

**Entwicklung von chemisch-synthetischen peptidischen Inhibitoren der zellulären
Invasion von Gruppe A Streptokokken und ihre Untersuchung in einem neu
entwickelten Hochdurchsatz-Assay**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Manuela Schüngel
aus Menden

1. Referent: apl. Prof. Dr. Gursharan Singh Chhatwal
2. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn
eingereicht am: 28.01.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am: 11.04.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Schüngel, M., Tegge, W., Chhatwal, G.S., Frank, R.: Development of peptide inhibitors for the cellular adherence and invasiveness of *S. pyogenes* in a new high-throughput-assay. (Poster und Beitrag im Tagungsband) Summer School Molecular Interactions during Infection, Quedlinburg (2006)

Schüngel, M., Tegge, W., Chhatwal, G.S., Frank, R.: Development of peptides inhibiting the cellular invasiveness of *S. pyogenes* and their testing in a new high-throughput assay. (Poster und Beitrag im Tagungsband) 2 Day Workshop Chemical Genomics, Braunschweig (2007).

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung und Zielsetzung	3
2.1	Mikrobiologische Grundlagen	3
2.1.1	<i>Streptococcus pyogenes</i> – Gruppe A Streptokokken	3
2.1.2	Infektionen mit GAS	4
2.1.3	Virulenzfaktoren von <i>S. pyogenes</i>	5
2.1.3.1	Adhärenzfaktoren	5
2.1.3.2	Weitere Virulenzfaktoren	8
2.1.4	Behandlungsansätze für Streptokokkeninfektionen	9
2.2	Chemische Grundlagen	11
2.2.1	Peptidsynthese	11
2.2.2	Festphasen-Peptidsynthese	12
2.2.3	Peptidbibliotheken	15
2.3	Aufgabenstellung und Zielsetzung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Geräte	18
3.2	Chemikalien	19
3.3	Software	21
3.4	Methoden	21
3.4.1	Peptidsynthese	21
3.4.1.1	Synthese der linearen Kontrollpeptide	21
3.4.1.1.1	Synthese des 49mers	21
3.4.1.1.2	Synthese von PyOT5 und DMBT1pbs1	24
3.4.1.2	Synthese der Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren mit der Struktur xxx-o ₁ o ₂ -xxx-DKP	25
3.4.1.2.1	Nachsynthese einzelner Subbibliotheken	29
3.4.1.3	Nachsynthese zyklischer Peptide des Formats [aa-o ₁ o ₂ -aac]zyklo.....	30

3.4.1.4	HPLC-Reinigung der linearen Kontrollpeptide.....	31
3.4.1.5	Analytik der Syntheseprodukte.....	32
3.4.1.5.1	analytische HPLC	33
3.4.1.5.2	HPLC/ESI-MS	33
3.4.1.5.3	MALDI-MS	34
3.4.1.5.4	Aminosäurequantifizierung	34
3.4.2	Mikrobiologische Methoden.....	34
3.4.2.1	Bakterien.....	34
3.4.2.1.1	Verwendete <i>S. pyogenes</i> -Stämme.....	35
3.4.2.1.2	Medium für die Kultivierung der Streptokokken	35
3.4.2.1.3	Kultivierung und Konservierung	35
3.4.3	Zellbiologische Methoden	35
3.4.3.1	Puffer und Lösungen.....	36
3.4.3.2	Verwendete Zelllinie.....	36
3.4.3.2.1	Medien für die Zellkultur.....	36
3.4.3.2.2	Stammhaltung	37
3.4.3.3	Etablierung des Hochdurchsatz-Assays.....	37
3.4.3.3.1	Färbemethoden zur Erstellung der Kalibrationskurve	37
3.4.3.3.2	Erstellung der Kalibrationskurve	41
3.4.3.3.3	Adhäsionsassay	42
3.4.3.3.4	Invasionsassay	43
3.4.3.4	Infektionsversuch mit differentieller Fluoreszenzfärbung.....	44
3.4.3.5	Test der eingesetzten Peptide auf Zytotoxizität.....	45
3.4.3.6	Test der eingesetzten Peptide auf bakteriostatische Wirkung	46
3.4.4	Fluoreszenzmikroskopie	47
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Synthese der linearen Peptide	48
4.1.1	Synthese des 49mers	48
4.1.2	Synthese von PyOT5 und DMBT1pbs1	51
4.2	Synthese der Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren mit der Struktur xxx-o ₁ o ₂ -xxx-DKP	52
4.2.1	Nachsynthese einzelner Subbibliotheken	53
4.3	Nachsynthese zyklischer Peptide des Formats [aa-o ₁ o ₂ -aac]zyklo.....	54

4.4	Etablierung des Hochdurchsatz-Assays.....	55
4.4.1	Färbemethoden zur Erstellung der Kalibrationskurve	55
4.4.2	Erstellung der Kalibrationskurve	64
4.5	Test der Peptide	65
4.5.1	Adhäsions- und Invasionsassay	66
4.5.1.1	Lineare Peptide	67
4.5.1.2	Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren der Struktur xxx-o ₁ o ₂ -xxx-DKP	75
4.5.1.3	Zyklische Peptide der Struktur [aa-o ₁ o ₂ -aac]zyklo.....	80
4.5.2	Test auf Zytotoxizität.....	84
4.5.2.1	Lineare Peptide	85
4.5.2.2	Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäure der Struktur xxx-o ₁ o ₂ -xxx-DKP	85
4.5.2.3	Zyklische Peptide der Struktur [aa-o ₁ o ₂ -aac]zyklo.....	86
4.5.3	Test auf bakteriostatische Wirkung	89
4.5.3.1	Lineare Peptide	89
4.5.3.2	Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren der Struktur xxx-o ₁ o ₂ -xxx-DKP	89
4.5.3.3	Zyklische Peptidsammlung der Struktur [aa-o ₁ o ₂ -aac]zyklo.....	91
5	Diskussion.....	94
6	Anhang.....	105
6.1	Literaturverzeichnis	105
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	113
6.3	Tabellenverzeichnis	115
6.4	Abkürzungsverzeichnis.....	115
6.4.1	Abkürzungen.....	115
6.4.2	Verzeichnis der Aminosäuren.....	115
7	Danksagung	115
8	Curriculum Vitae	115

1 Zusammenfassung

Der humanpathogene Erreger *Streptococcus pyogenes* (Gruppe A Streptokokken) ist ein bedeutsamer Verursacher vielfältiger Infektionen. Dabei reicht das Spektrum von lokalen Infektionen der Haut und der Schleimhäute bis hin zu schweren invasiven Erkrankungen. Die Pathogenität von *S. pyogenes* ist eng mit seiner Fähigkeit zur Adhäsion an Epithelzellen und seine zelluläre Internalisierung assoziiert. Die Suche nach Substanzen, die die Adhäsion und somit auch die Invasion von *S. pyogenes* inhibieren, ist von dringendem medizinischen Interesse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein hochdurchsatzfähiger Mikrotiterplatten- und Fluoreszenz-basierter Assay für die Quantifizierung der Adhäsion und Internalisierung von *S. pyogenes* an und in die epitheliale Zelllinie HEp-2 entwickelt.

In dem Assay wurden einzelne synthetisierte Peptide mit definierten Sequenzen, eine im Rahmen der Arbeit ebenfalls synthetisierte Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren des Formats xxx-o₁o₂-xxx-DKP (x = Mischung von 19 Aminosäuren, o = definierte Aminosäuren; DKP = Diketopiperazin) sowie eine Sammlung zyklischer Peptide aus D-Aminosäuren der Struktur [aa-o₁o₂-aac]zyklo untersucht. Einige der synthetisierten definierten Peptide und die Peptidbibliothek sowie die Sammlung zyklischer Peptide wurden erstmalig auf ihre inhibitorischen Eigenschaften bezüglich der Internalisierung von *S. pyogenes* in epitheliale HEp-2-Zellen getestet.

Es konnte gezeigt werden, dass ein 49 Aminosäuren langer Abschnitt des SfbI-Proteins (das "49mer"), bzw. seine Sequenzvariante T37Y in der Lage waren, die Internalisierung eines SfbI-positiven *S. pyogenes*-Stammes (GAS A20) konzentrationsabhängig zu inhibieren; die ermittelten IC₅₀-Werte für die Invasion lagen bei 0,435 µM bzw. 0,368 µM. Da beide Peptide auch bei dem SfbI-negativen *S. pyogenes*-Stamm GAS A8 die Internalisierung reduzierten, wird vermutet, dass auch bei SfbI-negativen *S. pyogenes*-Stämmen ein Fibronektin-vermittelter Erstkontakt bei der Adhäsion stattfindet. Eine weitere Sequenzvariante des 49mer, das Peptid PyOT5 sowie das Peptid DMBT1pbs1 konnten den Internalisierungsprozess von GAS A20 nur schwach inhibieren.

Die eingesetzten Peptide zeigten in einem MTT-Test sowie einem bakteriellen Wachstumstest keine zytotoxische bzw. antibakterielle Aktivität.

Das Screening der Peptidbibliothek mit dem Format xxx-o₁o₂-xxx-DKP sowie der Sammlung zyklischer Peptide aus D-Aminosäuren zeigte, dass eine Reihe von Subbibliotheken bzw. Peptiden ebenfalls in der Lage sind, die Adhärenz und/oder die Invasion von GAS A20 zu inhibieren.

2 Einleitung und Zielsetzung

2.1 Mikrobiologische Grundlagen

2.1.1 *Streptococcus pyogenes* – Gruppe A Streptokokken

Streptococcus pyogenes (*S. pyogenes*) ist ein Gram-positiver, humanpathogener Erreger, der den Gruppe A Streptokokken (GAS) zugeordnet wird. Sie gehören zur Familie der *Streptococcaceae*. Die serologische Abtrennung zu anderen Gruppen der Familie der *Streptococcaceae*, wie z. B. den Gruppe B Streptokokken oder den Gruppe C Streptokokken, erfolgt über das so genannte Lancefield Antigen, einem gruppenspezifischen, membranständigen Polysaccharid (Lancefield 1933). Ein weiterer Oberflächenmarker, der für die Einteilung der Streptokokken in Serotypen benutzt wird, ist das M-Protein. Zur Zeit sind mehr als 100 Serotypen des M-Proteins bekannt (Brandt *et al.* 2000). Streptokokken kommen, wie ihr aus dem Griechischen stammender Name (streptos = gewunden, kokkos = Beere) induziert, in langen Ketten vor. Sie sind unbeweglich und bilden keine Sporen.

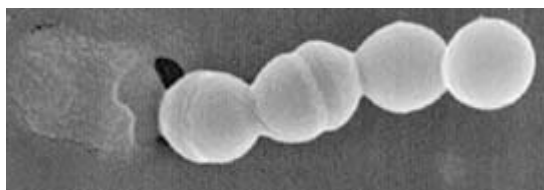


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer typischen *S. pyogenes*-Kette, aufgenommen während der Infektion von HUVEC-Zellen (aus: Rohde *et al.* (2003)).

Metabolisch betrachtet weist *S. pyogenes* folgende Charakteristika auf: er ist aerotolerant und Katalase-negativ. Weiterhin ist er homofermentativ, d. h. er bezieht die benötigte Energie aus der Fermentation von Glucose zu Lactat. Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der GAS ist ihre Hämolysefähigkeit, d. h. die Fähigkeit, Erythrozyten vollständig zu lysieren. Dies äußert sich in der Bildung klarer Höfe um auf Blutagar

wachsenden Kolonien. Durch diese so genannte β -Hämolyse lässt sich *S. pyogenes* von anderen, α -hämolisierenden Streptokokken, wie z. B. *Streptococcus pneumoniae*, differenzieren. Bei der α -Hämolyse, auch vergrünende Hämolyse genannt, wird das Hämoglobin durch Stoffwechselprodukte der Streptokokken chemisch reduziert; es verfärbt sich grün.

2.1.2 Infektionen mit GAS

Streptococcus pyogenes ist ein ausschließlich humanpathogener Erreger. Dabei dienen die menschliche Haut sowie die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes als Reservoir. Bei bis zu 20 % der Bevölkerung ist insbesondere in den Wintermonaten eine asymptomatische Besiedlung des Rachens nachweisbar. Gegenwärtig treten weltweit jährlich etwa 18 Millionen schwerwiegende GAS-Infektionen auf; Studien der WHO schätzen, dass sich diese Zahl jedes Jahr um über 1 Millionen Infektionen erhöht (WHO Presseinformation 2005). Bis zu 500.000 Fälle sind letal. Das Spektrum der GAS-Infektionen reicht dabei von lokalen Infektionen der Haut (Hautläsionen, Impetigo) und der Schleimhäute (Pharyngitis, Scharlach, Tonsillitis) (Cunningham 2000) bis hin zu schweren lebensbedrohlichen Krankheitsbildern wie dem *Streptococcal Toxic Shock Syndrom* (STSS) und nekrotisierender Faszitis (Efstratiou 2000). Eine weitere Gefahr bergen die auf eine GAS-Infektion möglicherweise folgenden Autoimmunerkrankungen wie akute Glomerulonephritis, rheumatisches Fieber und die dadurch ausgelöste rheumatische Endokarditis (Cunningham 2000; Stollerman 1997). Gerade in den Entwicklungsländern stellen diese Folgeerkrankungen ein großes Problem dar. So ist das rheumatische Fieber dort eine der Hauptursachen für kardiovaskuläre Mortalität. Studien belegen, dass in Entwicklungsländern bereits ein Zehntel der Schulkinder an rheumatischem Fieber leidet (Olivier 2000). Charakteristische Symptome dieser Autoimmunerkrankung sind Karditis, Polyarthritis, Chorea minor, Entzündungen der Haut und Bildung subkutaner Knötchen. Diese Symptome werden auch als Jones-Kriterien bezeichnet (Cunningham 2000). Ausgelöst wird das rheumatische Fieber u. a. durch eine Kreuzreaktivität des Oberflächenproteins M der GAS und zellulären Bestandteilen der Muskelzellen wie Myosin und Tropomyosin.

Obwohl sich die jährlichen Neuinfektionen mit GAS hauptsächlich auf lokale Infektionen beschränken, treten seit Mitte der 1980iger Jahre weltweit immer wieder Fälle schwerer systemischer Streptokokkeninfektionen und STSS auf (Ayoub 1992; Cone *et al.* 1987; Stromberg *et al.* 1991). Da es bis jetzt keine wirksame Therapie gibt, ist die Mortalitätsrate in diesen Fällen mit 30-60 % sehr hoch (Stevens 1995).

2.1.3 Virulenzfaktoren von *S. pyogenes*

Nach der Herstellung des Kontaktes zwischen dem Bakterium und seinem Wirt gibt es mehrere essentielle Schritte, um eine Infektion auszulösen. Der erste Schritt ist die Anheftung des Pathogens an den Wirt. Dies geschieht über bakterielle Adhäsine, die die Bindung an Epithelzellen der Haut und der Schleimhäute vermitteln. Um den Wirt erfolgreich zu kolonisieren muss *S. pyogenes* dabei gleichzeitig dessen Immunabwehr umgehen. Dazu müssen folgende Faktoren gegeben sein: Das Bakterium muss in der Lage sein, seine Aufnahme in phagozytische Zellen zu verhindern bzw. in phagozytischen Zellen zu überleben. Weiterhin muss es wirtseigene Antikörper degradieren können. Diese genannten Prozesse werden von verschiedensten Virulenzfaktoren der Bakterien übernommen, die eine erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes und somit das Überleben der Bakterien ermöglichen. Einige dieser Faktoren werden im Folgenden näher beschrieben.

2.1.3.1 Adhärenzfaktoren

Oberflächenkomponenten, die ein Pathogen zur Anheftung an das Wirtsgewebe befähigen, werden als Adhäsine oder Adhärenzfaktoren bezeichnet. Bei den von *S. pyogenes* exprimierten Adhäsinen handelt es sich zum größten Teil um Proteine, aber auch andere Faktoren wie Lipide oder Polysaccharide können in die Adhäsion involviert sein. Die Interaktionspartner der Adhäsine sind Moleküle der extrazellulären Matrix auf der Oberfläche der Wirtszelle, wie z. B. Fibronectin, Kollagen oder Laminin. Die meisten Pathogene exprimieren eine Vielzahl von Adhärenzfaktoren. Diese Fähigkeit lässt eine Beteiligung der einzelnen Adhäsine zu verschiedenen Zeitpunkten der

Adhäsion, eine umweltbedingte Expression und/oder eine Redundanz vermuten. Im Folgenden sollen einige dieser Adhärenzfaktoren beschrieben werden.

Streptococcus pyogenes besitzt verschiedene Oberflächenproteine, die in der Lage sind, das menschliche Glykoprotein Fibronectin zu binden. Das Protein FBP54 beispielsweise ist in allen *S. pyogenes*-Isolaten zu finden (Courtney *et al.* 1996). Ebenfalls in der Lage zur Fibronectinbindung ist das M1 Protein, welches nur von dem GAS-Serotyp M1 produziert wird. (Cue *et al.* 2000) konnten zeigen, dass der Fibronectin/M1-Komplex dabei an zelluläre $\alpha_5\beta_1$ -Integrine bindet. Diese Integrinklasse ist gleichzeitig der zelluläre Rezeptor für weitere fibronectinbindende Proteine, das SfbI und seine allelische Variante F1. Seit der Entdeckung ihrer Beteiligung an der Adhäsion durch Talay (Talay *et al.* 1992) bzw. Hanski (Hanski & Caparon 1992) sind beide die bis jetzt am besten charakterisiertesten fibronectinbindenden Proteine.

