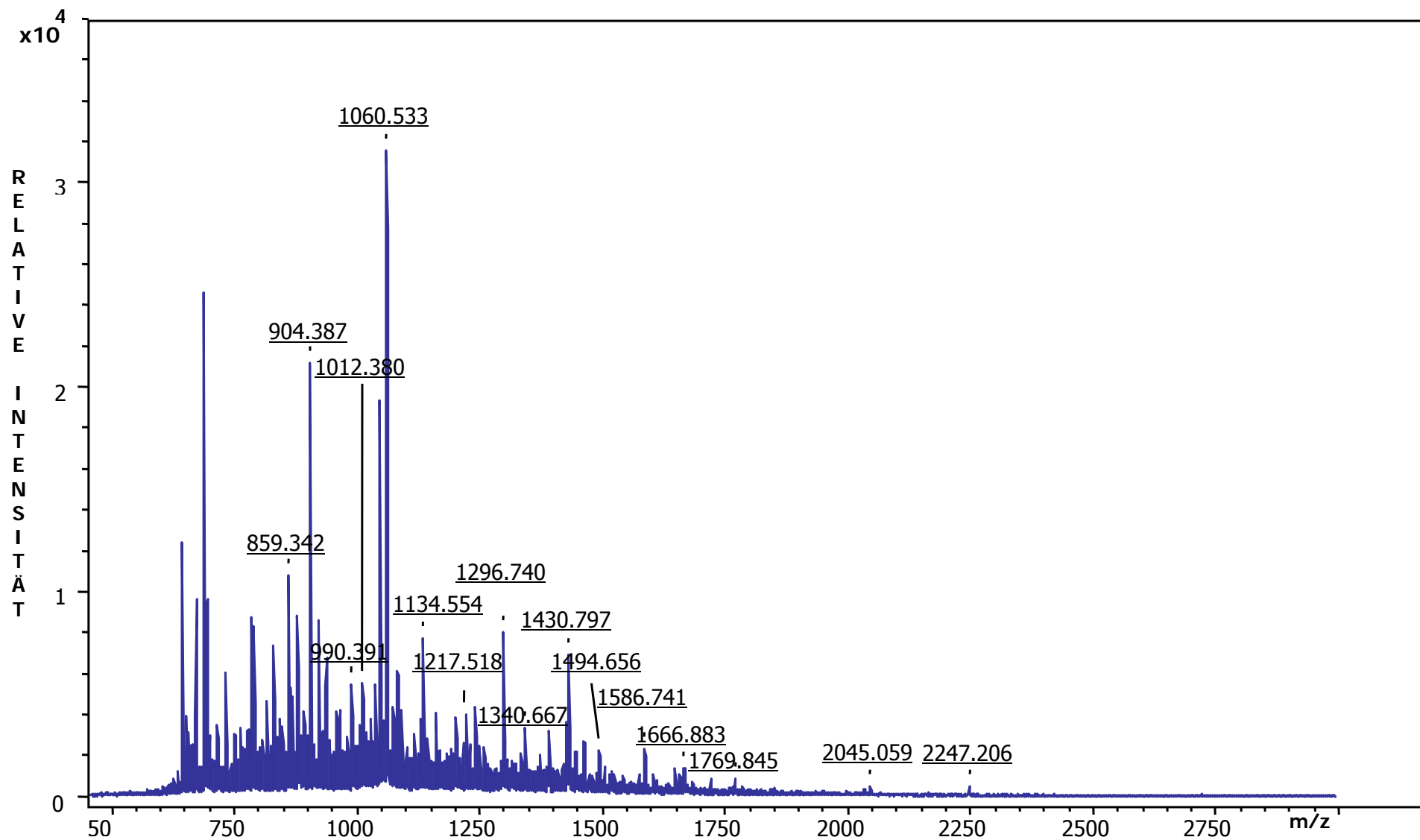


Abbildung 33: MALDI-MS Spektrum der Peptidfraktion des ES-Produktes. Das Ergebnis der Messung sind Peptidmassen im Bereich zwischen 800-2300 Da. Dominant ist das Peptid mit der Masse 1060 Da in der nicht gereinigten Peptidfraktion des ES-Produktes.

Ergebnisse und Diskussion

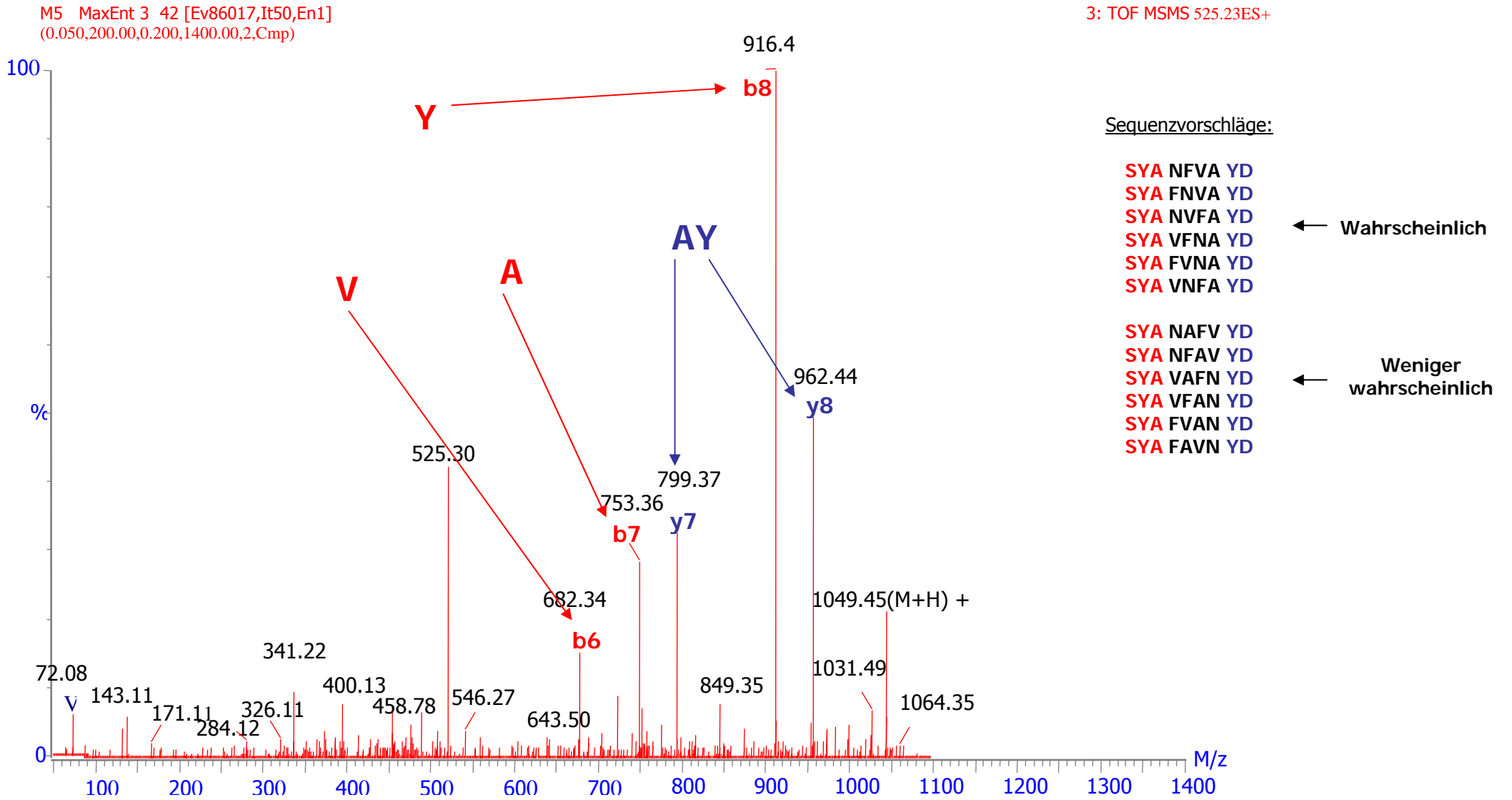


Abbildung 34: MS/MS-Spektrum des Peptids MH 1048. Es konnten zwei Aminosäuren am C-Terminus (Aspartat und Tyrosin) und drei Aminosäuren am N-Terminus (Serin, Tyrosin und Alanin) mit Hilfe der MS/MS-Analyse identifiziert werden. Bei allen Sequenzvorschlägen findet man die Motive Phenylalanin, Asparagin, Alanin und Valin im zentralen Bereich des Nonapeptids.