SfbI wird von einer Vielzahl von Serotypen exprimiert und hat einen modularen Aufbau (siehe Abbildung 2a). Die Fibronectinbindung erfolgt über zwei verschiedene Domänen (siehe Abbildung 2b) (Ozeri *et al.* 1996; Sela *et al.* 1993; Talay *et al.* 1994). Die Bindung der Fibrin-Heparin-Bindungsregion an die C-terminale Fibronectin-Bindungsregion des SfbI (I) führt bei diesem zu einer Konformationsänderung (II). Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der *spacer 2*-Region, die in der Folge an die Kollagen/Fibrinogen-Bindungsregion des Fibronectin bindet (III) (Talay *et al.* 2000). Der so entstandene Fibronectin/SfbI-Komplex ist nun in der Lage, über die RGD-Bindungsstelle des Fibronectins an ein $\alpha_5\beta_1$ -Integrin der Wirtszelle zu binden (IV). Das SfbI Protein besitzt neben seiner Fähigkeit Adhärenz zu vermitteln auch einen hohen Stellenwert bei der Invasion von *S. pyogenes* in die Wirtszelle (Jadoun *et al.* 1998). (Molinari *et al.* 1997) konnten zeigen, dass das SfbI Protein *per se* ausreicht, um eine Invasion zu gewährleisten. Die Invasionsmechanismen von SfbI-positiven und SfbI-negativen *S. pyogenes* unterscheiden sich dabei sehr deutlich (Talay *et al.* 2000). Bei der Invasion des SfbI-positiven Isolates A40 bildet die eukaryotische Zelle um die adhärennten Bakterien herum omega-förmige Membraneinstülpungen, so genannte Caveolae, aus, über die die Pathogene dann aufgenommen werden (Rohde *et al.* 2003). Die Streptokokken verbleiben in den sich daraus bildenden Caveosomen und können sogar einer Fusion mit Lysosomen entgehen. Neben seiner Funktion als Induktor der Internalisierung ist das SfbI allerdings auch in der Lage, eben diese zu inhibieren, wenn es extern zugegeben wird. So führte die Präinkubation von eukaryotischen Wirtszellen

mit rekombinantem SfbI zu einer drastischen Reduzierung der internalisierten *S. pyogenes* (Molinari *et al.* 1997; Talay *et al.* 1992). Eine experimentelle Verkürzung der Fibronectin-bindenden Regionen des Protein F1 durch (Ozeri *et al.* 1996) zeigte, dass sich der bindungsaktive Bereich auf zwei Abschnitte beschränken lässt. Der längere der beiden Abschnitte besteht aus sechs N-terminalen Aminosäuren des ersten Repeats und 43 benachbarten Aminosäuren des Spacers. Neben der Inhibition der Bindung von *S. pyogenes* an Fibronectin (Ozeri *et al.* 1996) ist er gleichzeitig in der Lage, die Bindung von Fibronectin an eukaryotische Zellen mit einem IC₅₀-Wert von ca. 10 nM zu inhibieren (Tomasini-Johansson *et al.* 2001). Weitere Arbeiten (Hahn 2002) haben gezeigt, dass das so genannte 49mer die Internalisierung von *S. pyogenes* in eukaryotische Wirtszellen bei externer Zugabe im µmolaren Bereich inhibiert.

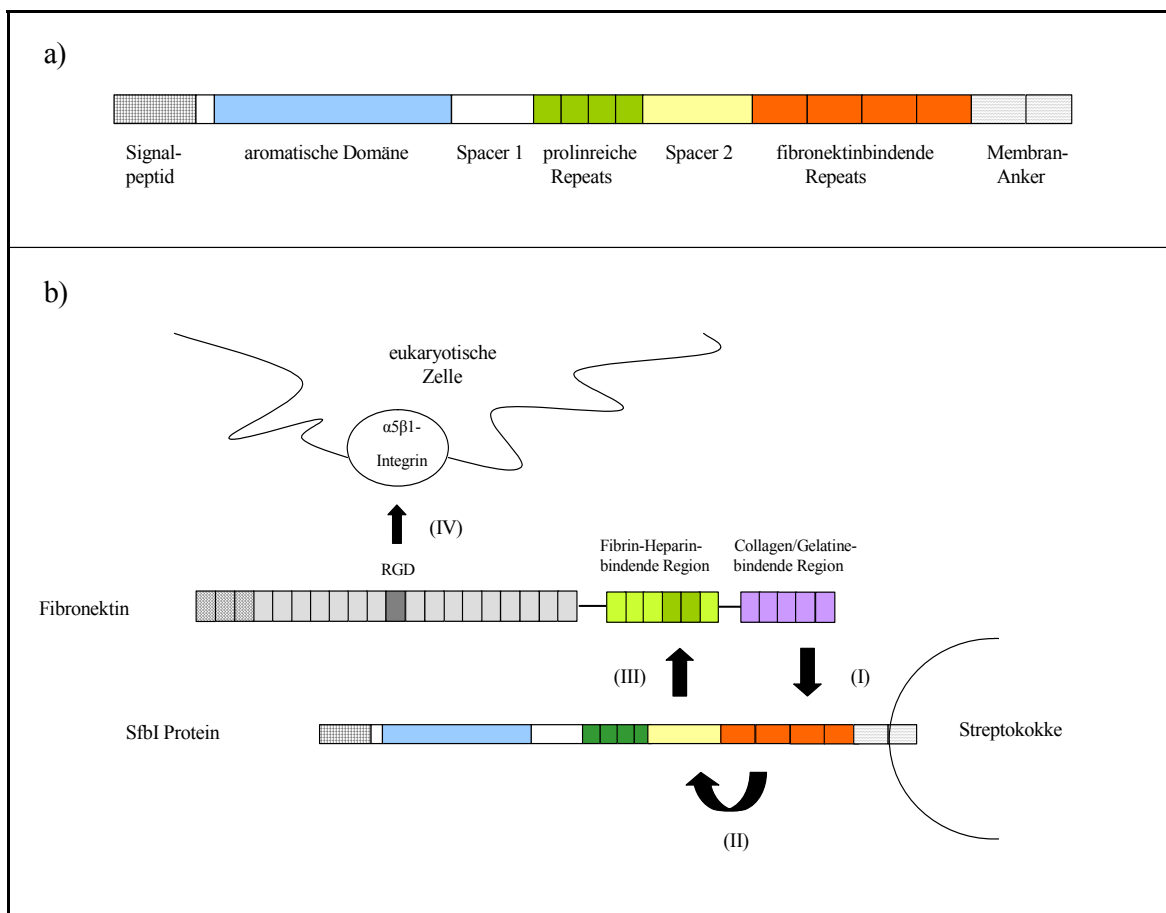


Abbildung 2: Schematische Darstellung a) des modularen Aufbaus von SfbI; b) Model der kooperativen Interaktion zwischen SfbI und humanem Fibronectin (modifiziert nach Talay (2000)). Nähere Erläuterungen im Text.

Viele GAS-Isolate, denen das Gen *sfbI/prtF1* fehlt, besitzen zwei weitere fibronectinbindende Proteine, nämlich PFBP oder F2 (Jaffe *et al.* 1996; Rocha & Fischetti 1999). Protein F2 besitzt wie SfbI zwei Bindungsdomänen, die mit Fibronectin interagieren können.

Ein weiteres fibronectinbindendes Protein ist das M1 Protein, ein Mitglied der M-Protein-Familie (Cue *et al.* 1998).

Das M3 Protein, ein anderes Mitglied der M-Proteinfamilie, ist in der Lage, Kollagen zu binden (Dinkla *et al.* 2003b). Die Bindung an das Kollagen erfolgt N-terminal und ist spezifisch für das M3 Protein. Neben dem M3 Protein besitzt auch die bei einigen GAS-Serotypen auftretende Hyaluronsäurekapsel die Fähigkeit, Kollagen zu binden (Dinkla *et al.* 2003a). Neben dieser Eigenschaft ist die Hyaluronsäurekapsel gleichzeitig in der Lage, an das humane CD44 Protein von Keratinozyten zu binden. Diese sind der Hauptzelltyp des humanen Rachenepithels und der Haut (Schrager *et al.* 1998).

2.1.3.2 Weitere Virulenzfaktoren

Einer der am besten charakterisiertesten Virulenzfaktoren ist das M Protein, welches auch für die Differenzierung von *S. pyogenes* in verschiedene Serotypen benutzt wird (Lancefield 1928). Gegenwärtig sind mehr als 80 Serotypen bekannt (Cunningham 2000). Das kovalent an der Zellwand verankerte M Protein hat einen hoch variablen N-Terminus, gegen den bei einer Infektion Antikörper gebildet werden, was in einem Schutz vor einer erneuten Infektion mit dem gleichen Serotyp resultiert. Auf Grundlage dieser Tatsache wird versucht, auf Basis des M Proteins einen Impfstoff zu entwickeln (siehe Kapitel 2.1.4). Als Virulenzfaktor erfüllen die M Proteine verschiedene Funktionen: neben der Beteiligung an Adhäsion und Invasion besitzen sie auch eine antiphagozytische Funktion (Horstmann *et al.* 1988) und sind in der Lage, Gewebestrukturen aufzubrechen (Berge & Sjobring 1993). Cho (Cho & Caparon 2005) und Caparon (Caparon *et al.* 1991) haben gezeigt, dass das M Protein, zusammen mit der Hyaluronsäurekapsel, auch an der Biofilmbildung von bestimmten *S. pyogenes*-Stämmen beteiligt ist.

Die bereits erwähnte Hyaluronsäurekapsel, ein Polysaccharid bestehend aus D-Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin, bietet den Streptokokken ebenfalls Schutz

vor der Phagozytose durch Makrophagen. Ein Verlust der Kapsel durch Mutationen führt zu erhöhter Sensibilität gegen Phagozytose (Dale *et al.* 1996; Medina *et al.* 2003; Ashbaugh *et al.* 1998).

Die Spaltung des chemotaktischen Komplementfaktors C5a durch die C5a-Protease (ScpA) befähigt *S. pyogenes* dazu, die Interaktion zwischen C5a und polymorphkernigen Leukozyten (PMN) zu inhibieren und somit die Rekrutierung dieser phagozytischen Zellen zum Infektionsherd zu reduzieren (Cunningham 2000; Shet *et al.* 2003).

Des Weiteren produziert *S. pyogenes* mehrere pyrogene Exotoxine, Spe genannt, deren Expression sowohl mit der Entstehung von Scharlach als auch mit dem STSS in Zusammenhang steht (Musser *et al.* 1991; Cone *et al.* 1987). Die Gene für die Exotoxine SpeA und SpeC sind dabei auf einem Bakteriophagen lokalisiert; während *speB* chromosomal ist (Cunningham 2000). Die Exotoxine Streptolysin O (SLO) und Streptolysin S (SLS) besitzen hämolytische Aktivität. Beide sind in fast allen *S. pyogenes*-Stämmen präsent. Während SLS für die bereits beschriebene β -Hämolyse verantwortlich ist (Sierig *et al.* 2003), spielt SLO bei der Ausbreitung der Streptokokken im Gewebe eine große Rolle. Durch seine Affinität zu Cholesterin zerstört es die eukaryotische Zellmembran, was in der Lyse der Zelle resultiert (Alouf 1980).

2.1.4 Behandlungsansätze für Streptokokkeninfektionen

Im Allgemeinen wird eine Streptokokken-Infektion mit Penicillin behandelt. Trotz des jahrzehntelangen Einsatzes dieses Antibiotikums sind bis jetzt noch keine resistenten Stämme bekannt (Brown & Rybak 2004; Horn *et al.* 1998). Trotzdem wird in einem Viertel der mit Penicillin therapierten Pharyngitiserkrankungen der Erreger nur unvollständig beseitigt (Kaplan & Johnson 1988; Pichichero 1991). Mögliche Erklärungsansätze sind sowohl das intrazelluläre Überleben der Streptokokken in der Wirtszelle (Marouni *et al.* 2004; LaPenta *et al.* 1994) als auch β -Lactamase produzierende Kommensale, die ebenfalls den Wirt besiedeln und in der Lage sind, das Penicillin zu degradieren (Sela & Barzilai 1999). (Kaplan *et al.* 2006) konnten zeigen, dass intrazelluläre Streptokokken, die trotz Penicillin-Exposition überlebten, erfolgreich

mit anderen, membrangängigen Antibiotika wie Azithromycin, Cephalothin und Clindamycin, abgetötet werden können.

Parallel zur Suche nach wirkungsvollen Therapeutika zur Beseitigung der Streptokokken in einer schon bestehenden Infektion gibt es verschiedene Forschungsansätze zur Impfstoffentwicklung (Cunningham 2000); WHO Pressemitteilung (2005)). Ein viel versprechender Impfstoffkandidat ist das auf dem M Protein basierende StreptAvax™, welches sich bereits in der klinischen Phase II befindet. Es besteht aus einer Mischung kurzer Peptide aus der N-terminalen Region des M Proteins von 26 verschiedenen GAS-Serotypen. Vorteil des StreptAvax™ ist die Verwendung eines hoch immunogenen Epitopes des M Proteins. Als Nachteil ist anzuführen, dass ein Impfschutz gegen nur 26 der zahlreichen M Protein-Typen nicht ausreicht, besonders da bekannt ist, dass die N-terminale Region des M Proteins sehr variabel ist und ständiger Rekombination unterliegt (Fischetti *et al.* 1985; Jones *et al.* 1988). Neben weiteren M Protein-basierten Vakzinen werden auch die Möglichkeiten einer Impfstoffentwicklung auf Grundlage der C5 α -Peptidase, der Cystein-Protease sowie des SfbI-Proteins untersucht. Intranasale Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem SfbI-Protein bzw. lediglich mit seinen Fibronektin-bindenden Repeats reduzierte die Mortalitätsrate nach einer Infektion mit *S. pyogenes* um bis zu 90 % (Schulze *et al.* 2006; Schulze *et al.* 2001; Guzman *et al.* 1999). Da schätzungsweise 73 % der bekannten klinischen *S. pyogenes*-Isolate das SfbI-Protein exprimieren (Schulze *et al.* 2006) und im Gegensatz zum M-Protein keine Kreuzreaktionen mit dem menschlichen Gewebe bekannt sind (Valentin-Weigand *et al.* 1994), wäre ein auf dem SfbI-Protein basierendes Vakzin sehr viel versprechend.

2.2 Chemische Grundlagen

2.2.1 Peptidsynthese

Proteine sind die häufigsten Makromoleküle in lebenden Zellen. Sie erfüllen dort vielfältige Aufgaben, von der Katalyse biochemischer Reaktionen über den Transport von Molekülen bis hin zur Abwehr. Trotz ihrer funktionellen und strukturellen Vielfalt bestehen alle Proteine aus den gleichen Bausteinen, den Aminosäuren.

Derzeit sind 20 proteinogene Aminosäuren bekannt (Stryer 1999). Sie lassen sich durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften (basisch, sauer, hydrophob, hydrophil, (un)polar, (un)geladen sowie aromatisch) unterscheiden. Neben den proteinogenen Aminosäuren, die aus L-Aminosäuren bestehen, kommen in der Natur gleichzeitig die so genannten D-Aminosäuren vor. Sie sind Enantiomere der L-Aminosäuren, wobei sich das chirale Zentrum am C α -Atom befindet (siehe Abbildung 3). D-Aminosäuren werden in der Natur zwar nicht bei der ribosomalen Proteinsynthese in die Proteine eingebaut, erfüllen aber trotzdem wichtige Aufgaben in biologischen Systemen. So kommt z. B. die D-Aminosäure Alanin (D-Alanin) in Bakterienwänden vor. Dort schützt sie das Bakterium vor Peptidasen, die von vielen Organismen zur Verdauung von bakteriellen Zellwänden produziert werden. Diese Enzyme können in der Regel nur L-Aminosäuren angreifen. Diese Stabilität gegenüber Enzymen bietet Vorteile bei der Synthese von potentiell medizinisch wirksamen Peptiden, da sie den am Wirkort vorhandenen Enzymen nicht zugänglich sind.

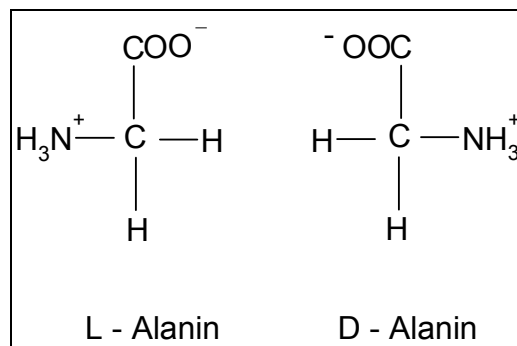


Abbildung 3: Darstellung der L- und D-Form der Aminosäure Alanin

2.2.2 Festphasen-Peptidsynthese

Bis zur Entwicklung der Festphasen-Peptidsynthese durch Bruce Merrifield im Jahr 1963 (Merrifield 1963) wurden chemische Synthesen von Peptiden in Lösung durchgeführt. Dies war eine langwierige Arbeit und die erreichte Ausbeute des Syntheseproduktes war häufig gering.

Die von Merrifield entwickelten Festphasen-Peptidsynthese, für die er 1984 mit dem Chemie-Nobelpreis geehrt wurde, vereinfachte und beschleunigte die Herstellung synthetischer Peptide deutlich.

Das Konzept der Festphasen-Peptidsynthese wird in Abbildung 4 näher erläutert: Die erste, N-terminal geschützte Aminosäure wird kovalent über einen selektiv spaltbaren Linker an einen unlöslichen Träger (Harz) gebunden. Nach Eliminierung der N-terminalen Schutzgruppe wird die nächste N-terminal geschützte Aminosäure aktiviert und C-terminal unter Ausbildung einer Peptidbindung an die erste Aminosäure gekoppelt. Durch die Bindung des wachsenden Peptids am immobilisierten Harz können überschüssige Reagenzien und unerwünschte Nebenprodukte durch zwischengeschaltete Waschschriffe entfernt werden. Dies geschieht durch eine einfache Filtration. Je nach gewünschter Peptidlänge wird der Prozess der N-terminalen Entschützung, der Aktivierung der zu koppelnden Aminosäure und die Kopplungsreaktion mehrfach wiederholt. Durch diese fortlaufende Wiederholung der eben genannten Prozesse eignet sich die Festphasen-Peptidsynthese hervorragend für die Automatisierung. Dies ermöglicht die parallele Synthese von mehreren unterschiedlichen Peptiden. Nach der Kopplung der letzten Aminosäure wird das Peptid entschützt und vom Linker abgespalten.

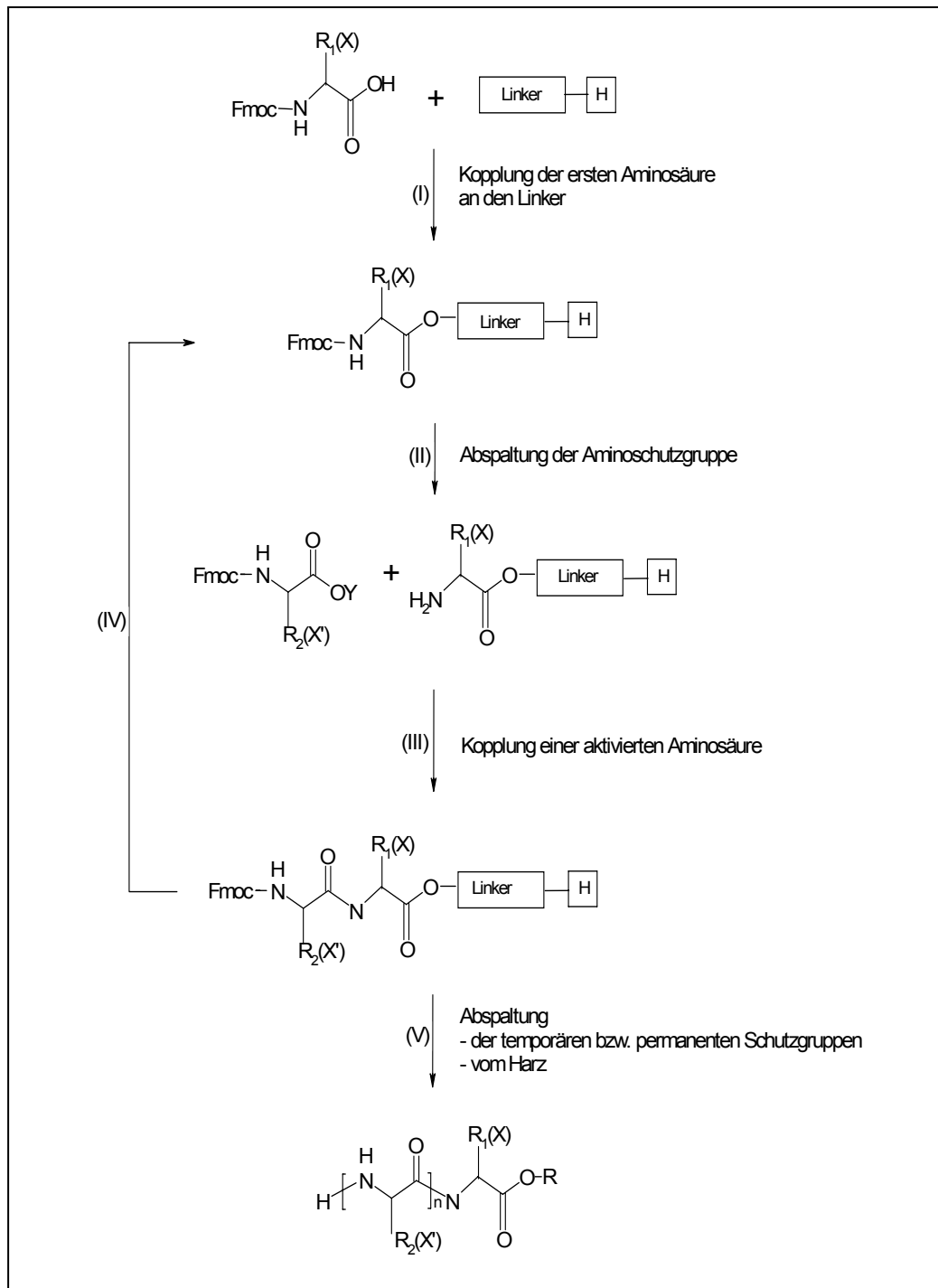


Abbildung 4: **Konzept der Festphasen-Peptidsynthese**

Die erste Aminosäure des Peptids wird kovalent an den Linker gebunden (I). Nach Entschützung des N-Terminus (II) bildet eine weitere, am C-terminus aktivierte Aminosäure, dort eine Peptidbindung aus (III). Die Prozesse des Entschützens, des Aktivierens und der Kopplungsreaktion werden bis zur Vervollständigung des Peptides wiederholt (IV). Anschließend wird das entschützte Peptid vom Harz abgespalten (V). H = Harz, R = Aminosäure-Seitenkette, X = permanente Schutzgruppe, Y = Aktivierungsgruppe.

Ein in vielen Untersuchungen bewährter Linker ist der „Lys-Pro-Linker“ (Bray *et al.* 1990). Dieser Linker besteht aus einem mit dem Harz veresterten Prolin, an das ein Lysin gekoppelt ist. Die α -Aminogruppe dieses Lysins ist Boc, die ϵ -Aminogruppe Fmoc-geschützt. Die Synthese des Peptides erfolgt nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe an der ϵ -Aminogruppe des Lysins. Bei der Abspaltung der permanenten Schutzgruppen durch eine TFA-Behandlung hydrolysiert ebenfalls die Boc-Gruppe an der α -Aminogruppe des Lysins. Bedingt durch das saure Milieu liegt die Aminogruppe zunächst protoniert vor und ist damit unreaktiv. Erst durch die Einstellung eines leicht basischen pH-Wertes wird die α -Aminogruppe reaktiv. Durch eine Deprotonierung wird sie zu einer nucleophilen Aminogruppe. Die Bindung zwischen Harz und Peptid wird durch den Angriff des Carbonyl-C-Atoms der Esterbindung abgespalten. Bei dieser Abspaltung bildet sich ein Diketopiperazin (DKP). Die so freigesetzten Peptide können direkt in biologischen Assays eingesetzt werden.

Die Verknüpfung zweier Aminosäuren in der Peptid-Synthese verläuft unter Ausbildung einer Amid-Bindung. Hierbei wird die Aminogruppe der ersten Aminosäure mit der Carboxygruppe der zweiten Aminosäure verknüpft. Um unerwünschte Nebenprodukte zu vermeiden, werden die reaktiven Amino- und Seitenketten der Aminosäuren, die nicht an der Ausbildung der Peptidbindung beteiligt sind, blockiert. Dies geschieht mit verschiedenen Schutzgruppen (Orain *et al.* 2002). Die gebräuchlichsten Strategien sind die Fmoc/*tert.*-Butyl-Strategie (Atherton & Sheppard 1989) sowie die von Merrifield benutzte Boc/Benzyl-Strategie. Dabei wird erstgenannte Strategie meistens vorgezogen, da sie eine einfachere Handhabung bietet. Die Fmoc/*tert.*-Butyl-Strategie beruht auf dem Konzept der Orthogonalität, d. h. auf der Basenlabilität der temporären Fmoc-Schutzgruppe sowie der Säurelabilität der permanenten *tert.*-Butyl-Schutzgruppe. Somit können die basenlabilen Fmoc-Gruppen mit 20%igem Piperidin abgespalten werden, ohne dass der Syntheseerfolg durch eine Abspaltung der permanenten Schutzgruppen oder des Linkers gefährdet wird. Die in dieser Arbeit hergestellten Peptide wurden nach dieser Strategie synthetisiert.

Peptide mit einer Länge von bis zu 30 Aminosäuren werden routinemäßig mittels der Festphasen-Synthese hergestellt. Längere Peptide neigen zur Aggregation am Harz, was zu einer geringeren Syntheseausbeute führt. Durch die Entwicklung der

Fragmentkondensation können aber heutzutage auch Peptide mit mehr als 100 Aminosäuren hergestellt werden (Dawson *et al.* 1994; Muir *et al.* 1997). Bei der Fragmentkondensation wird das Peptid in einzelnen, kurzen Fragmenten synthetisiert, die dann mittels chemischer Ligation verknüpft werden. Die Wahl der Schnittstelle innerhalb eines Peptides für die Fragmentkondensation ist dabei entscheidend, da bei der Aktivierung des Carboxyterminus eines Peptides die Epimerisierung der C-terminalen Aminosäure beobachtet wird. Bevorzugte Aminosäuren für die Einfügung der Schnittstelle sind deshalb Glycin und Prolin.

2.2.3 Peptidbibliotheken

Die Realisierung der parallelen Synthese von vielen unterschiedlichen Peptiden/Substanzen hat für die Forschung immer größere Bedeutung. Auf der Suche nach medizinisch wertvollen Verbindungen, wie z. B. Enzyminhibitoren, werden heutzutage große (Peptid-)Bibliotheken/Substanzsammlungen synthetisiert, die anschließend in Hoch-Durchsatz-Screenings auf potentielle Aktivitäten getestet werden. Die Herstellung dieser Sammlungen kann dabei sowohl auf biologischem Wege, über die Expression klonierter Bausteine, als auch auf synthetischem Wege, über die chemische Verknüpfung der verschiedenen Bausteine, geschehen (Rinnová & Lebl 1996). Der Einsatz von kombinatorischen Bibliotheken erhöht dabei statistisch die Chance, einen Wirkstoff zu finden.

Der Begriff der Kombinatorik ist aus der Mathematik entlehnt und ist definiert als die Lehre von der Anzahl der verschiedenen möglichen Anordnungen gegebener Elemente. Übertragen auf die Peptidchemie bedeutet es die möglichen Anordnungen einzelner Aminosäuren innerhalb eines Peptides. Eine kombinatorische Bibliothek aus Pentameren, für deren Synthese alle proteinogenen Aminosäuren eingesetzt wurden, besteht somit aus $20^5 = 3.200.000$ verschiedenen Peptiden.

Zwei der am häufigsten synthetisierten Bibliotheksformate sollen im Folgenden näher erläutert werden: Bei der *One-Bead-One-Peptide-* (Eine-Perle-Ein-Peptid) -Bibliothek wird an jeder Harzperle nur eine Peptidsequenz aufgebaut. Dies wird durch die so genannte *split-and-mix*-Synthese erreicht. Dabei wird das Trägerharz zunächst in so viele Portionen aufgeteilt, wie im nächsten Schritt Aminosäuren eingebaut werden:

sollen drei verschiedene Aminosäuren eingebaut werden, wird das Harz in drei Portionen geteilt. Nach der Kopplung der Aminosäuren werden die Harzportionen wieder vereinigt, durchmischt und für den nächsten Syntheseschritt vorbereitet. Durch diese Synthesemethode wird an jeder Harzperle nur eine Peptidsequenz synthetisiert, deren genaue Zusammensetzung aber unbekannt ist. Biologische Tests können dann Aufschluss darüber geben, welche Sequenzen die gesuchte Aktivität zeigen. Diese Sequenzen können über eine Sequenzierung identifiziert und in größerem Maßstab synthetisiert werden.

Neben vollständig randomisierten Gemischen wie in der Eine-Perle-Ein-Peptid-Bibliothek werden auch Bibliotheken aus definierten Gemischen zur Wirkstofffindung eingesetzt. Definierte Gemische enthalten dabei sowohl definierte Positionen (O), an denen eine bestimmte Aminosäure eingesetzt wird, als auch Gemischpositionen (X), an denen ein Gemisch aller proteinogenen Aminosäuren eingesetzt wird (Eichler 2003). Bei der Länge der Peptide innerhalb einer Bibliothek muss beachtet werden, dass erstens mit zunehmender Peptidlänge auch die Komplexität der Synthese zunimmt, und zweitens die biologische Aktivität oftmals nur durch zwei bis vier „kritische“ Aminosäuren festgelegt wird. Somit ist es sinnvoll, mit der Bibliothek nur ein kurzes Peptidmotiv abzudecken. Da in einem definierten Gemisch jedes Harzkügelchen viele verschiedene Sequenzen trägt, muss die endgültige Sequenz des aktiven Peptids in mehreren Schritten aufgelöst werden. Dazu werden iterative Verfahren wie die so genannte iterative Dekonvolution angewendet. Bei einer Bibliothek mit dem Aufbau OXXX beispielsweise werden an der definierten Position (O) alle verwendeten Aminosäuren variiert, während der Rest der Sequenz unbestimmt ist (X). Durch einen entsprechenden Aktivitätstest können die wirksamsten Unterbibliotheken identifiziert werden. Darauf aufbauend werden neue Unterbibliotheken zweiter Generation synthetisiert, die im biologischen Test Aufschluss über die zweite Position in der Sequenz geben. Durch eine wiederholte Abfolge von Synthesen und Tests kann so die wirksamste Sequenz ermittelt werden.

Als Beispiele für erfolgreiche Anwendung von Peptidbibliotheken sind z. B. die Identifizierung der Sequenz des Antigens zum monoklonalen Antikörper anti- β -Endorphin (Pinilla *et al.* 1993) und die Identifikation eines Inhibitors des zytolytischen Peptides Mellitin (Blondelle *et al.* 1996) zu nennen. (Zang *et al.* 1998) entdeckten beim Screening einer zyklischen Peptidbibliothek einen neuen Streptavidin-Liganden, dessen

Bindungsaktivität bereits im nanomolaren Bereich liegt. Auch bei der Suche nach antimikrobiellen Peptiden sind Peptidbibliotheken erfolgreich eingesetzt worden. So identifizierten (Houghten *et al.* 1991) mehrere Peptidsequenzen, die auf die Bakterienspezies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* eine antimikrobielle Wirkung haben.

2.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen mittels eines Hochdurchsatz-Screenings potentielle Inhibitoren der zellulären Invasion von *S. pyogenes* identifiziert werden.

Als potentielle Inhibitoren sollten Peptidgemische einer im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Peptidbibliothek aus D-Aminosäuren im xxx-o₁o₂-xxx-DKP-Format sowie zyklische Peptide der Struktur [aa-o₁o₂-aac]zyklo und einige lineare Peptide definierter Sequenz auf ihre inhibitorische Aktivität getestet werden. Dazu sollte ein Hochdurchsatz-Screening im 96-well-Format etabliert werden, bei dem sowohl die Zahl der adhärennten als auch die Zahl der internalisierten Streptokokken direkt ermittelt werden kann. Als Referenz für die Inhibition der Internalisierung diene das im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls synthetisierte 49mer, ein Teil des SfbI-Proteins, dessen inhibitorische Aktivität bereits nachgewiesen wurde.

Neben den inhibitorischen Qualitäten der Peptide wurden ebenfalls ihre potentiell zytotoxische und bakteriostatische Wirkung untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte

Geräte-Bezeichnung	Hersteller
analytische HPLC: Pump L-7100 Autosampler L-7200 UV-Detector L-7400 Interface L-7000 KNAUER Degasser Fraction Collector L-5800 Säule Jupiter 4 μ Proteo	MERCK Hitachi MERCK Hitachi MERCK Hitachi MERCK Hitachi KNAUER MERCK Hitachi Phenomenex Inc.
Binokular ID02	Carl Zeiss AG
CO2 Water Jacketed Incubator	Forma Scientific Inc.
Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 100 Kamera Axioacam HRc	Carl Zeiss AG Carl Zeiss AG
Eppendorf® Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44 Eppendorf® Centrifuge 5417R	Eppendorf®
ESI-LC-MS: HPLC/UV-Detektion HP1800 Autosampler PE 200 Massenspektrometer Api 100 Säule: PLRP-S 100 \odot , 3 μ m, 50 x 2.1 mm	Applied Biosystems Applied Biosystems Applied Biosystems Phenomenex Inc.
Feinwaage Sartorius research	Sartorius
Inkubator Heraeus B6030	Heraeus Instruments GmbH
Kühl-/Gefrierschrank (+ 4 °C/- 20 °C)	Liebherr Hausgeräte GmbH
Lyophilisationsanlage Alpha 1-4	Christ
Maldi-Kompakt III Kratos Analytical	Shimadzu
PerkinElmer® Fusion Universal Microplate Analyser	PerkinElmer®
Photometer Novaspec II	Pharmacia
präparative HPLC: WellChrom, Preparative Pump K-1800 L-4000 UV-Detector	KNAUER MERCK Hitachi
Rotationsverdampfer Rotavapor R200 plus Heating Bath 3490	Büchi Labortechnik AG
SpeedVac	Savant Instruments
Spektralphotometer TECAN Sunrise™	Tecan Deutschland GmbH
Syro	MultiSynTech GmbH
Titertek Multiskan® MCC/340	Titertek

Geräte-Bezeichnung	Hersteller
Ultraschallbad SONOREX Super AK510H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Vortexer VF2 Janke & Kunkel	IKA-Labortechnik
Waage Sartorius laboratory L420S	Sartorius AG
Wallac™ 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer Wallac GmbH
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. KG
Zentrifuge Sigma® 4K, Rotor F 45-30-11	Sigma® Laborzentrifugen GmbH

Plastikeinwegmaterialien wurden von den Firmen Nunc GmbH & Co. KG und Greiner Bio-One GmbH, Zellkulturmedien und –zusätze von den Firmen Gibco Life Technologies GmbH und PAA Laboratories GmbH bezogen.

3.2 Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien / Lösungsmittel	Hersteller / Lieferant
1-Hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAT)	PerSeptive Biosystems
Fmoc-L-Ala-OH	MultiSynTech GmbH / NovaBiochem / Bachem Biochemicals
Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	
Fmoc-L-Phe-OH	
Fmoc-Gly-OH	
Fmoc-L-His(Trt)-OH	
Fmoc-L-Ile-OH	
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	
Fmoc-L-Leu-OH	
Fmoc-L-Met-OH	
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	
Fmoc-L-Pro-OH	
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	
Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	
Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	
Fmoc-L-Val-OH	
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	
Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	
Fmoc-D-Ala-OH	
Fmoc-D-Asp(tBu)-OH	

Chemikalien / Lösungsmittel	Hersteller / Lieferant
Fmoc-D-Glu(tBu)-OH Fmoc-D-Phe-OH Fmoc-D-His(Trt)-OH Fmoc-D-Ile-OH Fmoc-D-Lys(Boc)-OH Fmoc-D-Leu-OH Fmoc-D-Met-OH Fmoc-D-Asn(Trt)-OH Fmoc-D-Pro-OH Fmoc-D-Gln(Trt)-OH Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH Fmoc-D-Ser(tBu)-OH Fmoc-D-Thr(tBu)-OH Fmoc-D-Val-OH Fmoc-D-Trp(Boc)-OH Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH Boc-L-Lys(Fmoc)	
Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka Chemie AG
Dithiothreitol (DTT)	Biomol GmbH
Harze für die Peptidsynthese	RAPP Polymere
N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)	Biosolve LTD
O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphate (HATU)	PerSeptive Biosystems
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU)	MultiSynTech
Piperidin	Fluka
Thioanisol	Fluka

Alle nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA, C. Roth GmbH & Co, J.T. Baker und Sigma-Aldrich bezogen. Soweit nicht anders vermerkt, entsprachen die Chemikalien dem Qualitätsgrad *pro analysis* (p. a.).