3.3.6 Diskussion

Das Ergebnis aus der MS/MS-Analyse konnte nicht den dominanten Signalen in der MALDI-MS zugeordnet werden. Das bedeutet, dass wir eine *Molecular-Spezies* in einer aktiven Fraktion mit m/z 1060 Da haben, der wir Aktivität zuordnen können aber keine passende Aminosäuresequenz. Die vorgeschlagene Sequenz, aus der MS/MS-Messung, gehört zu einem Nonapeptid mit der Aminosäuresequenz S-Y-A(N, F, V)A-Y-D. Dem Nonapeptid mit m/z 1048 Da können wir nicht mit Sicherheit biologische Aktivität zuschreiben, obwohl wir es in einer positiv getesteten Fraktion finden. Es scheint so, dass wir ein zweites Peptid gefunden haben, das wir in der MALDI-MS Analyse nicht detektieren konnten. Trotz allem kann es für die beobachtete antibakterielle Wirkung, in dieser Arbeit, verantwortlich sein. Eine abschließende Zuweisung von biologischer Aktivität und Peptidstruktur bleibt weiteren Strukturanalysen vorbehalten.

Es ist durchaus möglich, dass neben dem Peptid noch eine andere Substanz mit m/z 1060 Da in der Probe vorhanden ist, die einen antibakteriellen Effekt unterstützt. In der Literatur gibt es kaum Hinweis an alternativen Stoffgruppen, wenn man klassische Antibiotika oder chemische Stoffe wie Phenyllessigsäure außer Acht lässt. Trotzdem gibt es den einen oder anderen Hinweis auf Stoffe, die ähnliche Eigenschaften, wie ein antibakterielles Peptid, haben. Die amphipatischen Eigenschaften, die Ladung und die intrazelluläre Aufnahme in die Bakterien sind bei einem kationischen Lipid ähnlich denen eines antibakteriellen Peptids (Powers JPS. *et al.*, 2003).

Die Aufgabe der kationischen Lipide ist die Unterstützung der AMP beim Eindringen in die Membran der Bakterienzelle, denn das antibakterielle Peptid interagiert mit membranständigen kationischen Lipiden (Powers JPS. *et al.*, 2003). Hafez *et al.* (2001) beschreiben ein Modell, das den Mechanismus der intrazellulären Aufnahme von Polynukleinsäuren mit kationischen Lipiden beschreibt. Der Komplex aus Plasmid und kationischem Peptid wird durch

Endocytose aufgenommen und destabilisiert dadurch die endosomale Membran. Die positiv geladenen Gruppen des kationischen Lipides reagieren mit den negativ geladenen Gruppen der anionischen Phospholipide in der inneren endosomalen Membran der Bakterienzelle. Das Ergebnis dieser Reaktion ist die Bildung eines Ionenpaares in der Membran, das eine Tunnelartige Struktur in der Membran ausbildet. Dieser Effekt führt letztendlich zur Zerstörung der Membran (Hafez IM. *et al.*, 2001). Basierend auf diesem Mechanismus ist es denkbar, dass kationische Peptide in ähnlicher Weise mit anionischen Phospholipiden interagieren, die abundant in der Bakterienmembran vorliegen (Powers JPS. *et al.*, 2003).

Das Type II Lipid *DOPE* aus *E. coli* induziert sog. nicht-Membran-bildene Phasen in der Membran, die wie ein Tunnel durch die Membran wirken, und ist darüber hinaus an der Proteinfaltung beteiligt (Bogdanov M. *et al.*, 1996 & Rietveld AG. *et al.*, 1995). Es ist durchaus plausibel, dass spezifische Phospholipide erforderlich sind, um den Transfer von Peptiden durch die Membran und die Beibehaltung der Sekundärstruktur der antibakteriellen Peptide während der Membranpassage zu gewährleisten (Powers JPS. *et al.*, 2003). Kationische Lipide unterstützen, nach heutigem Stand der Forschung, die Aktivität der antibakteriellen Peptide.

Was spricht dafür, dass wir tatsächlich im dritten experimentellen Teil ein AMP in dieser Arbeit isoliert haben. Das ES-Produkt zeigte starke Aktivität gegen *Staphylococcus aureus*. Die Literatur bestätigt unsere Beobachtung aus dieser Arbeit (Thomas S. *et al.*, 1999; Bexfield A. *et al.*, 2004 & Kerridge A. *et al.*, 2005). Danach trennten wir das ES-Produkt in zwei Fraktionen, in Proteine und Peptide, auf. Es erfolgte hier eine Fraktionierung nach Größe. Das bedeutet, dass niedermolekulare Moleküle, in der Peptidfraktion enthalten sind. Die Peptidfraktion mit Molekülen <10 KDa zeigte einen eindeutigen Effekt auf das Wachstum von Staphylokokken. Zwei Arbeitsgruppen aus Großbritannien hatten ähnliches berichtet (Bexfield A. *et al.*, 2004 & Kerridge A. *et al.*, 2005). Um die wirkaktiven Komponenten in der Peptidfraktion zu identifizieren wurden die

Peptide sowohl über eine HIC-Säule als auch über eine RP-Säule getrennt. Nach beiden Trennungsschritten der Peptide finden wir die Aktivität in Fraktionen wieder. Die MALDI-MS Analyse der Fraktionen zeigte als dominantes Signal aktiver Fraktionen einen Peak mit der Masse von 1060 Da an. Die ESI-MS/MS-Messung ergab einen Sequenzvorschlag für ein Nonapeptid in der aktiven Fraktion. Der antibakterielle Faktor im ES-Produkt, wie es Bexfield *et al.* (2004) nennt, ist thermostabil, was mit der Identität eines kurzkettigen Peptids übereinstimmt. Die Inkubation des ES-Produkts bei 100°C für 60 Minuten führt zu keinem Verlust der Aktivität. Ebenso das mehrfache Auftauen und Einfrieren des Produktes. Hinzu kommt, dass der Faktor nicht gespalten werden kann durch Trypsin und Pronase E (Bexfield A. *et al.*, 2004). Die Thermostabilität und die Protease-Resistenz sprechen dafür, dass es sich bei dem Faktor nicht um eine Protein und Enzym handeln kann. Antibakterielle Peptide sind bei Insekten mit einer extrakorporalen Verdauung häufig anzutreffen. So produziert die Fliegenart *Stomoxys calcitrans* in ihrem Mitteldarm ein AMP, das sie dann mit der Verdauungsflüssigkeit ausscheidet und das dort antibakterielle Wirkung zeigt. (Lehane MJ. *et al.*, 1997).

Die von uns vorliegende Nonapeptidsequenz bedarf weiterer strukturanalytischer Aufklärung, da die Sequenz im zentralen Abschnitt des Peptids noch unsicher ist. Versuche, die Sequenz durch sequentiellen Abbau vom C-Terminus des Peptids her zu bestimmen, waren leider nicht erfolgreich. Dies mag zum Teil dadurch erklärt werden, dass Carboxypeptidase Y terminale Asp-Reste nur mit niedriger Rate spaltet. Da Asp die C-terminale Aminosäure des Nonapeptids darstellt, war die massenspektrometrische Leitersequenzierung unter Einsatz dieser Enzymisoform nicht aussichtreich.

Die Arbeitsgruppe um die Forscherin Bexfield (2004) beschreibt die Trypsin- und Pronase E-Resistenz des antibakteriellen Faktors im ES-Produkt. Schaut man sich nun den Sequenzvorschlag für unser Peptid an findet man keine potentielle Schnittstelle von Trypsin. Wenn man bedenkt, dass das Verdauungsekret für die extrakorporalen Verdauung in Insekten reich an proteolytisch aktiven Proteinen

ist (Terra WR. *et al.*, 1994), ist ein Schutz gegen diese essentiell. (Bexfield A. *et al.*, 2004). Tatsächlich findet man im ES-Produkt von *Lucilia sericata* ein Serinproteasen ähnliches Enzym (Horobin A. *et al.*, 2003). Trypsin gehört zu den Serinproteasen und deshalb ist es plausibel, dass das von uns beschriebene Peptid keine Schnittstelle aufweist. Ein weiterer Schutz vor proteolytischem Abbau sind posttranslationale Modifikationen. Solche Modifikationen sind nicht ungewöhnlich bei antibakteriellen Peptiden (Zasloff, 2002). Da im ES-Produkt eine Chymotrypsin ähnliche Protease lokalisiert ist, müsste das von uns beschriebene Nonapeptid proteolytisch angegriffen werden, denn Chymotrypsin spaltet hinter aromatischen Aminosäuren. Posttranslationale Modifikation in Form einer Phosphorylierung zum Schutz vor proteolytischen Abbau wurde bisher noch nicht gefunden. Neben der Phosphorylierung gibt es auch noch andere Modifikationen auf antibakteriellen Peptiden. Ein Beispiel stellt der Zucker GalNAC auf dem Peptid Formacin (Mackintosh JA. *et al.*, 1998) dar.

Die Masse unseres Peptids beträgt etwas mehr als 1 KDa. Auch das kann durch die Literatur bestätigt werden. So hat eine Arbeitsgruppe aus Wales im Ultrafiltrat ihre Peptidfraktion zwischen 0,5-10 KDa deutliche antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* detektiert (Bexfield A. *et al.*, 2004). Die Forschergruppe um Kerridge *et al.* (2005) konnte antibakterielle Wirkung in einem Ultrafiltrat mit einem *Cut off* von 3 KDa und bei 1 KDa feststellen. Ein Teil des ES-Produktes, wurde vor der Ultrafiltration, auf ein Tricine-SDS-Page (Schägger Gel) aufgetragen. Es konnten mehrere Peptidbanden zwischen fünf und einem KDa nachgewiesen werden. Er schloss daraus das zwei dieser Banden ein antibakterielles Peptid enthalten (Kerridge AS. *et al.*, 2005).

Sehr kleine antibakterielle Peptide sind im Tierreich, insbesondere bei Insekten, nichts Außergewöhnliches. So findet man in der Honigbiene das Apidaecin, das zwei KDa groß ist (Casteels P. *et al.*, 1989) oder in der Fliege *Neobellieria bullata* (gehört zu den Diptera) das Dipeptid β -Alanyl-Tyrosin das Hitzestabil und gegen die Wirkung von Protease resistent ist (Meylaers K. *et al.*, 2003). Ein anderes Peptid ist das sog. Hexapeptid, bestehend aus 6 Aminosäuren, aus dem Rind,

das aus dem Laktoferrin B generiert wird (Vogle HJ. *et al.*, 2000). Das Tigerinin-1 aus dem Frosch *Rana tigerina* besteht aus 11 Aminosäuren und ist damit ähnlich groß wie unser Peptid (Purna Sai K. *et al.*, 2001) oder das Temporin A mit 13 Aminosäuren aus dem europäischen Frosch *Rana temporaria* (Simmaco M. *et al.*, 1995). In der Diptere *Sacrophaga peregrine* konnte das Peptid N- β -Alanyl-5-S-Glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanin als antibakteriell nachgewiesen werden (Leem JY. *et al.*, 1999).

Das natürliche Habitat von Dipteren und ihren Larven ist durch eine Vielzahl an pathogenen Erregern gekennzeichnet. Demzufolge müssen ständig antibakterielle Substanzen bzw. Peptide sezerniert werden. Das gilt im besonderem für die Larven der Tiere, da sie noch kein vollständiges entwickeltes Immunsystem haben. Hancock und Diamond (2000) konnten zeigen, dass die Synthese von antibakteriellen Peptiden nicht induziert werden muss, sondern ständig in sekretorischen Zellen abläuft. In einer Studie mit *Lucilia* konnte dies bestätigt werden. Kerridge *et al.* (2005) fand keinen Unterschied in der Aktivität gegen Staphylokokken zwischen stimulierten und nicht stimulierten Larven.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der antibakterielle Faktor im ES-Produkt die Eigenschaften eines antibakteriellen Peptids hat. Diese Annahme kann durch die vorliegende Arbeit untermauert werden. Die biochemischen Parameter des antibakteriellen Faktors sind niedriges Molekulargewicht, Thermostabilität, Protease-Resistenz, posttranslationale Modifikationen, konstitutive Expression und mögliche potente Wirkung gegen *S. aureus*. Diese Charakteristika sind typisch für antibakterielle Peptide, wie man sie in Insekten findet (Bexfield A. *et al.*, 2004). Ob das von uns identifizierte Nonapeptid tatsächlich antibakterielle Wirkung hat, muss nach weiterer Sequenzaufklärung durch Peptidsynthese und Testung der Syntheseprodukte im *Luziferase-Assay* überprüft werden. Weitere Sequenzanalysen stehen an. Eine experimentelle Variante wäre, dass man das Peptid enzymatisch vom N-Terminus her zu sequenzieren sucht. Eine andere Variante an Sequenzinformationen zu kommen, wäre sicherlich der Edmann-Abbau. Dabei sollte man beachten, dass dafür

ausreichend Probenmenge zu Verfügung steht und ein hoher Reinheitsgrad der Probe vorliegt. Alternativ könnte das Peptid mit Chymotrypsin gespalten werden, um kurze Fragmente zu generieren, deren Massen Auskunft über die zentrale Aminosäuresequenz geben. Weitere Informationen über die Sequenz des Peptids zu erlangen, könnte durch MALDI-MS im *Post-Source Decay* (PSD) Modus möglich sein. Die PSD-Fragmentierung liefert häufig komplementierende Sequenzinformationen zur ESI-MS/MS, insbesondere im Bereich kleiner Peptidfragmente.