Tabelle 3: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller
Kaninchen Anti- <i>S. pyogenes</i>	bereitgestellt durch MPAT (HZI)
Ziege Anti-Kaninchen IgG, markiert mit Alexa Fluor® 488	Molecular Probes
Ziege Anti-Kaninchen IgG, markiert mit Alexa Fluor® 568	Molecular Probes

3.3 Software

Tabelle 4: Liste der benutzten Software

Programm	Version	Hersteller
Analyst Software	Version 1.4	Applied Biosystems/MDS SCIEX Instruments
Axio Vision Scan	--	Carl Zeiss AG
CorelDraw	Version 5	Corel Corporation
EIA Datenaufnahme und -auswertung	Version 1.08	Titertek
Fusion InstrumentControl	Application Version 4.00	PerkinElmer®
Magellan™3	Version 3.11	Tecan Deutschland GmbH
MALDI-Software	Version 5.2.0	Kratos Kompact MALDI Software
MS Office	Version XP	Microsoft
Peptide Companion	Version 1.25	CoshiSoft/PeptiSearch
PhotoFiltre	Version 6.2.6	Antonio Da Cruz
Sigma-Plot	Version 8.0	SPSS Inc.
Syro-Software	Version 0.99.1049	MultiSynTech Syro
Wallac™ 1420 Manager	--	PerkinElmer Wallac GmbH

3.4 Methoden

3.4.1 Peptidsynthese

Alle in dieser Arbeit synthetisierten Peptide wurden mit Hilfe der Festphasensynthese hergestellt. Soweit nicht anders erwähnt, wurde die Synthese mit dem Syntheseautomaten Syro der Firma MultiSynTech durchgeführt.

3.4.1.1 Synthese der linearen Kontrollpeptide

3.4.1.1.1 Synthese des 49mers

Die Synthese des „49mer“, Teil des von *S. pyogenes* exprimierten SfbI-Proteins, wurde am Syntheseautomaten Syro durchgeführt. Die Sequenz des 49 Aminosäuren langen Peptides ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Sequenz des 49mers (Ozeri *et al.* 1996; Tomasini-Johansson *et al.* 2001)

Sequenz				
1	11	21	31	41
KDQSPLAGES	GETEYITEVY	GNQQNPVDID	KKLPNETGFS	GNMVETEDT

Die Synthese wurde mit einem Ansatz von 27 μmol pro Reaktor gestartet. Um die Gesamtausbeute zu erhöhen wurde die Synthese parallel in drei Reaktoren durchgeführt. Die für die Synthese benötigten Aminosäuren wurden in 0,5 M HOBt/DMF-Lösung vollständig in Lösung gebracht, was zu einer Endkonzentration von 0,39 M führte. Die Aktivierung der Aminosäuren erfolgte über eine 20%ige Lösung von DIC in DMF; die Fmoc-Abspaltung wurde mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF durchgeführt. Tabelle 6 stellt den Synthesesyklus bei der Synthese des 49mers dar.

Der ersten Aminosäurekopplung war eine 20minütige Quellung des Harzes mit DMF und eine Fmoc-Abspaltung vorangegangen. Nach jeder Aminosäurekopplung wurde eine Acetylierung von eventuell noch freiliegenden Aminogruppen durchgeführt.

Tabelle 6: Synthesesyklus bei der Synthese des 49mers

	Bedingung
Aminosäure-Kopplung	350 μl 0,39 M Aminosäurelösung 150 μl 20 % DIC/DMF Dauer: 1 h 30 sek Absaugen 3 x Waschen 2 Zyklen
Acetylierung von freiliegenden Aminogruppen	500 μl Acetylierungsreagenz, bestehend aus 1 Volumenanteil Acetanhydrid 2 Volumenanteilen Pyridin 3 Volumenanteilen DMF
Fmoc-Abspaltung	500 μl 20% Piperidin/DMF Dauer: 20 min 30 sek Absaugen
Waschen	800 μl DMF Dauer: 1 min 30 sek Absaugen 5 Zyklen

Nach der Kopplung der 15. bzw. 30. Aminosäure wurde die Synthese unterbrochen und eine Probeabsplaltung durchgeführt. Dazu wurden ca. 2 mg Harz aus dem Reaktor genommen und in einem Eppendorf-Gefäß mit Abspaltlösung (90 % TFA, 5 % H₂O, 5 % Triisopropylsilan) für 2 Stunden inkubiert. Danach wurde die Abspaltlösung mittels Stickstoffbegasung abgedampft. Das verbleibende Pellet wurde in 60 µl eines Acetontril-Wasser-Gemisches (1:1, inkl. 0,1 % TFA) resuspendiert. Nach dem Abzentrifugieren des Harzes wurden 10 µl des Überstandes abgenommen und mittels eines HPLC-Laufes (siehe 3.4.1.5.1) bzw. einer MALDI-Messung (siehe 3.4.1.5.3) analysiert.

Nach Beendigung der Synthese wurde das Peptid mittels des Reagenz K vom Harz abgespalten. Reagenz K besitzt den Vorteil, dass es die Bildung von Methioninsulfoxid unterdrückt. Bei dieser Abspaltungsreaktion werden gleichzeitig auch die Seitenketten der Aminosäuren entschützt.

<u>Reagenz K:</u>	82,5 % TFA
	5,0 % Phenol
	5,0 % Thioanisol
	5,0 % Wasser
	2,5 % Ethandithiol

Zur Abspaltung des Peptides vom Harz wurde dieses mit 1 ml Reagenz K zuerst für 3 Stunden, dann über Nacht, inkubiert. Danach wurde die Abspaltlösung zum Ausfällen in ein mit 10 ml kaltem Cyclohexan/Dimethylether (1:1) gefülltes Gläschen abgedrückt. Die darauf folgende Zugabe von 10 ml Wasser bewirkte eine Extraktion des Peptides, welches sich, im Gegensatz zu den Schutzgruppen, in der wässrigen Phase löst. Nach der Phasentrennung wurde die Lösung bei -70 °C gefroren. Die nicht gefrorene Etherphase wurde anschließend verworfen und die gefrorene Wasserphase lyophilisiert. Das so erhaltene Produkt wurde anschließend mittels einer LC-MS-Messung (siehe Kapitel 3.4.1.5.2) sowie einer MALDI-Messung charakterisiert und über eine präparative HPLC aufgereinigt (siehe Kapitel 3.4.1.4).

3.4.1.1.2 Synthese von PyOT5 und DMBT1pbs1

Die Synthese der beiden Peptide wurde am Syro durchgeführt, mit je zwei 25 µmol-Ansätzen. Die Sequenzen der Peptide sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Sequenzen der Peptide PyOT5 und DMBT1pbs1

Peptid	Sequenz	Referenz
PyOT5	$\frac{1}{\text{ETVTIVEDTR}} \quad \frac{11}{\text{KPLVFHFDNN}} \quad \frac{21}{\text{EPKVE}}$	(Schwarz-Linek <i>et al.</i> 2004)
DMBT1pbs1	$\frac{1}{\text{GRVEVLYRGS}} \quad \frac{11}{\text{W}}$	(Bikker <i>et al.</i> 2004)

Für die Synthese wurde ein TentaGel PHB-Harz eingesetzt, an das die C-terminale Aminosäure der entsprechenden Sequenz (TentaGel S PHB Glu (tBu)Fmoc bzw. TentaGel S PHB Trp (tBu)Fmoc) bereits gebunden war. Der Ablauf eines Synthesesyklus ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Standard-Synthesesyklus bei der Synthese von PyOT5 bzw. DMBT1pbs1

	Bedingung
Aminosäurekopplung	250 µl Aminosäurelösung 250 µl 0,5 M TBTU/DMF 100 µl 2,5 M Hünig-Base/NMP Dauer: 60 min 30 sek Absaugen 700 µl DMF Dauer: 1 min 30 sek Absaugen
Fmoc-Abspaltung	600 µl 40 % Piperidin/DMF Dauer: 2 min 30 sek Absaugen 300 µl 40 % Piperidin/DMF 300 µl DMF Dauer: 8 min 30 sek Absaugen
Waschen	500 µl DMF Dauer: 1 min 30 sek Absaugen 5 Zyklen

Der ersten Aminosäurekopplung wurde ein fünfminütiges Vorquellen des Harzes mit DMF sowie eine Fmoc-Abspaltung mit anschließendem Waschschrift vorgeschaltet. Die Abspaltung der Peptide vom Trägerharz erfolgte über eine zweimalige Inkubation mit 2 ml Silan für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Zur Fällung der Peptide wurde anschließend die Abspalllösung in *tert.*-Butyl-Methylether gedrückt und bei 5 °C für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in *tert.*-Butyl-Methylether resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Das ausgefällte Peptid wurde anschließend in 3 ml einer H₂O-Acetonitril-Lösung gelöst und eine analytische HPLC durchgeführt (siehe 3.4.1.5.1). Nach Zugabe von 30 ml dH₂O wurde das Gemisch bei -70 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert.

3.4.1.2 Synthese der Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren mit der Struktur xxx-0₁0₂-xxx-DKP

Die Synthese der Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren wurde mit dem Syntheseautomaten Syro durchgeführt, der die Möglichkeit bietet, bis zu 96 unterschiedliche Peptide gleichzeitig herzustellen (siehe Abbildung 5).

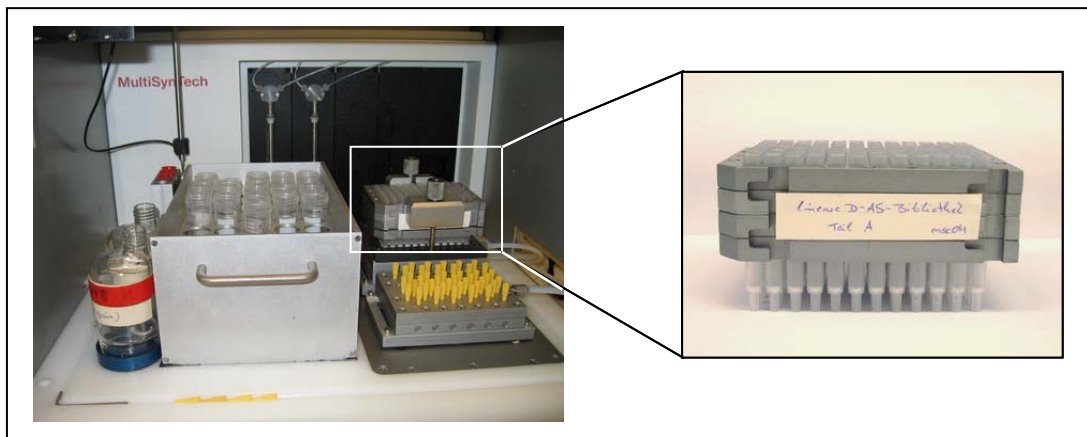


Abbildung 5: Syntheseautomat Syro der Firma MultiSynTech, mit dem für die Synthese der Bibliothek benutzten Syntheseblock aus Metallplatten

Die zu synthetisierende Bibliothek hatte das Format xxx-0₁0₂-xxx-DKP. Dabei steht das x für eine undefinierte Position, d. h. einem Aminosäuregemisch aus 19 proteinogenen

Aminosäuren. Die Aminosäure Cystein wurde bei der Synthese nicht eingesetzt, da bekannt ist, dass es durch Disulfidbildung und Oxidationsanfälligkeit Probleme bei der Synthese bereitet. Die Position **o** steht für eine zuvor definierte Aminosäure. Das oben genannte Bibliotheksformat führt zu einer Bibliothek mit 361 verschiedenen Peptidgemischen, so genannten Unterbibliotheken. Da im Syro nur maximal 96 Peptide gleichzeitig synthetisiert werden können, wurde die Bibliothek in vier aufeinander folgenden Synthesen hergestellt.

Das für die Synthese benötigte Harz, Rapp S OH mit Boc-Lys(Fmoc)-Pro, wurde von Dr. Werner Tegge (Abteilung Chemische Biologie, HZI) vorbereitet. Die Beladung betrug 190 $\mu\text{mol/g}$.

Vor Beginn der Synthese wurden 1,4 ml Plastikreaktoren der Firma MultiSynTech in dafür konzipierte Metallplatten gesteckt, die die Reaktoren während der Synthese stabilisieren sollten (siehe Abbildung 5). Jede dieser Reaktionssäulen enthält am Boden eine Filtrationsplatte, eine so genannte Fritte, durch die die Lösungsmittel während der Synthese abgesaugt werden können. Um eine gleichmäßige Verteilung des Harzes in den Reaktoren und somit später eine möglichst gleiche Menge an Produktbildung zu gewährleisten, wurde eine so genannte *Balanced-Density*-Bestimmung durchgeführt. Dazu wurde etwas Harz in eine mit 500 μl DMF gefüllte Quarzküvette gegeben. Anschließend wurde in Portionen von 50 μl Tetrachlorethylen zugegeben, bis das Harz in der Lösung schwebte. Das Mischungsverhältnis DMF-Tetrachlorethylen wurde notiert.

Pro Reaktor wurde ein 5 μmol -Ansatz gestartet; das bei 96 parallel durchgeführten Synthesen insgesamt dafür benötigte Harz wurde in einer Glasflasche abgewogen und 200 ml eines DMF-Tetrachlorethylen-Gemisches mit dem zuvor ermittelten Mischungsverhältnis wurden zugegeben. Anschließend wurde diese Suspension mit einer Stepper-Pipette gleichmäßig auf die 96 Reaktoren verteilt.

Die für die Synthese benötigten N-terminal Fmoc-geschützten D-Aminosäuren wurden in NMP zu 0,5 M Stammlösungen gelöst. Vollständige Lösung wurde durch den Einsatz des Ultraschallbades gewährleistet. Der Aminosäure-Mix wurde durch Mischung gleicher Volumina aller 19 verwendeten 0,5 M Stammlösungen erstellt. Für die Aktivierung der Aminosäuren wurden eine 1 M Hünig-Base-Stammlösung in NMP und eine 0,5 M TBTU-Stammlösung in DMF hergestellt.

Syntheseablauf

Die Aminosäuren in den undefinierten Positionen wurden jeweils dreimal 30 min gekoppelt. Dabei wurden die beiden ersten Kopplungen mit einem Unterschuss in Bezug auf die vorliegenden Aminogruppen auf dem Harz, die dritte Kopplung mit einem Überschuss durchgeführt. Mit dieser Strategie sollte eine gleichmäßige Verteilung der gekoppelten Aminosäuren, deren Kopplungsgeschwindigkeit unterschiedlich schnell ist, erreicht werden. Die Aminosäuren in den definierten Positionen wurden einmal 1 h gekoppelt. Die genauen Kopplungsabläufe sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Ablauf eines Synthesezyklus

	undefinierte Position (x)	definierte Position (o)
Aminosäure-Kopplung	25 µl 0,2M Aminosäure-Mix 25 µl 0,2 M TBTU 25 µl 0,4 M Hünig-Base Dauer: 30 min 30 sek Absaugen 200 µl DMF Dauer: 1 min 30 sek Absaugen 2 Zyklen 50 µl 0,5M Aminosäure-Mix 50 µl 0,5 M TBTU 50 µl 1 M Hünig-Base Dauer: 30 min 30 sek Absaugen 200 µl DMF Dauer: 1 min 30 sek Absaugen	50 µl 0,5M Aminosäure-Mix 50 µl 0,5 M TBTU 50 µl 1 M Hünig-Base Dauer: 1 h 30 sek Absaugen 200 µl DMF Dauer: 1 min 30 sek Absaugen
Fmoc-Abspaltung	150 µl 40 % Piperidin/DMF Dauer: 2 min 30 sek Absaugen 75 µl 40 % Piperidin/DMF 75 µl DMF Dauer: 8 min 30 sek Absaugen	150 µl 40 % Piperidin/DMF Dauer: 2 min 30 sek Absaugen 75 µl 40 % Piperidin/DMF 75 µl DMF Dauer: 8 min 30 sek Absaugen
Waschen	200 µl DMF Dauer: 1 min 30 sek Absaugen 5 Zyklen	200 µl DMF Dauer: 1 min 30 sek Absaugen 5 Zyklen

Der Kopplung der ersten Aminosäure an das Harz waren zwei weitere Schritte vorgeschaltet: Das Quellen des Harzes mit 800 µl DMF für 5 Minuten, gefolgt von einer Fmoc-Abspaltung wie in Tabelle 9 aufgeführt.

Abspaltung der Schutzgruppen

Aufgrund einer deutlichen Arbeitserleichterung wurden die Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren im Syntheseautomaten abgespalten. Durch die Aufrechterhaltung des sauren Milieus und die Protonierung der α -Aminogruppe des Lysins wird dabei der Diketopiperazin-Bildung vorgebeugt, d.h. das Peptid wird nicht vom Harz abgespalten. Der Ablauf der Abspaltung ist in Tabelle 10 dargestellt.

<u>Abspaltmix KW:</u>	4 g Phenol
	2 g DTT
	4 ml H ₂ O
	4 ml Thioanisol
	TFA ad 80 ml

Tabelle 10: Abspaltung der permanenten Schutzgruppen

	Bedingung
Waschen	250 µl DCM Dauer: 1 min 30 sek Absaugen 2 Zyklen
Abspaltung	250 µl Abspaltmix KW Dauer: 5 min 30 sek Absaugen 250 µl Abspaltmix KW Dauer: 55 min 30 sek Absaugen 250 µl Abspaltmix KW Dauer: 5 h 30 sek Absaugen
Waschen	250 µl Essigsäure Dauer: 5 min 30 sek Absaugen 3 Zyklen

Fortsetzung Tabelle 10:

	Bedingung
Waschen	300 µl Isopropanol Dauer: 5 min 30 sek Absaugen 2 Zyklen

Abspaltung der Peptide vom Harz

Zum Abspalten der Peptide vom Harz wurden pro Reaktor 800 µl Abspalllösung (Isopropanol/H₂O (1:1) inkl. 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat) zugegeben und über Nacht auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Diese 24stündige Inkubation wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die Filtrate wurden in Deep-Well Mikrotiterplatten aufgefangen und die Lösungsmittel in einer SpeedVac abgedampft. Um eventuelle Rückstände des Ammoniumhydrogencarbonats zu entfernen, wurden die Peptide in 800 µl Isopropanol/H₂O (1:1) aufgenommen und erneut in der SpeedVac eingeengt.

Zur Erstellung einer Stammlösung wurden die Peptide in 1 ml Isopropanol/H₂O (1:1) gelöst und bei -70 °C gelagert. Die Konzentration der Stammlösung wurde stichprobenartig durch Aminosäurequantifizierung bestimmt (siehe Kapitel 3.4.1.5.4).

3.4.1.2.1 Nachsynthese einzelner Subbibliotheken

Da einige Positionen der Bibliothek linearer Peptide in den Infektionsversuchen auffällig waren, wurden sie nochmals synthetisiert. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass auftretende Effekte durch Syntheseartefakte hervorgerufen wurden. Die Synthese erfolgte nach den in Kapitel 3.4.1.2 beschriebenen Vorschriften.