3.3.6 *Extended Peptides*

Das von uns beschriebene antibakterielle Peptid gehört nicht zu den α -helikalen Peptiden oder den Peptiden mit einer β -Faltblattstruktur. Es gehört eher der dritten Klasse von antibakteriellen Peptiden an. In dieser Klasse werden Peptide eingeordnet, die keine Sekundärstruktur haben. Diese Peptide werden deshalb auch als *Extended* („gestreckten“) *Peptides* bezeichnet (Abb.35/S.97). Sie zeichnen sich meistens durch einen hohen Anteil an aromatischen Aminosäuren, Glycin und Prolin aus. Darüber hinaus gehören aber auch Peptide mit einer anderen Aminosäurezusammensetzung dazu. Der klassische Wirkungsmechanismus, wie er bei kationischen Peptiden beschrieben wird, spielt bei diesen Peptiden keine Rolle. Stattdessen interagieren sie mit den Membranlipiden über Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals Kräfte. Das Indolicidin aus dem Rind (Selsted ME. *et al.*, 1992) ist das am besten untersuchte Peptid aus dieser Klasse. Es ist reich an Tryptophan, besteht aus 13 Aminosäuren und ist am C-Terminus amidiert. (Selsted ME. *et al.*, 1992).

Für den Wirkungsmechanismus gibt es verschiedene Modelle. Bei einem Modell kommt es zu einer Steigerung der Membran-Permeabilität durch die Ausbildung eines Ionenkanals in der Membran (Falla TJ. *et al.*, 1996). Ein anderes Modell beschreibt die Wirkung des Peptids im Zytoplasma der Bakterienzelle. Dort inhibiert es die DNA Synthese über einen Mechanismus, den man als *self-*

Ergebnisse und Diskussion

promoted uptake bezeichnet (Hsu CH. *et al.*, 2005 & Piers KL. *et al.*, 1994). Der tatsächliche Mechanismus ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Erst kürzlich konnte eine Arbeitsgruppe aus Kanada unter der Leitung von Shaw (2006) Licht in den bis jetzt noch nicht verstandenen Mechanismus bringen. Demnach ist die Interaktion des Indolicidin mit der Membran konzentrationsabhängig. Bei niedriger Peptidkonzentration (weniger als 5µg/ml)

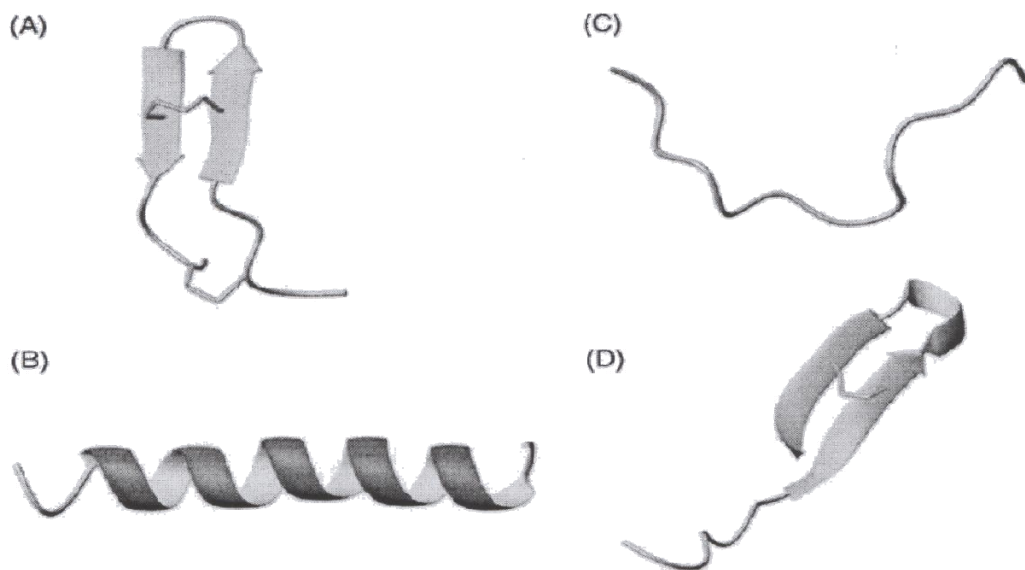


Abbildung 35: Die Klassen der antibakteriellen Peptide nach ihrer Sekundärstruktur. (a) β -Faltblatt, Tachyplesin (Laederach A. *et al.*, 2002); (b) α -Helikal, Magainin 2 (Gesell J. *et al.*, 1997); (c) Extended; Indolicidin (Rozek A. *et al.*, 2000) und (d) das synthetische hergestellte Peptid Thanatin mit Loop (Mandard N. *et al.*, 1998).

formt das Indolicidin eine formlose Gestalt in der flüssigen Domäne der Membran. Diese Domäne enthält anionische Lipide. Bei hoher Peptidkonzentration leitet das Indolicidin den Aufbau eines Tunnels in der Membran und zwar unabhängig von der Anwesenheit von anionischen Lipiden (Shaw JE. *et al.*, 2006). Shaw *et al.* (2006) und seine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Interaktion des Indolicidin mit der Membran von mehreren Faktoren beeinflusst wird. Diese beeinflussenden Faktoren sind die elektrostatischen Interaktionen mit der Membran, die flüssigen Lipidschicht und die Peptidkonzentration (Shaw JE. *et al.*, 2006).

Ergebnisse und Diskussion

Andere Studien beschreiben die Interaktion des Indolicidin mit zellulären Komponenten, wie mit der Phospholipase A₂ (PLA₂). Die PLA₂ katalysiert die Hydrolyse von Lipiden und ist an mehreren zellulären Prozessen, wie an der Signaltransduktion, der Spaltung von Lipiden und Immunantwort, involviert (Li Q. *et al.*, 2002; Zhao H. und Kinnunen PK. 2003). Diese Untersuchungen zeigen also, dass das Indolicidin nicht nur an der Membranpermeabilität involviert ist, sondern auch andere Funktionen wahr nimmt (Shaw JE. *et al.*, 2006).

Es ist durchaus möglich, dass andere Peptide aus dieser Klasse ähnliche Effekte auf die Membran ausüben.

4. Zusammenfassung

Die *Biochirurgie* oder *Maggot-Debriment-Therapy* (MDT) ist eine einfache und erfolgreiche Methode zur Behandlung von infektiösen und nekrotischen Wunden. Der Behandlung von chronischen Wunden mit Larven der Schmeißfliege *Lucilia sericata* kommt eine zunehmende Bedeutung zu, da in diesen Wunden vermehrt multiresistente pathogene Erreger, insbesondere Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), auftreten. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung antibakterieller Wirkstoffe der Fliegenmade *Lucilia sericata*, die eine Rolle in der „biochirurgischen“ Wundheilung spielen könnten. Es wurden drei experimentelle Ansätze verfolgt: (I) In den Speicheldrüsen der Larven sollten nach vorliegenden Erkenntnissen antibakterielle Peptide generiert werden, die dann auf die Wundoberfläche sezerniert werden und dort wirksam sind. In diesem Kontext wurde eine Peptidomanalyse auf der Grundlage von 3000 Speicheldrüsen durchgeführt. Im Sekret der Drüsen konnte eine Sequenz identifiziert werden, die zur β -Untereinheit des Inhibins gehört. Aus der β -Untereinheit wird das Activin generiert, das eine wichtige Rolle in der Wundheilung durch Keratinocyten-Stimulation spielt. (II) Durch eine Gel-basierende Proteomanalyse des Mischproduktes aus Sekret und Exkret (ES-Produkt) sollte die Gesamtheit der Proteine und Propeptide, aus denen antibakterielle Peptide prozessiert werden können, identifiziert werden. Bei diesem Ansatz konnte ein Dermaseptin-ähnliches Propeptid identifiziert werden, das eine potente Wirkung gegen gram-positive und gram-negative Bakterien besitzt. (III) Eine Peptidomanalyse des ES-Produktes wurde durchgeführt, um antibakterielle Peptide im ES-Produkt direkt zu identifizieren. Bei dieser Analyse konnte in der Peptidfraktion des ES-Produktes eine potente Wirkung gegen *Staphylococcus aureus in vitro* nachgewiesen und nach zweidimensionaler chromatographischer Trennung der Peptide einer bestimmten Fraktion zugewiesen werden. Die aktive Fraktion wurde durch MALDI-MS und LC-ESI-MS/MS vermessen. Das Spektrum der MALDI-MS-Analyse zeigt ein intensives Ionensignal mit der Masse 1060 Da. Die anschließende LC-ESI-MS/MS Analyse identifiziert ein Nonapeptid mit der Aminosäuresequenz **S-Y-A(N, F, V)A-Y-D** als dominante Komponente dar. Eine abschließende Zuweisung von biologischer Aktivität und Peptidstruktur bleibt weiteren Strukturanalysen vorbehalten.