3.4.1.3 Nachsynthese zyklischer Peptide des Formats [aa-o₁o₂-aac]zyklo

Drei Positionen aus einer von Dr. Werner Tegge (Abteilung Chemische Biologie, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung) synthetisierten Sammlung zyklischer Peptide der Struktur [aa-o₁o₂-aac]zyklo aus D-Aminosäuren wurden im Rahmen dieser Arbeit nachsynthetisiert. Ausschlaggebend für die Auswahl der Positionen waren ihre Aktivitäten in den durchgeführten Invasionsversuchen. Bei diesem Bibliotheksformat gab es zwei variable Positionen (o₁ und o₂). An beiden Positionen wurde eine zuvor definierte Aminosäure gekoppelt, wobei außer Cystein alle proteinogenen Aminosäuren eingesetzt wurden. Die Synthese dieser Peptide wurde nicht mit einem Syntheseautomaten, sondern manuell durchgeführt.

Syntheseablauf

Das bereits mit den Aminosäuren a-a-c beladene Harz wurde von Dr. Werner Tegge (Abteilung Chemische Biologie, HZI) zur Verfügung gestellt. Die Synthese wurde mit 20 µmol/Ansatz in Plastikreaktoren gestartet.

Nach dem Vorquellen des Harzes mit DMF wurde eine 10minütige Fmoc-Abspaltung mit 20 % Piperidin/DMF durchgeführt. Nach sechsmaligem Waschen mit DMF wurde die erste Aminosäure in 5fachem Überschuss für eine Stunde gekoppelt. Zur Aktivierung der Aminosäuren wurden 1 eq. TBTU und 2 eq. Hünig-Base eingesetzt. Die Kopplung wurde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit DMF wurde wie oben beschrieben die Fmoc-Gruppe abgespalten und die nächste Aminosäure gekoppelt.

Abspaltung der Pp-Schutzgruppe

Die Pp-Schutzgruppe am Carboxylende des Cysteins wurde durch drei aufeinander folgende Inkubationen für 5 min, 2 h und 3 h mit 1 ml 2 % TFA in DCM abgespalten. Nach jeder Inkubation erfolgten folgende Waschschrte: dreimal mit DCM, zweimal mit 5 % Diisopropylethylamin in DMF und fünfmal mit DMF.

Zyklisierung des Peptides am Harz

Die Zyklisierung erfolgte durch zwei aufeinander folgende 24stündige Inkubationen mit 1 ml DMF inkl. 5 eq. PyBOP, 5 eq. HOAt und 10 eq. Diisopropylethylamin. Nach der ersten Inkubation wurde das Harz zweimal mit DMF gewaschen, nach der zweiten

Inkubation jeweils dreimal mit DMF und DCM. Einem Trocknungsschritt über Nacht bei Raumtemperatur folgte die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen am immobilisierten Peptid.

Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen

Die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte über eine dreimalige Inkubation, 5 min, 55 min und 5 h, mit 1 ml TFA inkl. 5 % Phenol und 5 % Wasser. Danach wurde das Harz jeweils dreimal mit Essigsäure und Isopropanol gewaschen und über Nacht bei 40 °C getrocknet.

Abspaltung der zyklisierten Peptide vom Harz

Die Peptide wurden durch drei aufeinander folgende 24stündige Inkubationen mit jeweils 1 ml Isopropanol/H₂O (1:1) inkl. 0,1M Ammoniumhydrogencarbonat und 2 eq. DTT vom Harz abgespalten. Nach jeder Inkubation wurde das Filtrat gesammelt und in der SpeedVac eingeeengt. Die Harze wurden vor erneuter Zugabe der Abspalllösung mit Isopropanol/H₂O (1:1) gewaschen. Nach dem Einengen des letzten Filtrates wurden die Peptide nochmals in Isopropanol/H₂O (1:1) gelöst und in der SpeedVac eingeeengt, um eventuelle Rückstände des Ammoniumhydrogencarbonats zu entfernen.

Zur Erstellung von Stammlösung wurden die Peptide anschließend in 1 ml DMSO gelöst und bei -70 °C gelagert. Die Konzentration der Stammlösung wurde durch Aminosäurequantifizierung bestimmt (siehe Kapitel 3.4.1.5.4).

3.4.1.4 HPLC-Reinigung der linearen Kontrollpeptide

Die Reinigung der synthetischen Peptide wurde mittels präparativer HPLC durchgeführt. Bei der Reverse-Phase HPLC (RP-HPLC) werden die Peptide anhand ihrer hydrophoben Eigenschaften aufgetrennt. Die eingesetzten Laufmittel-Gradienten wurden dem Zeitpunkt der Elution der Peptide in der analytischen HPLC angepasst. Die Standardmethode zur Aufreinigung war die in Tabelle 11 dargestellte Methode 1. Für das synthetisierte 49mer wurde Methode 2 benutzt.

Die Fraktionen wurden aufgefangen, am Rotationsverdampfer eingengt und nach einer Überprüfung auf die korrekte Masse lyophilisiert.

Tabelle 11: Gradienten zur Reinigung der linearen Kontrollpeptide
(A: H₂O + 0,1 % TFA, B: MeCN + 0,1 % TFA, C: MeOH)

Gradient 1

Zeit (min)	flow rate ml/min	% A	% B	% C
0	25	95	5	0
10	25	95	5	0
70	25	50	50	0
70,1	25	0	0	100
80	25	0	0	100

Gradient 2

Zeit (min)	flow rate ml/min	% A	% B	% C
0	25	95	5	0
10	25	95	5	0
15	25	80	20	0
75	25	40	60	0
75,1	25	0	0	100
85	25	0	0	100

3.4.1.5 Analytik der Syntheseprodukte

Die Syntheseprodukte, mit Ausnahme der Peptidbibliotheken, wurden grundsätzlich durch analytische HPLC sowie HPLC/ESI-MS und/oder MALDI-MS charakterisiert.

Die Analyse der Syntheseprodukte mittels HPLC/ESI-MS und MALDI/MS beruht auf der Analyse der Molekularmasse der Peptide. Die beiden Techniken werden aufgrund ihrer Ionisierung unterschieden. Bei der Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) werden die Proben mittels eines Lasers ionisiert, wobei eine Matrix benutzt wird. Bei der Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) dagegen wird die flüssige Probe in Form eines Sprays versprüht; ein angelegtes elektrisches Feld führt dann zur Ionisierung der Probe. Diese Ionisierungsmethode eignet sich hervorragend zur Kopplung an eine HPLC, was als LC/MS-Technik bezeichnet wird. Hier wird der Analyt zuerst über die HPLC aufgetrennt und im Anschluss mittels ESI-MS charakterisiert.

3.4.1.5.1 analytische HPLC

Für die analytische HPLC wurden 10 µl des in der 50%igen H₂O/Acetonitril-Lösung (inkl. 0,1 % TFA) gelösten Syntheseproduktes injiziert. Der für den HPLC-Lauf eingesetzte Gradient ist in Tabelle 12 dargestellt. Fraktionen, die einen Absorptionspeak beinhaltenen, wurden über MALDI-MS auf die korrekte Masse geprüft.

Tabelle 12: Gradient analytische HPLC

(A: H₂O + 0,1 % TFA, B: MeCN + 0,1 % TFA, C: MeOH)

Zeit (min)	Durchfluss (µl/min)	% A	% B	% C
0	700	95	5	0
1	700	95	5	0
12	700	50	50	0
13	700	40	60	0
14	700	0	100	0
15	700	0	0	100
19	700	0	0	100

3.4.1.5.2 HPLC/ESI-MS

Für die HPLC/ESI-MS wurden 10 µl des in der 50%igen H₂O/Acetonitril-Lösung (inkl. 0,1 % TFA) gelösten Syntheseproduktes injiziert. Der angewandte Gradient ist in Tabelle 13 dargestellt. Die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren erfolgte mittels der Analyst Software.

Tabelle 13: Gradient HPLC/ESI-MS

(A: H₂O + 0,0 5% TFA, B: MeCN + 0,05 % TFA)

Zeit (min)	Durchfluss (µl/min)	A %	B %
0.10	400	95	5
12	400	35	65
15	400	5	95
16	400	5	95
17	400	95	5
20	400	95	5

3.4.1.5.3 MALDI-MS

Zur Bestimmung der Masse wurde eine MALDI-MS durchgeführt. Dazu wurden 0,7 µl der Probe auf den Probenträger aufgetragen. Als Matrix diente Dihydroxybenzoesäure (DHB).

3.4.1.5.4 Aminosäurequantifizierung

Bei der Aminosäurequantifizierung wird die Zusammensetzung eines Peptides analysiert. Dazu werden alle Peptidbindungen innerhalb des Peptides mit konzentrierter Salzsäure lysiert. Das erhaltene Aminosäuregemisch wird mittels HPLC aufgetrennt und die einzelnen Aminosäuren werden quantifiziert. Das richtige Verhältnis der Aminosäuren weist darauf hin, dass das erwartete Peptid vorliegt. Eine Bestätigung der richtigen Aminosäuresequenz innerhalb des Peptides erhält man aber nur über eine Aminosäuresequenzierung.

Die Aminosäurequantifizierung der synthetisierten Peptide wurde von Rita Getzlaff (Bereich Strukturbiologie, HZI) durchgeführt.

3.4.2 Mikrobiologische Methoden

Sämtliche mikrobiologische Arbeiten wurden unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

3.4.2.1 Bakterien

Alle in dieser Arbeit verwendeten *S. pyogenes*-Stämme wurden von der Abteilung Mikrobielle Pathogenität des HZI bereitgestellt.

3.4.2.1.1 Verwendete *S. pyogenes*-Stämme

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 14 aufgeführten *S. pyogenes*-Stämme verwendet.

Tabelle 14: Verwendete *S. pyogenes*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>S. pyogenes</i> A20 (DSMZ 2071)	M23-Typ, <i>sfbI</i> ⁺	Braunschweig
<i>S. pyogenes</i> A8	M13-Typ, <i>sfbI</i>	Aachen

3.4.2.1.2 Medium für die Kultivierung der Streptokokken

Das Kultivierungsmedium wurde vor dem Gebrauch durch 15minütiges Autoklavieren bei 1 bar Überdruck und 121 °C sterilisiert.

<u>Tryptic Soy Broth (TSB)</u>	30,0 g TSB Fertigmischung
	1 l dH ₂ O

3.4.2.1.3 Kultivierung und Konservierung

Die Kultivierung der Streptokokken erfolgte in dem Flüssigmedium TSB (inkl. 10 % FCS) stehend über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank.

Die Konservierung der Stämme erfolgte in einem Kryoröhrchen mit 750 µl der Übernachtkultur und 250 µl steriler Glycerinlösung bei –80 °C.

3.4.3 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Zellbiologischen Arbeiten wurden unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

3.4.3.1 Puffer und Lösungen

<u>PBS (10x Stock)</u>	160,0 g NaCl
	4,0 g KCl
	28,6 g Na ₂ HPO ₄
	4,0 g KH ₂ PO ₄
	2 l dH ₂ O

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf 7,0 eingestellt. Für die Verwendung in den Experimenten wurde der PBS-Puffer 1:10 mit dH₂O verdünnt und erneut autoklaviert.

<u>Isopropanol-HCl</u>	100 ml Isopropanol
	0,4 ml 32%ige HCl

<u>MTT-Lösung</u>	5 mg/ml in PBS
-------------------	----------------

3.4.3.2 Verwendete Zelllinie

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie HEp-2 (ATCC CCL-23) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Mikrobielle Pathogenität des HZI zur Verfügung gestellt.

3.4.3.2.1 Medien für die Zellkultur

Alle für die Zellkultur verwendeten Medien wurden vor dem Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) (Erhaltungsmedium):

+ Zusätze	10 % FCS (hitzeinaktiviert)
	1 % Penicillin/Streptomycin
	(Stock: Penicillin 5000 U/ml, Streptomycin 5000 µg/ml)
	1 % L-Glutamin (Stock: 30 g/l)

Infektionsmedium:

DMEM, gepuffert mit 25 mM HEPES

+ Zusätze 1 % FCS (hitzeinaktiviert)
 1 % L-Glutamin (Stock: 30 g/l)

Antibiotika-Medium

DMEM, gepuffert mit 25 mM HEPES

+ Zusätze 1 % FCS (hitzeinaktiviert)
 5 µg/ml Penicillin G
 100 µg/ml Gentamycin

3.4.3.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung der HEp-2-Zellen erfolgte bei 37 °C mit 5%iger CO₂-Atmosphäre. Konfluent bewachsene Petrischalen wurden nach Abnahme des DMEM mit PBS gewaschen und für 5 min mit 5 ml Trypsin-EDTA inkubiert. Das Abtrypsinieren der Zellen wurde durch Zugabe von 5 ml DMEM gestoppt. Zwei Milliliter dieser Zellsuspension wurden anschließend in eine neue Petrischale mit 18 ml frischem DMEM-Medium überführt.

Wurden die Zellen für die Aussaat für ein Experiment benötigt, wurde das antibiotikafreie Infektionsmedium benutzt und nach dem Abtrypsinieren die Zellzahl bestimmt.

3.4.3.3 Etablierung des Hochdurchsatz-Assays

3.4.3.3.1 Färbemethoden zur Erstellung der Kalibrationskurve

Zur Erstellung einer Kalibrationskurve mit fluoreszenzmarkierten *S. pyogenes* wurden verschiedene Färbemethoden ausgetestet. Dazu wurde jeweils wie unter Kapitel 3.4.2.1.3 eine Übernachtkultur von *S. pyogenes* herangezogen. Nach einem

Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm für 10 min wurde das Pellet mit 5 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 500 µl PBS resuspendiert. Durch Verdünnung mit PBS wurde diese Suspension auf 10 % Transmission bei 600 nm eingestellt. Je 1 ml dieser Suspension wurde in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß pipettiert und nach einem Zentrifugationsschritt entsprechend der einzelnen Färbemethoden weiterbehandelt.

Um den Einfluss der Färbemethode auf das Invasionsverhalten von *S. pyogenes* zu untersuchen, wurden die wie unten beschrieben gelabelten *S. pyogenes* in einem Infektionsversuch (siehe Kapitel 3.4.3.4, modifiziert) eingesetzt. Dabei wurden die externen *S. pyogenes* mittels einer Antikörperfärbung detektiert.

Die getesteten Färbemethoden sind im Folgenden näher beschrieben:

CellTracker™ CMAC

Das Pellet wurde mit 500 µl Färbelösung resuspendiert, wobei die eingesetzte CMAC-Konzentration zwischen 1 und 40 µM betrug. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt. Nach einer Inkubation von 15 bis 60 min bei 37 °C erfolgten zwei Waschschrte mit PBS. Nach der Resuspendierung mit 1 ml PBS wurde die Bakteriensuspension mit je 100 µl pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Fluoreszenz mittels eines Fluoreszenz-Mikrotiterplattenreader bestimmt.

CellTracker™ CMFDA

Die Färbelösung wurde mit einer Konzentration von 2,5 bzw. 5 µM eingesetzt; die Verdünnungen wurden mit PBS bzw. mit Infektionsmedium hergestellt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien wie oben beschrieben gewaschen und ihre Fluoreszenz bestimmt. Als alternative Färbemethode wurde zu dem Ansatz einer Übernackkultur von *S. pyogenes* 1 ml CMFDA (2,5 bzw. 5 µM) zugegeben. Die Ernte erfolgte am nächsten Tag wie oben beschrieben. Je 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden dann pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte pipettiert und ihre Fluoreszenz gemessen.

SYTO13

Zur Resuspendierung des Pellet wurden 500 µl Färbelösung eingesetzt. Die Konzentration lag zwischen 1 und 5 µM; die Verdünnungen wurden mit PBS bzw. Infektionsmedium erstellt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C wurde zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml PBS resuspendiert und die Bakteriensuspension wie oben beschrieben auf eine Mikrotiterplatte verteilt und die Fluoreszenz gemessen. Parallel dazu wurde beim Ansatz einer Übernachtskultur von *S. pyogenes* 1 ml SYTO13 (5 bzw. 10 µM) zugegeben. Die Ernte erfolgte am nächsten Tag wie oben beschrieben. Je 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden dann in einer Mikrotiterplatte gemessen.

Hoechst 33258

Die eingesetzten Konzentrationen der Färbelösung betragen 5 bzw. 10 µg/ml, wobei die Verdünnungen mit PBS hergestellt wurden. Nach einer Inkubation mit 500 µl der Färbelösung für 30 min bei 37 °C wurden die Bakterien zweimal mit PBS gewaschen und im Folgenden wie oben beschrieben ihre Fluoreszenz bestimmt.

FITC-Biotin-Avidin-Färbung

Die differentielle Färbung nach (Agerer *et al.* 2004) wurde zunächst einzeln, dann komplett durchgeführt.

I) FITC-Färbung

Das Bakterienpellet wurde mit 1 ml der FITC-Lösung für 15 bis 60 min inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen lagen zwischen 0,4 bis 200 µg/ml, wobei die Verdünnungen mit PBS, DMSO bzw. TSB erstellt wurden. Nach zweimaligem Waschen wurde die grüne Fluoreszenz wie oben beschrieben bestimmt.

II) Biotin-Avidin-Färbung

Zur Resuspendierung des Pellet wurden 500 µl Biotinlösung eingesetzt, die Konzentrationen variierten zwischen 0,3 und 1 mg/ml in PBS. Nach einer Inkubation von 30 bis 60 min bei 4 °C auf einem Schüttler wurde einmal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden 500 µl der Streptavidin-Alexa647-Lösung (10 bzw. 20 µg/ml) zugegeben und für 45 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die rote Fluoreszenz wie oben beschrieben bestimmt.

III) FITC-Biotin-Avidin-Färbung

Zu 500 µl der FITC-gelabelten *S. pyogenes* (Inkubation mit 0,4 µg/ml FITC für 15 min bei 4 °C) wurde das gleiche Volumen der Biotinlösung (0,3 mg/ml) gegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte eine 45minütige Inkubation mit Streptavidin-Alexa647-Lösung (10 µg/ml). Nach zweimaligem Waschen wurden wie oben beschrieben Fluoreszenzmessungen durchgeführt.

Fluorescein + α -Fluorescein-Antikörper

Das Bakterienpellet wurde mit 1 ml der FITC-Lösung (200 µg/ml) für 60 min inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde eine 1:20-Verdünnung der Bakteriensuspension in PBS hergestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet mit 300 µl der α -Fluorescein-Antikörperlösung für 10 bis 45 min inkubiert. Die eingesetzte Konzentration des rot fluoreszierenden Antikörpers lag zwischen 10 und 200 µg/ml in PBS. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Fluoreszenz wie oben beschrieben gemessen.

Antikörperfärbung im Eppendorf tube

Zur Resuspendierung der Bakterien wurden 200 µl des primären Antikörpers zugegeben. Nach einer 45minütigen Inkubation und einem Waschschrift mit PBS wurden 200 µl des sekundären Antikörpers, gelabelt mit AlexaFluor®488 bzw. AlexaFluor®568 zugefügt und erneut für 45 min inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert und je 100 µl der Suspension/Vertiefung in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Fluoreszenz der Bakterien wurde wie oben beschrieben bestimmt.

Antikörperfärbung in Mikrotiterplatte (modifiziert nach (LeBlay G. *et al.* 2004))

Das Bakterienpellet wurde mit 500 µl eiskalter 3,7%iger Formaldehyd-Lösung resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert und je 100 µl dieser Suspension wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde der Überstand in den Vertiefungen verworfen und je 100 µl 10 % FCS/PBS hinein pipettiert. Nach einer 10minütigen Inkubation wurde das Blocking-Reagenz entnommen und vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden zuerst 50 µl des primären Antikörpers zugegeben, für 45 min inkubiert, mit PBS gewaschen und dann 50 µl des sekundären, Fluoreszenz-gelabelten Antikörpers (AlexaFluor®488 bzw. AlexaFluor®568) zugegeben. Nach einer 45minütigen Inkubation wurde erneut mit PBS gewaschen und zuletzt 100 µl PBS in jede Vertiefung pipettiert. Die Fluoreszenz der Streptokokken wurde dann mittels eines Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Readers bestimmt.

3.4.3.3.2 Erstellung der Kalibrationskurve

Zur Erstellung der Kalibrationskurve wurde *S. pyogenes* wie in Kapitel 3.4.3.3.1 unter dem Punkt „Antikörperfärbung in Mikrotiterplatte“ mit dem AlexaFluor®488-gelabelten Antikörper angefärbt. Dabei wurden die Bakterien vor Beginn der Färbung in definierten Konzentrationen von 10^4 bis 10^7 Bakterien/Vertiefung in die Mikrotiterplatte pipettiert.

Der mögliche Bakterienverlust pro Vertiefung beim Anfärben wurde wie folgt kontrolliert: Ein wie unter Kapitel 3.4.3.3.1 zum Anfärben vorbereitetes Bakterienpellet wurde in 1 ml DAPI-Lösung (10 µg/ml in PBS) resuspendiert und für 15 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert und je 100 µl Bakteriensuspension mit definierter Konzentration (10^4 bis 10^7 Bakterien/Vertiefung) in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Diese wurde lichtgeschützt bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die bei der Antikörperfärbung nun erfolgenden Schritte wurden durch die Zugabe von 100 µl PBS simuliert. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Streptokokken gemessen. Um die nach dem Färbeprotokoll

verbleibende Anzahl Streptokokken pro Vertiefung zu bestimmen, wurden die in den Mikrotiterplatten adhärenen *S. pyogenes* durch starkes Schütteln gelöst und die Zellzahl pro Vertiefung ausgezählt. Die Mikrotiterplatte wurde erneut im Fluoreszenz-Reader gemessen, um sicherzustellen, dass alle sich in den Vertiefungen befindlichen *S. pyogenes* herausgelöst wurden.

3.4.3.3.3 Adhäsionsassay

Bei dem durchgeführten Adhäsionsassay wird die Anzahl der an die HEp-2-Zellen adhärenen Streptokokken über eine Fluoreszenzmessung ermittelt.

Die HEp-2-Zellen wurden wie in Kapitel 3.4.3.2.2 beschrieben mit antibiotikafreiem Medium (Infektionsmedium) abtrypsiniert. Danach wurde die Zellzahl bestimmt und mit Infektionsmedium auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 250 μ l dieser Zellsuspension wurden anschließend mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette in FluoroNunc™-96-Well-Zellkulturplatten verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei wurden die Platten innerhalb des Inkubators in einer mit etwas dH₂O gefüllten Feuchten Kammer gelagert. So wurden so genannte Randeffekte, d. h. die Zellen in den äußeren Vertiefungen wachsen schlechter als die in innen liegenden, vermieden. Am Tag der Infektion wurde das Infektionsmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 50 μ l der zu testenden Peptide zugegeben und für 1 Stunde mit den Zellen inkubiert. Die benötigte Verdünnung der zu testenden Peptide wurde mit Infektionsmedium bzw. PBS hergestellt. Es wurde für jedes Peptid mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle dienten infizierte Zellen, die nicht mit einem Peptid vorinkubiert wurden.

Während dieser Inkubationszeit wurde eine Übernachtskultur des *S. pyogenes*-Stammes A20 wie in Kapitel 3.4.3.3.1 auf 10 % Transmission bei 600 nm eingestellt. Anschließend erfolgte eine weitere 1:5-Verdünnung mit Infektionsmedium und 100 μ l dieser Keimsuspension wurde zu den mit den Peptiden vorinkubierten HEp-2-Zellen zugegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dies entsprach einer Infektionsrate von 1:100. Die Infektion wurde nach 2 Stunden durch das Abnehmen des Überstandes und zweimaliges Waschen mit PBS gestoppt. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch

eine 10minütige Behandlung mit 50 μ l vorgekühlter 3,7%iger wässriger Paraformaldehyd-Lösung auf Eis. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit 50 μ l einer 10%igen FCS/PBS-Lösung durch eine 20minütige Inkubation blockiert. Jedem der folgenden Schritte schloss sich ein zweimaliges Waschen mit PBS an. Die adhärenen Streptokokken wurden nun mit 50 μ l primärem Antikörper (Kaninchen-anti-*S. pyogenes*) durch eine Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur markiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem sekundären, Fluoreszenz-gelabelten Antikörper (AlexaFluor®488) unter den gleichen Bedingungen. Um die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers nicht abzuschwächen, wurden die Zellkulturplatten ab diesem Schritt mit lichtundurchlässiger Alufolie abgedeckt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden pro Well 100 μ l PBS zugegeben und die Fluoreszenz in einem Fluoreszenz-Mikrotiterplattenreader bestimmt (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: Fluoreszenz-Mikrotiterplattenreader Wallac™ 1420 Multilabel Counter, rechts mit messbereiter FluoroNunc™-96-Well-Platte

3.4.3.3.4 Invasionsassay

Bei dem im Folgenden beschriebenen Invasionsassay wurde nur die Anzahl der invasiven, d.h. der intrazellulären Streptokokken, über Fluoreszenzmessung ermittelt. Die Aussaat der HEp-2-Zellen sowie der weitere Verlauf der Infektion waren identisch mit dem unter Kapitel 3.4.3.3.3 beschriebenen Adhäsionsassay. Nach der zweistündigen Infektion im Zellinkubator und dem Verwerfen des Überstands wurden die Wells mit

100 µl Antibiotika-Medium für 10 min inkubiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Mediums wurden die Zellen vorsichtig gewaschen und schwach adhärenente Streptokokken abgelöst. Durch eine weitere Inkubation mit 100 µl Antibiotika-Medium für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die verbliebenen adhärenenten Streptokokken abgetötet und ihre Bindung an die HEp-2-Zellen geschwächt. Die Zellen wurden erneut durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Mediums gewaschen. Vorversuche hatten bei Betrachtung unter dem Mikroskop gezeigt, dass durch dieses Verfahren nahezu alle adhärenenten Streptokokken von den Zellen abgelöst wurden. Nach der Fixierung der Zellen und dem Blocken der unspezifischen Bindung (siehe Kapitel 3.4.3.3.3) wurden die Zellen für 5 min mit einer 0,1%igen Triton-X-Lösung in PBS inkubiert. Dieser Schritt permeabilisiert die fixierten HEp-2-Zellen und macht so die intrazellulären Streptokokken für die Antikörperfärbung zugänglich. Die Färbung erfolgte wie unter Kapitel 3.4.3.3.3 beschrieben, allerdings wurden die Inkubationszeiten auf 1 Stunde erhöht. Die Fluoreszenz wurde ebenfalls wie in Kapitel 3.4.3.3.3 beschrieben detektiert.

3.4.3.4 Infektionsversuch mit differentieller Fluoreszenzfärbung

Für den Infektionsversuch wurden die HEp-2-Zellen wie in Kapitel 3.4.3.2.2 mit antibiotikafreiem Medium abtrypsiniert und nach Bestimmung der Zellzahl auf 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Die Vertiefungen einer 24-Well-Zellkulturplatte wurden mit sterilen runden Deckgläschen bestückt und 500 µl Infektionsmedium vorgelegt. Anschließend wurden 500 µl der HEp-2-Zellen ausgesät. Am Tag der Infektion wurden die Zellen einmal mit Infektionsmedium gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des zu testenden Peptids bzw. Peptidgemisches zugegeben und für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die benötigte Verdünnung der zu testenden Peptide wurde mit Infektionsmedium bzw. PBS hergestellt.

Eine Übernachtskultur des GAS-Stammes A20 wurde wie in Kapitel 3.4.3.3.1 beschrieben aufbereitet und auf 10 % Transmission eingestellt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit Infektionsmedium 1:10 verdünnt und 250 µl davon zu den Zellen gegeben. Die infizierten Zellen wurden für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Stoppen der Infektion wurde zweimal mit PBS gewaschen und

anschließend mit 500 µl vorgekühlter 3,7 %iger wässriger Paraformaldehyd-Lösung für 1 Stunde auf Eis fixiert. Nach jedem der im Folgenden beschriebenen Schritte folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde nach der Fixierung mit 500 µl 10 % FCS/PBS für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des primären Antikörpers zugegeben und für 45 min inkubiert. Die Fluoreszenzfärbung der externen Streptokokken erfolgte über die Zugabe eines mit AlexaFluor®488 markierten sekundären Antikörpers. Die folgenden Schritte verliefen in einer lichtundurchlässigen Box. Um auch die internen Streptokokken für die Antikörperfärbung zugänglich zu machen, wurden die Zellen für 5 min mit einer 0,1 %igen Triton-X-100-Lösung in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die internen Streptokokken mit dem primären und dem sekundären, diesmal AlexaFluor®568 markierten, Antikörper angefärbt. Die Inkubationsbedingungen entsprachen den zuvor genannten, allerdings wurde die Inkubationsdauer auf 1 Stunde erhöht. Nach der Färbung wurden die Deckgläschen dreimal mit Wasser gewaschen und mit der Zellseite nach unten in einen Tropfen Bleichschutz (Mowiol) auf einen Objektträger gelegt. Die Ränder wurden mit handelsüblichem klarem Nagellack versiegelt und die Proben bis zur Auswertung (siehe Kapitel 3.4.4) bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Zur Auswertung wurden jeweils 50 Zellen in mindestens 3 verschiedenen, zufällig verteilten Bereichen ausgezählt.

Die digitale Bildverarbeitung erfolgte mit dem Programm PhotoFiltre.

3.4.3.5 Test der eingesetzten Peptide auf Zytotoxizität

Die zytotoxische Wirkung der eingesetzten Peptide wurde mit dem MTT-Test (Mosmann 1983) ermittelt. Das in diesem Test zu den Zellen gegebene MTT wird von den mitochondrialen Succinatdehydrogenasen zu lila Farbkristallen reduziert. Diese werden anschließend mittels Isopropanol-HCl aufgelöst. Eine Messung der Farbintensität gibt dann Aufschluss über einen möglichen zytotoxischen Effekt der getesteten Substanz. Bei den hier zu testenden Peptiden wurde sowohl die Konzentration der als auch die Inkubationsdauer aus dem Infektionsversuch übernommen.

Die Zellzahl der abtrypsinierten Zellen (siehe Kapitel 3.4.3.2.2) wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 10^5 Zellen/ml eingestellt. 250 μ l dieser Suspension wurden pro Vertiefung in eine 96-Well-Zellkulturplatte verteilt und über Nacht im CO₂-Inkubator inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 50 μ l der zu testenden Peptide zugegeben. Die benötigte Verdünnung der zu testenden Peptide wurde mit Infektionsmedium bzw. PBS hergestellt. Als Kontrolle dienten Zellen, die zwar ohne Peptid, aber mit Infektionsmedium und dem Lösungsmittel der Peptide inkubiert wurden. Jedes Peptid wurde in einer Doppelbestimmung getestet. Nach einer dreistündigen Inkubation im CO₂-Inkubator wurden 20 μ l MTT-Lösung pro Vertiefung zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt (5 min, 3000 rpm), wurde der Überstand verworfen und pro Vertiefung 100 μ l PBS vorsichtig dazugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation und dem Ausschlagen der Platten wurden 100 μ l Isopropanol-HCl pro Vertiefung hinzugefügt, die die Auflösung der Formazankristalle bewirken. Diese Auflösung wurde durch 10minütiges Schütteln bei Raumtemperatur unterstützt.

Die Farbintensität der einzelnen Vertiefungen bei 590 nm wurde in einem Mikrotiterplattenreader (Titertek Multiskan® MCC/340) gemessen.

3.4.3.6 Test der eingesetzten Peptide auf bakteriostatische Wirkung

Eine mögliche bakteriostatische Wirkung der im Infektionsassay eingesetzten Peptide wurde mittels einer Wachstumsmessung von GAS A20 getestet. Die eingesetzten Peptidkonzentrationen entsprachen denen im Infektionsassay.

Dazu wurden 3 ml einer Übernachtskultur in frischem, 37 °C warmem TSB-Medium (inkl. 10 % FCS) für 2 Stunden angezogen. Die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspension wurde mit warmem TSB-Medium auf eine OD von 0,2 bei 600 nm eingestellt. Jeweils 50 μ l dieser Suspension wurden in eine 96-well-Zellkulturplatte gegeben. Die gleichmäßige Verteilung der Bakterien wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm in einem Mikrotiterplattenreader (TECAN Sunrise) überprüft.

Anschließend wurden 25 µl der zu testenden Peptide zugegeben. Die benötigte Verdünnung der zu testenden Peptide wurde mit Infektionsmedium bzw. PBS hergestellt. Als Positivkontrolle diente die Zugabe von Medium mit Penicillin/Gentamycin. Alle Peptide wurden in einer Doppelbestimmung getestet. Direkt nach der Zugabe der Peptide sowie nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h und 19 h wurde die OD₆₀₀ gemessen.

3.4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der in dieser Arbeit angewandten Epifluoreszenzmikroskopie werden die Fluorochrome in der Probe durch eine Quecksilber-Hochdrucklampe angeregt. Durch im Mikroskop befindliche optische Filter und einen dichroitischen Spiegel ist es möglich, Licht bestimmter Wellenlänge auf die Probe zu lenken. Diese beginnt zu fluoreszieren und das emittierte Licht wird entweder zum Okkular oder zu einer CCD-Kamera zurück geleitet. Die Proben wurden mit der an das Mikroskop angeschlossenen Kamera dokumentiert.

4 Ergebnisse

4.1 Synthese der linearen Peptide

4.1.1 Synthese des 49mers

Das so genannte 49mer ist ein Teil des von *S. pyogenes* exprimierten SfbI-Proteins. Es umfasst sechs N-terminale Aminosäuren des ersten Repeats und 43 benachbarte Aminosäuren des Spacers (Ozeri *et al.* 1996). Aufgrund seiner umfangreichen Länge und einiger als schwierig prognostizierter Kopplungen war die Synthese des 49mers problematisch.

Für die erfolgreiche Synthese des 49mers wurden verschiedene Synthesestrategien verfolgt. Da eine Totalsynthese des Peptides mit den Aktivierungs- und Kopplungsreagenzien TBTU und N-Ethyl-diisopropylamin (Hünig-Base) nicht erfolgreich war, wurde der Versuch einer Fragmentkondensation mit zwei Einzelfragmenten unternommen. Nach erfolgreicher Synthese beider Einzelfragmente (1. Fragment Aminosäuren 1 – 21, 2. Fragment Aminosäuren 22 – 49 des 49mers; zum Vergleich der Sequenz siehe Tabelle 5) wurde unter Einsatz der Aktivierungs- und Kopplungsreagenzien HOAt und HATU sowie der Hünig-Base die Kondensation durchgeführt. Die erwartete Masse des 49mers konnte jedoch nicht detektiert werden. Auch der Einsatz von so genannten Pseudoprolinen in einer Totalsynthese führte nicht zum gewünschten Syntheseprodukt (Ergebnisse nicht dargestellt). Nach einer Veränderung im Syntheseprotokoll, nämlich dem Einsatz von DIC und HOBt als Aktivierungs- und Kopplungsreagenzien, gelang letztendlich die Totalsynthese des 49mers am Syntheseautomaten Syro. Das HPLC-Chromatogramm des ungereinigten Rohpeptides (siehe Abbildung 7) zeigte einen Doppelpeak, in dem die berechnete Masse von 5373 g/mol gefunden wurde.

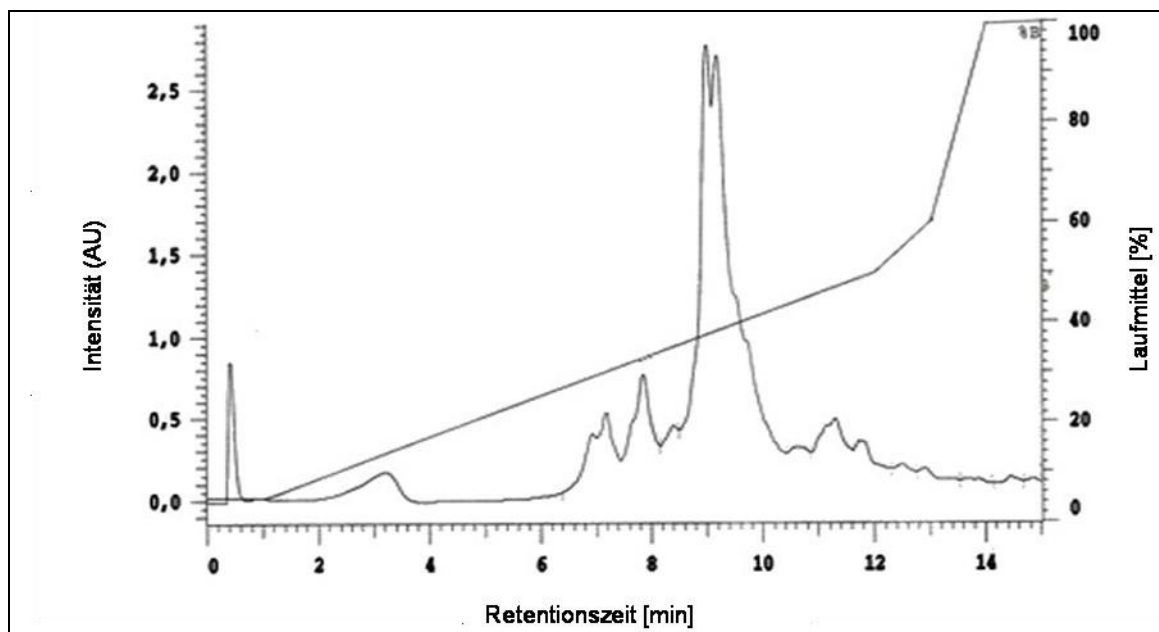


Abbildung 7: Chromatogramm des ungereinigten 49mers
Die berechnete Masse des 49mers wurde in beiden Spitzen des Doppelpeaks detektiert.