5. Abstract:

Maggot therapy is a simple and highly successful treatment used for centuries for the clearing of necrotic and infected wounds. Recently, the application of maggot treatment became increasingly important for the treatment of non-healing wounds, which are infected by multi-drug resistant pathogens, especially methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The aim of this thesis was to identify and characterise antibacterial substances produced by maggots of the greenbottle fly *Lucilia sericata*.

To approach this problem we analysed both the secretions of salivary glands as well as the content of the excretion/secretion product of *Lucilia sericata* maggots. In the peptidome of the salivary glands we identified a peptide fragment generated from the β -subunit of the protein inhibin. This protein is related to the short protein activin, derived from the β -subunit of Inhibin, which plays an important role in wound healing. The complete excretion/secretion product of *Lucilia sericata* maggots was screened for therapeutically active propeptides and peptides by performing a classical, gel-based proteomic study. In the small protein fraction we identified a dermaseptin-like protein. This protein showed powerful effects against gram negative and gram positive bacteria. The peptide fraction of the ES-product expressed a potent anti-bacterial activity against *Staphylococcus aureus in vitro*. Biochemical purification by two-dimensional chromatography over reversed-phase and hydrophilic columns resulted in the isolation of fraction with activity against *Staphylococcus aureus*. By mass spectrometry a single dominant at m/z 1060 Da was identified in active fractions. By LS-ESI/MS/MS of active fractions a nonapeptide was partially sequenced: **S-Y-A(N,F,V)A-Y-D**. A final assignment of biological activity and peptide structure remains to be achieved by further structural analysis.

6. Literaturverzeichnis

[Ausubel FM.](#)

Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?
Nat Immunol. 2005 Oct;**6**(10):973-9. Review.

[Awad WM Jr, Soto AR, Siegel S, Skiba WE, Bernstrom GG, Ochoa MS.](#)

The proteolytic enzymes of the K-1 strain of *Streptomyces griseus* obtained from a commercial preparation (Pronase). I. Purification of four serine endopeptidases.

J Biol Chem. 1972 Jul 10;**247**(13):4144-54.

[Baum B, Perrimon N.](#)

Spatial control of the actin cytoskeleton in *Drosophila* epithelial cells.
Nat Cell Biol. 2001 Oct;**3**(10):883-90.

[Baggerman G, Vierstraete E, De Loof A, Schoofs L.](#)

Gel-based versus gel-free proteomics: a review.

Comb Chem High Throughput Screen. 2005 Dec;**8**(8):669-77. Review.

[Bellahn I.](#)

Biochemische Charakterisierung vakulärer Vesikel aus *Saccharomyces cerevisiae*.
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln. 2002

[Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA.](#)

Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Microbes Infect. 2004 Nov;**6**(14):1297-304.

[Bogdanov M, Sun J, Kaback HR, Dowhan W.](#)

A phospholipid acts as a chaperone in assembly of a membrane transport protein.

J Biol Chem. 1996 May 17;**271**(20):11615-8.

[Boman HG.](#)

Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts.

J Intern Med. 2003 Sep;**254**(3):197-215. Review.

[Bonn D.](#)

Maggot therapy: an alternative for wound infection.

Lancet. 2000 Sep 30;**356** (9236):1174.

[Boutros M, Agaisse H, Perrimon N.](#)

Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*.

Dev Cell. 2002 Nov;**3**(5):711-22.

[Bulet P, Dimarcq JL, Hetru C, Lagueux M, Charlet M, Hegy G, Van Dorselaer A, Hoffmann JA.](#)

A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution.

J Biol Chem. 1993 Jul 15;**268**(20):14893-7.

[Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D.](#)

Antimicrobial peptides in insects; structure and function.

Dev Comp Immunol. 1999 Jun-Jul;**23**(4-5):329-44. Review.

[Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Phillips D, Hall M, Church JC, Pritchard DI.](#)

Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds.

Br J Dermatol. 2003 Jan;**148**(1):14-23.

[Chambers HF.](#)

The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?

Emerg Infect Dis. 2001 Mar-Apr;**7**(2):178-82. Review.

[Chambers HF.](#)

Methicillin resistance in *staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications.

Clin Microbiol Rev. 1997 Oct;**10**(4):781-91. Review.

[Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA, Letellier L.](#)

Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*.

J Biol Chem. 1993 Sep 15;**268**(26):19239-45.

[Cook RW, Thompson TB, Jardetzky TS, Woodruff TK.](#)

Molecular biology of inhibin action.

Semin Reprod Med. 2004 Aug;**22**(3):269-76. Review.

[Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y.](#)

Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2003 Jan 1;**36**(1):53-9. Epub 2002 Dec 13.

[Courgeon AM, Maingourd M, Maisonhaute C, Montmory C, Rollet E, Tanguay RM, Best-Belpomme M.](#)

Effect of hydrogen peroxide on cytoskeletal proteins of *Drosophila* cells: comparison with heat shock and other stresses.

Exp Cell Res. 1993 Jan;**204**(1):30-7.

[Cunningham HH](#)

Surgery and infections.

In: Doctors in Gray. The confederate Medical Service. *Gloucester, MA. Peter Smith.* 1970. pp **218-246**

[Dang CN, Prasad YD, Boulton AJ, Jude EB.](#)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the diabetic foot clinic: a worsening problem.

Diabet Med. 2003 Feb;**20**(2):159-61.

[De Gregorio E, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B.](#)

Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Oct 23;**98**(22):12590-5. Epub 2001 Oct 16.

[De Smet K, Contreras R.](#)

Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett.* 2005 Sep;**27**(18):1337-47. Review.

[Dery O, Bunnett NW.](#)

Proteinase-activated receptors: a growing family of heptahelical receptors for thrombin, trypsin and tryptase.

Biochem Soc Trans. 1999 Feb;**27**(2):246-54. Review.

[Dissemond J, Korber A, Lehnen M, Grabbe S.](#)

[Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in chronic wounds: therapeutic options and perspectives]

J.Dtsch Dermatol Ges. 2005 Apr;**3**(4):256-62. Review German.

[Dissemond J, Koppermann M, Esser S, Schultewolter T, Goos M, Wagner SN.](#)

Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as part of biosurgical management of a chronic leg ulcer
Hautarzt. 2002 Sep;53(9):608-12. German.