Die Aufreinigung und gleichzeitige Auftrennung des Doppelpeaks wurde mittels HPLC (Gradient 2) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 8a und 8b dargestellt. In beiden Peaks wurde die berechnete Masse des 49mers gefunden. Eine Erklärung für diesen Befund liegt in dem möglichen Auftreten von Razemisierungen und/oder Cis-Trans-Isoformen, bedingt durch die im Peptid enthaltenen Proline. Auf eine weitergehende Analytik dieses Befunds wurde aufgrund des großen erforderlichen Aufwands verzichtet.

Die Synthesausbeute betrug 10 mg für Peak 1 bzw. 5,35 mg für Peak 2. Nach der Lyophilisierung wurde das Peptid bei -20 °C gelagert. Für die biologischen Tests wurden Stammlösungen in PBS erstellt. In den biologischen Tests wurde ausschließlich der erste Peak eingesetzt, weil aufgrund der größeren Ausbeute gegenüber Peak 2 im Fall von Razemisierungen für Peak 1 eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit für die korrekte Konformation vorliegt

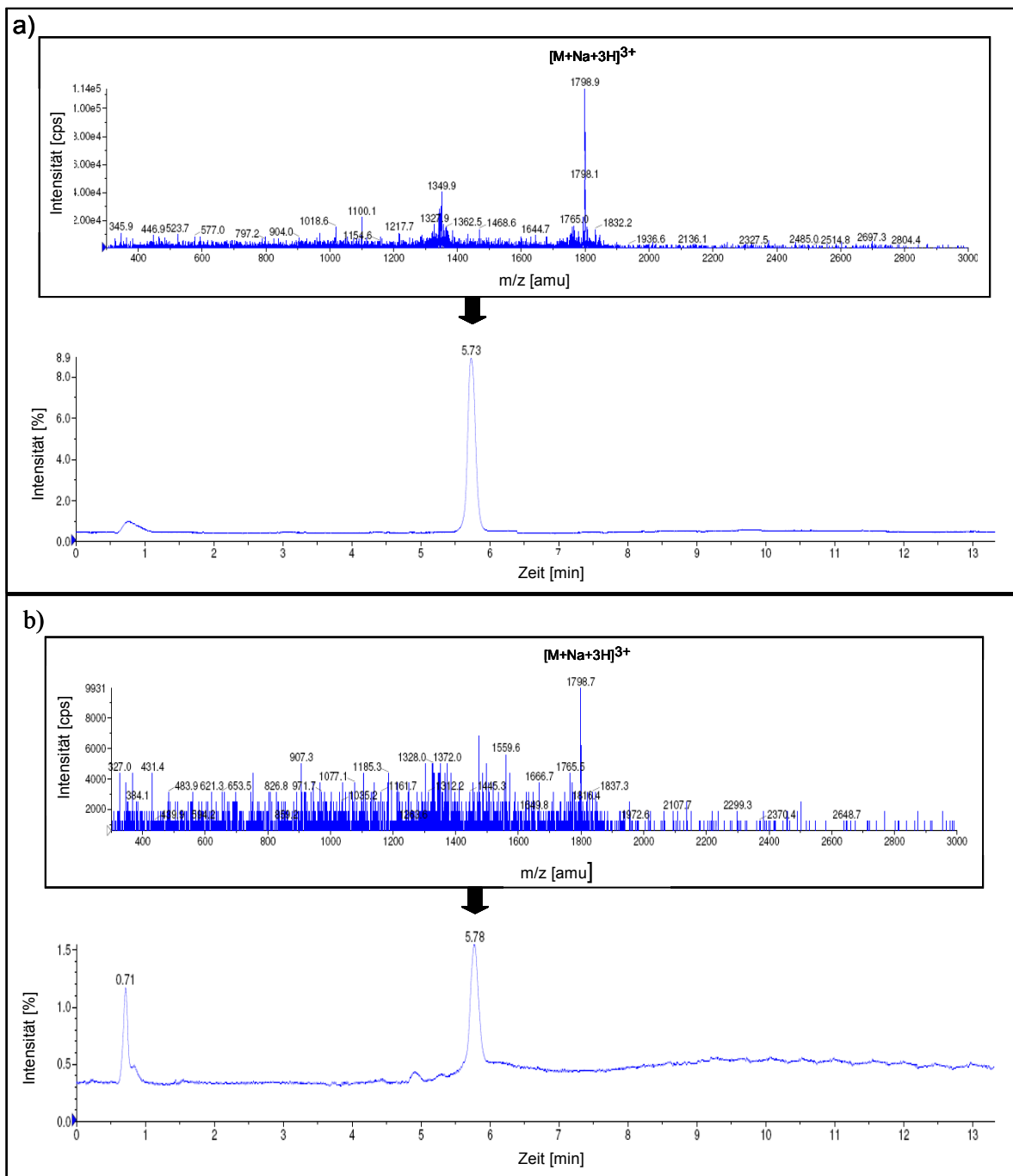


Abbildung 8: HPLC/ESI-MS-Chromatogramm des aufgereinigten 49mer a) Peak 1, b) Peak 2

4.1.2 Synthese von PyOT5 und DMBT1pbs1

Die Synthese beider aus der Literatur bekannten Peptide (Schwarz-Linek *et al.* 2004; Bikker *et al.* 2004) wurde am Syntheseautomaten Syro durchgeführt. Um die Produktausbeute zu erhöhen, wurden beide Peptide mit je zwei 25- μ mol-Ansätzen synthetisiert.

Das in der Synthese des PyOT5, einem 25mer (vgl. Tabelle 7), gefundene Hauptprodukt zeigte bei der Massenbestimmung die erwartete Masse von 2956 g/mol. Nach einer Aufreinigung des Peptids mittels Reverse Phase HPLC (siehe Abbildung 9) konnte die Syntheseausbeute mit 118 mg bestimmt werden.

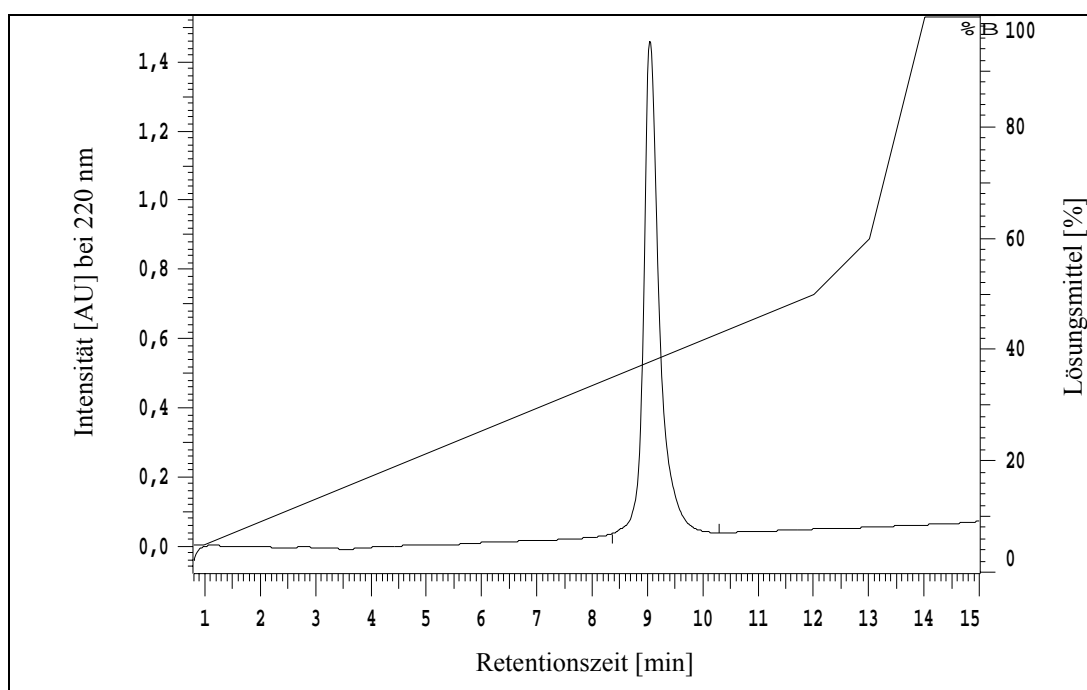


Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten PYOT5

Die Masse des Peptides DMBT1pbs1, einem 11mer (vgl. Tabelle 7), entsprach dem mit 1321 g/mol berechneten Wert. Auch dieses Peptid wurde vor dem Einsatz in den biologischen Tests aufgereinigt (siehe Abbildung 10). Die Syntheseausbeute für das DMBT1pbs1 betrug 12 mg.

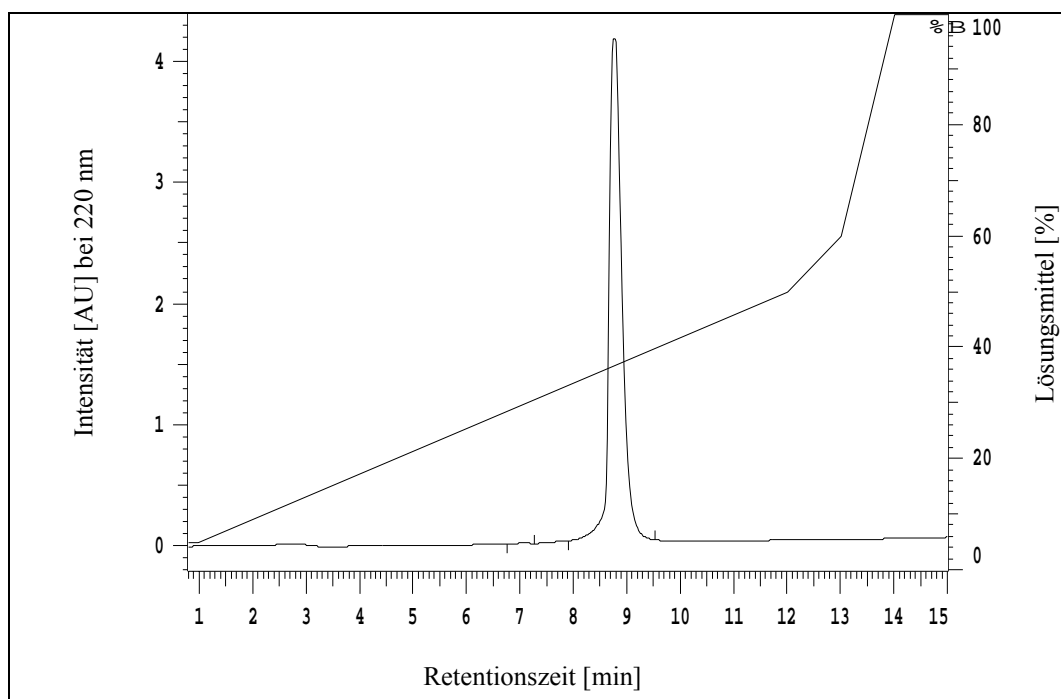


Abbildung 10: HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten DMBT1pbs1

4.2 Synthese der Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren mit der Struktur xxx-o₁o₂-xxx-DKP

Die Bibliothek mit dem Format xxx-o₁o₂-xxx-DKP, bestehend aus D-Aminosäuren, wurde an dem Synthesegerät Syro hergestellt. Dabei wurden außer Cystein alle 19 proteinogenen Aminosäuren verwendet. Eine Bibliothek mit dem oben genannten Format besteht aus $19^2 = 361$ Unterbibliotheken, von denen jede $19^6 = 47.045.881$ verschiedene Peptide enthält. Die Bibliothek wurde in vier aufeinander folgenden Synthesen hergestellt, wobei pro Synthesereaktor ein 5- μ mol-Ansatz gestartet wurde. Nach Abschluss der Synthese und der Erstellung der Stammlösungen wurden aus den vier Synthesen mehrere zufällig ausgesuchte Positionen zur Aminosäurequantifizierung gegeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde von einer Durchschnittskonzentration der Bibliothek von ca. 3 mM ausgegangen. Eine präparative Aufreinigung der Bibliothek ist aufgrund ihrer Komplexität sehr schwierig und aufwändig und eventuell mit großen Verlusten verbunden, so dass in dieser Arbeit darauf verzichtet wurde. Die Löslichkeit der Bibliothek in Isopropanol/H₂O (1:1) wies keine Probleme auf. Die Stammlösung der

Bibliothek wurde bei -70 °C gelagert, für die Verwendung in den biologischen Tests wurden Tochterplatten aliquotiert, die bei -20 °C gelagert wurden.

Tabelle 15: Ergebnisse der Aminosäurequantifizierung ausgewählter Positionen der linearen D-Aminosäure-Bibliothek

Position	Konzentration
xxx -ag- xxx-DKP	~ 3 mM
xxx -de- xxx-DKP	~ 2,6 mM
xxx -fk- xxx-DKP	~ 0,12 mM
xxx -fw- xxx-DKP	~ 5,2 mM
xxx -he- xxx-DKP	~ 3,16 mM
xxx -iw- xxx-DKP	~ 1,17 mM
xxx -ky- xxx-DKP	~ 2,3 mM
xxx -lf- xxx-DKP	~ 3 mM
xxx -ma- xxx-DKP	~ 2,35 mM
xxx -ms- xxx-DKP	~ 1,49 mM
xxx -ne- xxx-DKP	~ 2,96 mM
xxx -qy- xxx-DKP	~ 2,3 mM
xxx -ri- xxx-DKP	~ 1,32 mM
xxx -rt- xxx-DKP	~ 2,25 mM
xxx -ty- xxx-DKP	~ 4,5 mM
xxx -vi- xxx-DKP	~ 3,22 mM
xxx -yd- xxx-DKP	~ 8,3 mM
xxx -yh- xxx-DKP	~ 1,15 mM
durchschnittliche Konzentration	~ 3,0 mM

4.2.1 Nachsynthese einzelner Subbibliotheken

Aufgrund ihrer Aktivität im Adhäsions- bzw. Invasionsassays wurden die Subbibliotheken xxx-**gr**-xxx-DKP, xxx-**ts**-xxx-DKP, xxx-**tv**-xxx-DKP und xxx-**vm**-xxx-DKP noch einmal synthetisiert. Damit sollte überprüft werden, ob die mit der ursprünglichen Bibliothek gefundenen Aktivitäten in einem Syntheseartefakt begründet lagen. Die Synthese erfolgte nach dem Syntheseprotokoll der Bibliothek.

4.3 Nachsynthese zyklischer Peptide des Formats [aa-o₁o₂-aac]zyklo

Drei Positionen einer Sammlung zyklischer Peptide mit dem Format [aa-o₁o₂-aac]zyklo wurden auf Grund ihrer Aktivität in den biologischen Tests nachsynthetisiert. Die Synthese wurde nicht im Syntheseautomaten, sondern manuell durchgeführt; der Ansatz betrug 20 µmol/Peptid. Die erfolgreiche Zyklisierung der Peptide wurde durch eine MALDI-MS-Messung überprüft. Dabei wurde bei der Sequenz [aa-aa-aac]zyklo, wie oft bei dieser Analysemethode, das Natriumsalz mit einer um 22 Dalton erhöhten Masse als Hauptpeak registriert. Die Massen der vermeintlichen Peptide [aa-ae-aac]zyklo und [aa-ks-aac]zyklo waren um jeweils 40 g/mol zu hoch. Diese Massendifferenz lässt sich durch die Detektion des Natriumsalzes als Hauptpeak sowie durch eine fehlende Zyklisierung der Peptide erklären. Da die Problematik der Zyklisierung aus der Synthese der kompletten Sammlung der Peptidgemische, durchgeführt von Dr. Werner Tegge (HZI), bekannt war und auch dort nicht gelöst werden konnte, wurden auch die nicht zyklisierten Peptide in den biologischen Tests eingesetzt. Die Ergebnisse der Aminosäurequantifizierung sind in Tabelle 16 dargestellt. Auf eine präparative Aufreinigung der Peptide wurde verzichtet. Die Stammlösung der Bibliothek wurde bei -70 °C gelagert, für die Verwendung in den biologischen Tests wurden Tochterplatten aliquotiert, die bei -20 °C gelagert wurden.

Tabelle 16: Ergebnisse der Aminosäurequantifizierung nachsynthetisierter zyklischer Peptide

Position	Konzentration
[aa-aa-aac]zyklo	~ 3,7 mM
aa-ae-aac	~ 8,85 mM
aa-ks-aac	~ 10,4 mM

4.4 Etablierung des Hochdurchsatz-Assays

4.4.1 Färbemethoden zur Erstellung der Kalibrationskurve

Zur Erstellung der Kalibrationskurve wurden verschiedene Färbemethoden untersucht. Bei der optimalen Färbemethode sollte der Verlauf der Kalibrationskurve über einen großen Bereich hinweg so verlaufen, dass er möglichst genau durch eine Geradengleichung definiert werden kann. Gleichzeitig sollte das Verhältnis von Streptokokken zu gemessener Fluoreszenz annähernd proportional sein, wie bereits in der Literatur beschrieben (Athamna & Ofek 1988; LeBlay G. *et al.* 2004; Acord *et al.* 2005). Der von der Kalibrationskurve umfasste Bereich sollte von einer möglichst niedrigen Zellzahl bis, wenn möglich, zur im Assay eingesetzten Bakterienzahl reichen. Die Ergebnisse der einzelnen Färbemethoden sind im Folgenden dargestellt.

CellTracker™ CMAC und CMFDA

Die blau bzw. grün fluoreszierenden CellTracker™ CMAC und CMFDA diffundieren über die Zellmembran in die zu färbende Zelle. Innerhalb der Zelle wird der Farbstoff dann durch Glutathion-S-Transferasen und Esterasen umgewandelt und verliert seine Membrangängigkeit (Produktbeschreibung der Farbstoffgruppe CellTracker™ vom Hersteller Molecular Probes™).