[Eramaa M, Hurme M, Stenman UH, Ritvos O.](#)

Activin A/erythroid differentiation factor is induced during human monocyte activation.
J Exp Med. 1992 Nov 1;176(5):1449-52.

[Ehrenstein G, Lecar H.](#)

Electrically gated ionic channels in lipid bilayers.
Q Rev Biophys. 1977 Feb;10(1):1-34.

[Ekengren S, Hultmark D.](#)

Drosophila cecropin as an antifungal agent.
Insect Biochem Mol Biol. 1999 Nov;29(11):965-72.

[Erdmann GR, Khalil SK.](#)

Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae)
J Med Entomol. 1986 Mar 31;23(2):208-11.

[Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock RE.](#)

Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin.
J Biol Chem. 1996 Aug 9;271(32):19298-303.

[Fleischmann W, Russ M, Moch D, Marquardt C.](#)

Biosurgery - maggots, are they really the better surgeons?]
Chirurg. 1999 Nov;70(11):1340-6. German.

[Gesell J, Zasloff M, Opella SJ.](#)

Two-dimensional 1H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution.
J Biomol NMR. 1997 Feb;9(2):127-35.

[Gibson BW, Tang DZ, Mandrell R, Kelly M, Spindel ER.](#)

Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the Asian toad, *Bombina orientalis*.
J Biol Chem. 1991 Dec 5;266(34):23103-11.

[Giovannini MG, Poulter L, Gibson BW, Williams DH.](#)

Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones.

Biochem J. 1987 Apr 1;**243**(1):113-20.

[Grassberger M, Frank C.](#)

[Wound healing by sterile fly larvae: basic mechanical, biochemical and microbiological principles]

Wien Med Wochenschr. 2003;**153**(9-10):198-201. Review. German.

[Gregory PD, Lewis RA, Curnock SP, Dyke KG](#)

Studies of the repressor (BlaI) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*

Mol Microbiol. 1997 Jun;**24**(5):1025-37

[Guarna Marta M, Coulson R. & Rubinchik E.](#)

Anti-inflammatory of cationic peptides: application to the treatment of acne vulgaris.

FEMS Microbiol Lett **257** (2006) 1-6

[Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R.](#)

Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Aug 15;**97**(17):9390-5.

[Mackintosh JA, Veal DA, Beattie AJ, Gooley AA.](#)

Isolation from an ant *Myrmecia gulosa* of two inducible O-glycosylated proline-rich antibacterial peptides.

J Biol Chem. 1998 Mar 13;**273**(11):6139-43.

[Hafez IM, Maurer N, Cullis PR.](#)

On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids.

Gene Ther. 2001 Aug;**8**(15):1188-96.

[Hancock RE.](#)

Peptide antibiotics.

Lancet. 1997 Feb 8;**349**(9049):418-22. Review.

[Hancock RE, Chapple DS.](#)

Peptide antibiotics.

Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jun;**43**(6):1317-23. Review

[Hancock RE.](#)

Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials.
Lancet Infect Dis. 2001 Oct;**1**(3):156-64. Review.

[Hetru C, Troxler L, Hoffmann JA.](#)

Drosophila melanogaster antimicrobial defense.
J Infect Dis. 2003 Jun 15;**187** Suppl 2:S327-34. Review.

[Hiemstra PS.](#)

Defensins and cathelicidins in inflammatory lung disease: beyond antimicrobial activity.
Biochem Soc Trans. 2006 Apr;**34**(Pt 2):276-8.

[Hoffmann JA.](#)

The immune response of *Drosophila*.
Nature. 2003 Nov 6;**426**(6962):33-8. Review.

[Horobin AJ, Shakesheff KM, Woodrow S, Robinson C, Pritchard DI.](#)

Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components.
Br J Dermatol. 2003 May;**148**(5):923-33.

[Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI.](#)

Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon the migration of human dermal fibroblasts over a fibronectin-coated surface.
Wound Repair Regen. 2005 Jul-Aug;**13**(4):422-33.

[Hsu CH, Chen C, Jou ML, Lee AY, Lin YC, Yu YP, Huang WT, Wu SH.](#)

Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA.
Nucleic Acids Res. 2005 Jul 20;**33**(13):4053-64.

[Hubner G, Werner S.](#)

Serum growth factors and proinflammatory cytokines are potent inducers of activin expression in cultured fibroblasts and keratinocytes.
Exp Cell Res. 1996 Oct 10;**228**(1):106-13.

[Izadpanah A, Gallo RL.](#)

Antimicrobial peptides.
J Am Acad Dermatol. 2005 Mar;**52**(3 Pt 1):381-90; quiz 391-2. Review.

[Jiang H. and Kanost MR.](#)

The clip-domain family of serine proteinase in arthropods
Mol. Biol. **30** (2000) 95-105

[Jiang N, Kolhekar AS, Jacobs PS, Mains RE, Eipper BA, Taghert PH.](#)

PHM is required for normal developmental transitions and for biosynthesis of secretory peptides in *Drosophila*.
Dev Biol. 2000 Oct 1;**226**(1):118-36.

[Kambris Z, Hoffmann JA, Imler JL, Capovilla M.](#)

Tissue and stage-specific expression of the Tolls in *Drosophila* embryos.
Gene Expr Patterns. 2002 Dec;**2**(3-4):311-7.

[Kerridge A, Lappin-Scott H, Stevens JR.](#)

Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*.
Med Vet Entomol. 2005 Sep;**19**(3):333-7.

[Kirby WM, Rantz LA.](#)

Methods of Measuring Penicillin Concentrations in Body Fluids.
J Bacteriol. 1944 Nov;**48**(5):603-608

[Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L Jr.](#)

The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding.
Biochemistry. 2001 Mar 13;**40**(10):3016-26.

[Laederach A, Andreotti AH, Fulton DB.](#)

Solution and micelle-bound structures of tachyplesin I and its active aromatic linear derivatives.
Biochemistry. 2002 Oct 15;**41**(41):12359-68.

[Lehane MJ, Wu D, Lehane SM.](#)

Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Oct 14;**94**(21):11502-7.

[Leem JY, Jeong IJ, Park KT, Park HY.](#)

Isolation of p-hydroxycinnamaldehyde as an antibacterial substance from the saw fly, *Acantholyda parki* S.
FEBS Lett. 1999 Jan 8;**442**(1):53-6.

[Leem JY, Nishimura C, Kurata S, Shimada I, Kobayashi A, Natori S.](#)

Purification and characterization of N-beta-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly).
J Biol Chem. 1996 Jun 7;**271**(23):13573-7.

[Lerch K, Linde HJ, Lehn N, Grifka J.](#)

Bacteria ingestion by blowfly larvae: an in vitro study.
Dermatology. 2003;**207**(4):362-6.

[Levashina EA, Langley E, Green C, Gubb D, Ashburner M, Hoffmann JA, Reichhart JM](#)

Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*.
Science. 1999 Sep 17;**285**(5435):1917-9.

[Levy F, Rabel D, Charlet M, Bulet P, Hoffmann JA, Ehret-Sabatier L.](#)

Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*.
Biochimie. 2004 Sep-Oct;**86**(9-10):607-16.

[Levy F, Bulet P, Ehret-Sabatier L.](#)

Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*.
Mol Cell Proteomics. 2004 Feb;**3**(2):156-66. Epub 2003 Nov 28.

[Li Q, Lawrence CB, Maelor Davies H, Everett NP.](#)

A tridecapeptide possesses both antimicrobial and protease-inhibitory activities.
Peptides. 2002 Jan;**23**(1):1-6.

[Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann JA, Reichhart JM.](#)

Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease.
Science. 2002 Jul 5;**297**(5578):114-6.

[Linde HJ, Notka F, Irtenkauf C, Decker J, Wild J, Niller HH, Heisig P, Lehn N.](#)

Increase in MICs of ciprofloxacin in vivo in two closely related clinical isolates of *Enterobacter cloacae*.
J Antimicrob Chemother. 2002 Apr;**49**(4):625-30.

[Livant DL, Brabec RK, Kurachi K, Allen DL, Wu Y, Haaseth R, Andrews P, Ethier SP, Markwart S.](#)

The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice.
J Clin Invest. 2000 Jun;**105**(11):1537-45.

[Livingston SK.](#)

The therapeutic active principle of maggots with a description of its clinical application in 567 cases.

J. Bone Joint Surg. 1936;**18**:751-756

[Livingston SK.](#)

The treatment of chronic osteomyelitis with special reference to the use of maggot active principle.

JAMA 1932;**98**:1143-1149

[Loseva O, Engstrom Y.](#)

Analysis of signal-dependent changes in the proteome of *Drosophila* blood cells during an immune response.

Mol Cell Proteomics. 2004 Aug;**3**(8):796-808. Epub 2004 May 17.

[Lowy FD.](#)

Staphylococcus aureus infections.

N Engl J Med. 1998 Aug 20;**339**(8):520-32. Review

[Lowy FD.](#)

Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.

J Clin Invest. 2003 May;**111**(9):1265-73. Review.

[Mandard N, Sodano P, Labbe H, Bonmatin JM, Bulet P, Hetru C, Ptak M, Vovelle F.](#)

Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data.

Eur J Biochem. 1998 Sep 1;**256**(2):404-10.

[Mangoni ML, Miele R, Renda TG, Barra D, Simmaco M.](#)

The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms.

FASEB J. 2001 Jun;**15**(8):1431-2.

[Matutte B, Storey KB, Knoop FC, Conlon JM.](#)

Induction of synthesis of an antimicrobial peptide in the skin of the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica*, in response to environmental stimuli.

FEBS Lett. 2000 Oct 20;**483**(2-3):135-8.

[Meylaers K, Cerstiaens A, Vierstraete E, Baggerman G, Michiels CW, De Loof A, Schoofs L.](#)

Antimicrobial compounds of low molecular mass are constitutively present in insects: characterisation of beta-alanyl-tyrosine.

Curr Pharm Des. 2003;**9**(2):159-74. Review.

[Meylaers K, Clynen E, Daloze D, DeLoof A, Schoofs L.](#)

Identification of 1-lysophosphatidylethanolamine (C(16:1)) as an antimicrobial compound in the housefly, *Musca domestica*.
Insect Biochem Mol Biol. 2004 Jan;**34**(1):43-9

[Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J.](#)

Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein.
Nature. 2001 Dec 13;**414**(6865):756-9

[Mor A, Nguyen VH, Delfour A, Migliore-Samour D, Nicolas P.](#)

Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin.
Biochemistry. 1991 Sep 10;**30**(36):8824-30.

[Mor A, Hani K, Nicolas P.](#)

The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms.
J Biol Chem. 1994 Dec 16;**269**(50):31635-41.

[Mumcuoglu KY.](#)

Clinical applications for maggots in wound care.
Am J Clin Dermatol. 2001;**2**(4):219-27. Review.

[Mumcuoglu KY, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshis M.](#)

Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: *Calliphoridae*).
J Med Entomol. 2001 Mar;**38**(2):161-6.

[Munz B, Hubner G, Tretter Y, Alzheimer C, Werner S.](#)

A novel role of activin in inflammation and repair.
J Endocrinol. 1999 May;**161**(2):187-93. Review

[Munz B, Smola H, Engelhardt F, Bleuel K, Brauchle M, Lein I, Evans LW, Huylebroeck D, Balling R, Werner S.](#)

Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair.
EMBO J. 1999 Oct 1;**18**(19):5205-15.

[Murray BE.](#)

Vancomycin-resistant enterococcal infections.
N Engl J Med. 2000 Mar 9;**342**(10):710-21. Review.

[Mylotte JM, McDermott C, Spooner JA.](#)

Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia.

Rev Infect Dis. 1987 Sep-Oct;9(5):891-907. Review.

[O'Meara S, Cullum N, Majid M, Sheldon T.](#)

Systematic reviews of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration.

Health Technol Assess. 2000;4(21):1-237. Review.

[Ooi JY, Yagi Y, Hu X, Ip YT](#)

The *Drosophila* Toll-9 activates a constitutive antimicrobial defense.

EMBO Rep. 2002 Jan;3(1):82-7. Epub 2001 Dec 19.

[Park CB, Kim HS, Kim SC.](#)

Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions.

Biochem Biophys Res Commun. 1998 Mar 6;244(1):253-7.

[Pavillard ER, Wright EA.](#)

An antibiotic from maggots.

Nature. 1957 Nov 2;180(4592):916-7.

[Pierschbacher MD, Ruoslahti E.](#)

Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Oct;81(19):5985-8.

[Piers KL, Hancock RE.](#)

The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*.

Mol Microbiol. 1994 Jun;12(6):951-8.

[Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Balian G, Kang AH.](#)

Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. Localization of the chemotactic region to a 140,000-molecular weight non-gelatin-binding fragment.

J Exp Med. 1981 Feb 1;153(2):494-9.

[Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y.](#)

Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes.

Biochemistry. 1992 Dec 15;31(49):12416-23.

[Powers JP, Hancock RE.](#)

The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. 2003 Nov;**24**(11):1681-91. Review.

[Prete PE.](#)

Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy.

Life Sci. 1997;**60**(8):505-10.

[Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van Dorsselaer A, Lunardi J.](#)

A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels.

Proteomics. 2001 May;**1**(5):699-704.

[Ramet M, Manfrulli P, Pearson A, Mathey-Prevot B, Ezekowitz RA.](#)

Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*.

Nature. 2002 Apr 11;**416**(6881):644-8. Epub 2002 Mar 24.

[Rietveld AG, Koorengevel MC, de Kruijff B.](#)

Non-bilayer lipids are required for efficient protein transport across the plasma membrane of *Escherichia coli*.

EMBO J. 1995 Nov 15;**14**(22):5506-13.

[Rozek A, Friedrich CL, Hancock RE.](#)

Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles.

Biochemistry. 2000 Dec **26**;39(51):15765-74.

[Rinaldi AC.](#)

Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario.

Curr Opin Chem Biol. 2002 Dec;**6**(6):799-804. Review.

[Schroder JM.](#)

Antimicrobial peptides: effector molecules of the skin as immune organ

Hautarzt. 2002 Jun;**53**(6):424-34; quiz 435-7. German

[Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, Tang YQ, Smith W, Cullor JS.](#)

Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils.

J Biol Chem. 1992 Mar 5;**267**(7):4292-5.

[Shaw JE, Alattia JR, Verity JE, Prive GG, Yip CM.](#)

Mechanisms of antimicrobial peptide action: studies of indolicidin assembly at model membrane interfaces by in situ atomic force microscopy.

J Struct Biol. 2006 Apr; **154**(1):42-58. Epub 2006 Jan 13.

[Sherman RA, Pechter EA.](#)

Maggot therapy: a review of the therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis.

Med Vet Entomol. 1988 Jul; **2**(3):225-30. Review.

[Sherman RA, Hall MJ, Thomas S.](#)

Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions.

Annu Rev Entomol. 2000; **45**:55-81. Review.

[Sherman RA.](#)

Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy.

Diabetes Care. 2003 Feb; **26**(2):446-51.

[Showsh SA, De Boever EH, Clewell DB.](#)

Vancomycin resistance plasmid in *Enterococcus faecalis* that encodes sensitivity to a sex pheromone also produced by *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob Agents Chemother. 2001 Jul; **45**(7):2177-8

[Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A.](#)

The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection.

N Engl J Med. 1999 Feb 18; **340**(7):517-23.

[Sieradzki K, Pinho MG, Tomasz A.](#)

Inactivated pbp4 in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*.

J Biol Chem. 1999 Jul 2; **274**(27):18942-6.

[Simmaco M, Barra D, Chiarini F, Noviello L, Melchiorri P, Kreil G, Richter K.](#)

A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata*.

Eur J Biochem. 1991 Jul 1; **199**(1):217-22.

[Singh SP, Coronella JA, Benes H, Cochrane BJ, Zimniak P.](#)

Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products.

Eur J Biochem. 2001 May; **268**(10):2912-23.

[Sitaram N, Sai KP, Singh S, Sankaran K, Nagaraj R.](#)

Structure-function relationship studies on the frog skin antimicrobial peptide tigerinin 1: design of analogs with improved activity and their action on clinical bacterial isolates.

[Antimicrob Agents Chemother.](#) 2002 Jul;**46**(7):2279-83.

[Song MD, Wachi M, Doi M, Ishino F, Matsuhashi M](#)

Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion.

[FEBS Lett.](#) 1987 Aug 31;**221**(1):167-71

[Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N.](#)

Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3.

[Blood.](#) 2001 Jun 15;**97**(12):3951-9.

[Steenvoorde P, Jacobi CE, Oskam J.](#)

Maggot debridement therapy: free-range or contained? An *in-vivo* study. [Adv Skin Wound Care.](#) 2005 Oct;**18**(8):430-5.

[Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG.](#)

Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity.

[Nature.](#) 1981 Jul 16;**292**(5820):246-8.

[Stone LL, Dalton HP, Haynes BW.](#)

Bacterial debridement of the burn eschar: the *in vivo* activity of selected organisms.

[J Surg Res.](#) 1980 Jul;**29**(1):83-92.

[Thomas S, Andrews AM, Hay NP, Bourgoise S.](#)

The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. [J Tissue Viability.](#) 1999 Oct;**9**(4):127-32.

[Ulvatne H, Vorland LH.](#)

Bactericidal kinetics of 3 lactoferricins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

[Scand J Infect Dis.](#) 2001;**33**(7):507-11.

[Vidal S, Khush RS, Leulier F, Tzou P, Nakamura M, Lemaitre B.](#)

Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses.

[Genes Dev.](#) 2001 Aug 1;**15**(15):1900-1

[Vierstraete E, Verleyen P, Baggerman G, D'Hertog W, Van den Bergh G, Arckens L, De Loof A, Schoofs L.](#)

A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jan 13; **101**(2):470-5. Epub 2004 Jan

[Vierstraete E, Verleyen P, Sas F, Van den Bergh G, De Loof A, Arckens L, Schoofs L.](#)

The instantly released *Drosophila* immune proteome is infection-specific. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 14; **317**(4):1052-60.

[Vierstraete E, Verleyen P, DE Loof A, Schoofs L.](#)

Differential proteomics for studying *Drosophila* immunity.

Ann N Y Acad Sci. 2005 Apr; **1040**:504-7.

[Vistnes LM, Lee R, Ksander GA.](#)

Proteolytic activity of blowfly larvae secretions in experimental burns. *Surgery.* 1981 Nov; **90**(5):835-41.

[Vogel HJ, Schibli DJ, Jing W, Lohmeier-Vogel EM, Epand RF, Epand RM.](#)

Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides.

Biochem Cell Biol. 2002; **80**(1):49-63. Review.

[Woods A, McCarthy JB, Furcht LT, Couchman JR.](#)

A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation.

Mol Biol Cell. 1993 Jun; **4**(6):605-13.

[Woodford N.](#)

Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci.

Clin Microbiol Infect. 2005 May; **11** Suppl 3:2-21. Review.

[Zasloff M.](#)

Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Aug; **84**(15):5449-53.

[Zasloff M.](#)

Antimicrobial peptides of multicellular organisms.

Nature. 2002 Jan **24**;415(6870):389-95.

Literaturverzeichnis

[Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF.](#)

A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in *staphylococci*.

Science. 2001 Mar 9; **291**(5510):1962-5.

[Zhao H, Kinnunen PK.](#)

Modulation of the activity of secretory phospholipase A2 by antimicrobial peptides.

Antimicrob Agents Chemother. 2003 Mar; **47**(3):965-71.

7. Danksagung

Ich danke Prof Dr. Franz Georg Hanisch für die Betreuung und Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Bei Prof. Dr. D. Schomburg bedanke ich mich für die Betreuung und die Übernahme des Korreferats.

Bedanken möchte ich mich bei Tanja, Isabelle, Hanhi, Mirko, Sebastian, Tilo, Katja und Kirsten für das ausgezeichnete Arbeitsklima im Labor und die praktische Hilfe bei vielen Problemen.

Besonderen Dank geht an die Kolleginnen und Kollegen aus dem Servicelabor des ZMMK die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mit denen ich den einen oder anderen unvergesslichen Moment erleben durfte.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Eltern und Geschwister die mich während meines Studiums und der Doktorarbeit stets mit Rat und Tat unterstützt haben.

Thomas und anderen danke ich für das unermüdliche Korrektur lesen

8. Erklärung

"Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. FG. Hanisch betreut worden."

Keine Teilpublikationen

Köln im Mai 2006

Marcus Berger

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Marcus Berger, geboren am 24.03.1976 in Köln,
nicht verheiratet

Schulbildung:

1982 – 1986 Städtische Gemeinschaftsgrundschule in Erftstadt

1986 – 1992 Städtische Realschule in Erftstadt-Lechenich
Abschluss: **Fachoberschulreife** mit der
Berechtigung zum Besuch der gymnasialen
Oberstufe

1992 – 1995 Städtisches Gymnasium in Erftstadt-Lechenich
Abschluss: **Allgemeine Hochschulreife**

Wehrdienst:

10/1995 – 07/1996 Absolvierung des Wehrdienstes in Giebelstadt und
Köln-Wahn im Sanitätsdienst der Bundeswehr

Hochschulstudium:

10/1996 - 12/2002 Studium an der Universität zu Köln im Fachbereich
Biologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät
Schwerpunkte: Biochemie, Zoologie, Pharmakologie
Abschluss: **Diplom-Biologe**, Gesamtnote: gut

03/2002 - 12/2002 **Diplomarbeit** in der AG von Prof. Dr. Krämer
im Institut für Biochemie mit dem Thema
„Charakterisierung transportkompetenter Vesikel
aus *Saccharomyces cerevisiae*“

Promotion:

03/2003 – 07/2006 **Doktorarbeit** in der AG von Prof. Dr. Hanisch
im Institut für Biochemie 2 (Medizinische
Fakultät) mit dem Thema „Identifizierung biologisch
aktiver Peptide und Proteine in den Sekreten von
Lucilia sericata im Wundheilungsgeschehen“