Die Ergebnisse der Anfärbung von *S. pyogenes* mit CMAC bzw. CMFDA zeigten bei keiner der in Kapitel 3.4.3.3.1 beschriebenen Bedingungen ein zufrieden stellendes Ergebnis. Besonders bei niedrigen Zellzahlen von *S. pyogenes* konnte der erwartete ansteigende Kurvenverlauf nicht erreicht werden (siehe Abbildung 11). Auch eine Anzucht der Streptokokken in TSB inkl. CMFDA zeigte keine Verbesserung der Färberesultate (Ergebnisse nicht dargestellt)

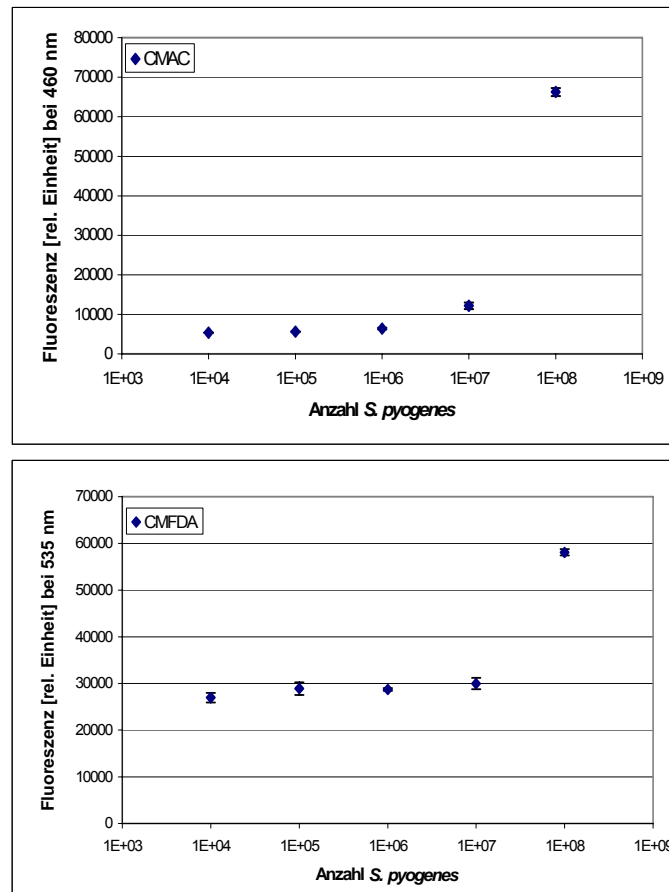


Abbildung 11: Färbung von *S. pyogenes* A20 mit CellTracker™ CMAC und CMFDA (CMAC: 20 μ M CMAC in TSB, 45minütige Inkubation bei 37 °C; CMFDA: 5 μ M in Infektionsmedium, 30minütige Inkubation bei 37 °C). Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz (Mittelwert \pm Standardabweichung) in Abhängigkeit der Anzahl Streptokokken eines repräsentativen Experiments.

Bei der Betrachtung von Infektionsversuchen unter dem Mikroskop (Abbildung 14a und 14b) wurde deutlich, dass die blaue Fluoreszenz der mit CMAC gefärbten *S. pyogenes* durch die Autofluoreszenz der HEp-2-Zellen überlagert wurde. Zwar konnten die adhärennten Streptokokken durch eine zusätzliche Antikörperfärbung sichtbar gemacht werden, es wurden jedoch, bedingt durch die Autofluoreszenz der Hep-2-Zellen, keine internalisierten Streptokokken gefunden.

Infektionsversuche mit CMFDA-gefärbten *S. pyogenes* zeigten das gleiche Ergebnis. Auch hier wurden keine grünen Streptokokken gesehen, was durch die hohe Hintergrundfluoreszenz der HEp-2-Zellen zu erklären ist. Adhärennte Streptokokken konnten auch hier durch eine zusätzliche Antikörperfärbung lokalisiert werden (siehe Abbildung 14c).

SYTO 13

Der grün fluoreszierende Farbstoff SYTO 13 ist in der Lage, frei durch Zellmembranen von sowohl eukaryotischen als auch prokaryotischen Zellen zu diffundieren (Produktbeschreibung der Farbstoffgruppe SYTO® vom Hersteller Molecular Probes™). Innerhalb der Zelle werden sowohl DNA als auch RNA angefärbt.

Die in Abbildung 12 dargestellte Fluoreszenzmessung zeigt, dass besonders bei niedrigen Zellzahlen die Kurve einen unerwünschten Plateauverlauf aufweist. Auch eine Anzucht der Streptokokken in TSB inkl. SYTO 13 zeigte keine Verbesserung der Färberegebnisse (Ergebnisse nicht dargestellt).

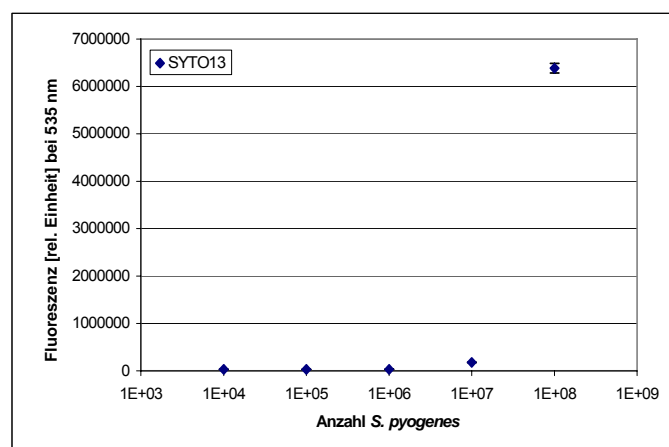


Abbildung 12: Färbung von *S. pyogenes* A20 mit SYTO 13 (5 μ M SYTO 13 in PBS, 30minütige Inkubation bei 37 °C). Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz (Mittelwert \pm Standardabweichung) in Abhängigkeit der Anzahl Streptokokken eines repräsentativen Experiments.

Infektionsversuche von mit SYTO 13 angefärbten *S. pyogenes* zeigten unter dem Mikroskop nur sehr wenige internalisierte Streptokokken, deren grüne Fluoreszenz zusätzlich noch durch die hohe Hintergrundfluoreszenz der HEp-2-Zellen überlagert wurde (siehe Abbildung 14d). Die adhärennten Streptokokken konnten durch eine zusätzliche Antikörperfärbung sichtbar gemacht werden.

Da die Färbung mit den SYTO 13 bereits in niedrigen Konzentrationen von 5 μ M einen negativen Einfluss auf das Invasionsverhalten aufwies, wurden Anfärbungen mit der vom Hersteller angegebenen Höchstkonzentration (20 μ M) nicht durchgeführt.

Hoechst 33258

Der blau fluoreszierende Hoechst-Farbstoff 33258 interkaliert mit der zellulären DNA und färbt diese an (Produktbeschreibung der Farbstoffe Hoechst vom Hersteller Molecular Probes™). Die Ergebnisse der Anfärbung von *S. pyogenes* mit Hoechst 33258 (siehe Abbildung 13) zeigten besonders im unteren Kurvenverlauf keine zufrieden stellende Unterscheidungsmöglichkeit der gemessenen Fluoreszenz.

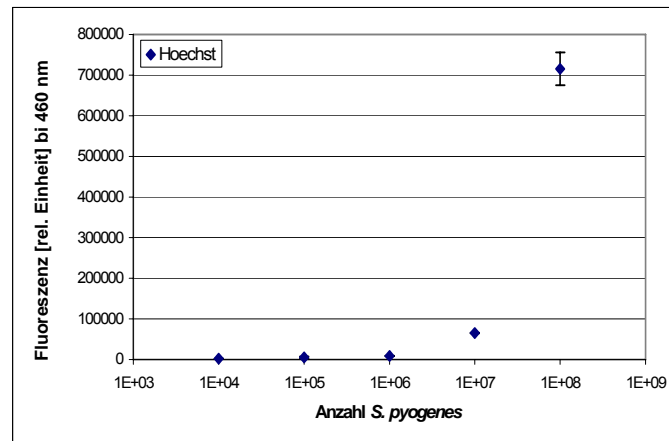


Abbildung 13: Färbung von *S. pyogenes* A20 mit Hoechst 33258 (5 µg/ml Hoechst in PBS, 30minütige Inkubation bei 37 °C). Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz (Mittelwert ± Standardabweichung) in Abhängigkeit der Anzahl Streptokokken eines repräsentativen Experiments.

Infektionsversuche mit Hoechst-gelabelten *S. pyogenes* zeigten eine gute Färbung der Streptokokken (siehe Abbildung 14e). Nach einer zusätzlichen Antikörperfärbung der adhären Streptokokken wurde allerdings deutlich, dass die Hoechst-Färbung nur unvollständig war (siehe Vergleich Abbildung 14e und 14f). Weiterhin konnten nach der differentiellen Anfärbung der adhären Bakterien keine internalisierten Streptokokken mehr lokalisiert werden.

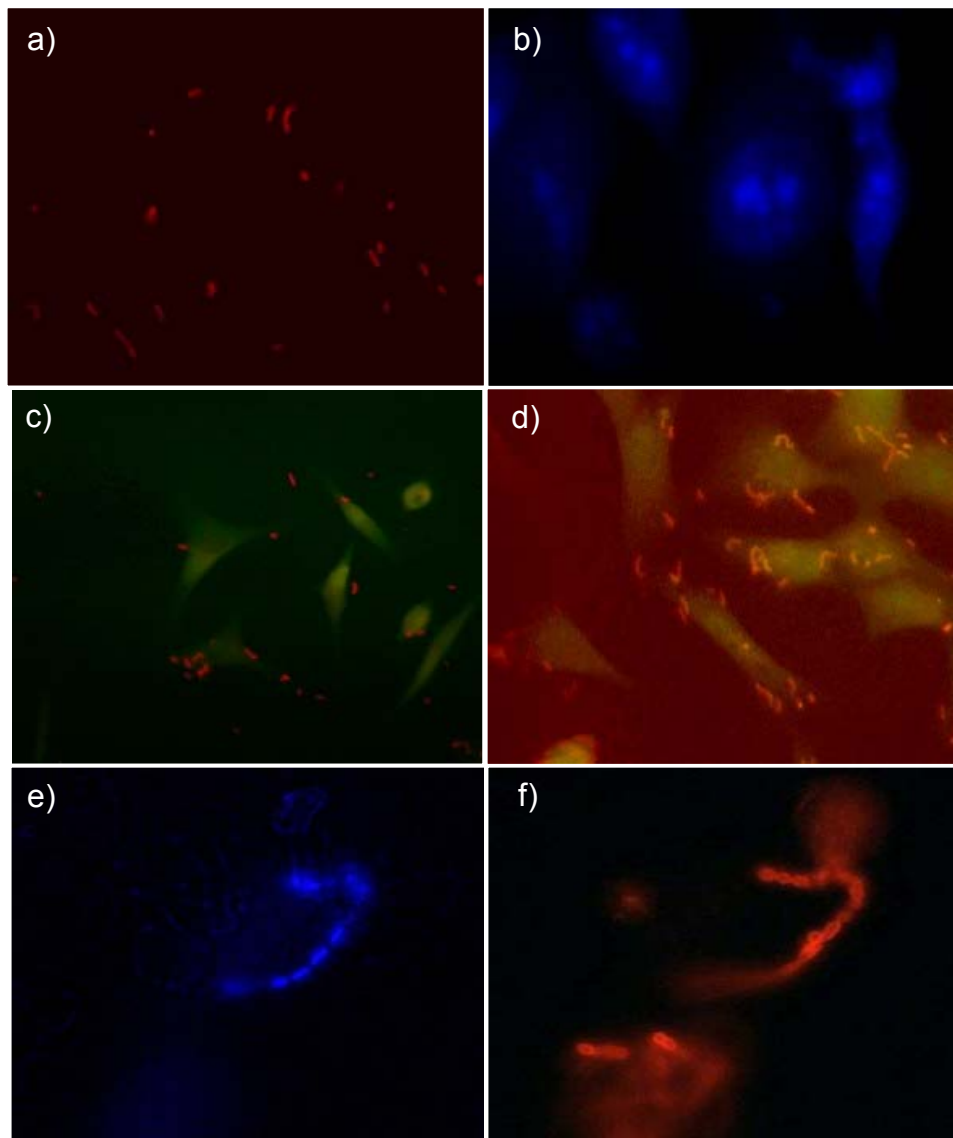


Abbildung 14: Internalisierungs-Assay nach dem Standardprotokoll mit HEp-2-Zellen und *S. pyogenes* A20:

a) CMAC-gelabelte *S. pyogenes*, adhärenente GAS wurden durch eine Antikörperfärbung sichtbar gemacht; b) CMAC-gelabelte *S. pyogenes*, im blauen Filter nur die Autofluoreszenz der HEp-2-Zellen sichtbar; c) CMFDA-gelabelte *S. pyogenes*, adhärenente GAS wurden durch eine Antikörperfärbung sichtbar gemacht; d) SYTO 13-gelabelte *S. pyogenes*, adhärenente GAS wurden durch eine Antikörperfärbung sichtbar gemacht; e) Hoechst 33258-gelabelte *S. pyogenes*, f) wie e), adhärenente GAS wurden durch eine Antikörperfärbung sichtbar gemacht, Foto zeigt die gleiche Stelle wie e); weitere Erläuterungen im Text.

FITC-Biotin-Avidin-Färbung

Bei der FITC-Biotin-Avidin-Färbung (nach (Agerer *et al.* 2004), modifiziert) werden die Bakterien zuerst mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), dann mit Biotin gelabelt. Um später bei den biologischen Tests eine Unterscheidung zwischen adhärenenten und

internalisierten Bakterien machen zu können, sollen die adhärenenten Bakterien am Ende des Versuches mit AlexaFluor®647-konjugiertem Streptavidin markiert werden. Die beiden Färbeschritte wurden getrennt durchgeführt um ihre jeweilig Eignung in den später durchgeführten biologischen Tests zu untersuchen. Bei der Markierung der GAS mit FITC wurde erst bei einer Konzentration von 200 µg/ml ein akzeptabler Kurvenverlauf erreicht (siehe Abbildung 15). Die Markierung der Streptokokken mit Biotin und Streptavidin-AlexaFluor®647 zeigte eine im Vergleich zur Fluorescein-Markierung sehr geringe Fluoreszenz, sogar bei hohen Zellzahlen. Dies würde beim Einsatz von stark inhibitorischen Peptiden in den biologischen Tests zu Schwierigkeiten bei der Detektion sehr geringer Zellzahlen führen.

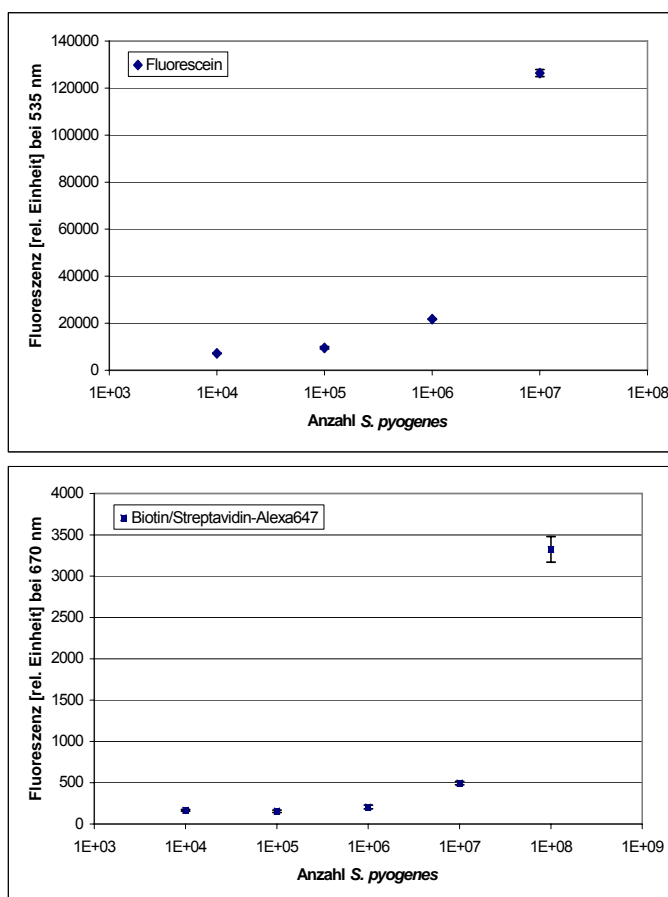


Abbildung 15: Färbung von *S. pyogenes* A20 mit Fluorescein bzw. mit Biotin und Streptavidin-AlexaFluor®647

(Fluorescein: 200 µg/ml Fluoresceinisothiocyanat, 60minütige Inkubation bei 4 °C; Biotin: 0,5 mg/ml in PBS; 30minütige Inkubation bei 4 °C; Streptavidin-AlexaFluor®647: 20 µg/ml in PBS, 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur). Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz (Mittelwert ± Standardabweichung) in Abhängigkeit der Anzahl Streptokokken eines repräsentativen Experiments.

Fluorescein + α -Fluorescein-Antikörper

Streptococcus pyogenes A20 wurde zunächst wie bereits beschrieben mit FITC gelabelt (siehe Abbildung 16). Um später bei den biologischen Tests zwischen adhärennten und internalisierten Bakterien unterscheiden zu können, sollten die adhärennten Bakterien dann am Ende des Versuches mit einem rot fluoreszierenden α -Fluorescein-Antikörper markiert werden. Der in Abbildung 16 dargestellte Kurvenverlauf zeigte die gewünschte Linearität im dargestellten Zellzahlbereich.

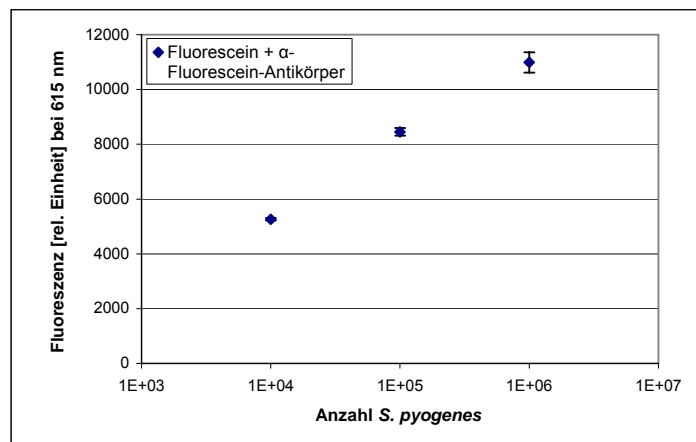


Abbildung 16: Färbung von *S. pyogenes* A20 mit Fluorescein und α -Fluorescein-Antikörper (Fluorescein: 200 μ g/ml Fluoresceinisothiocyanat, 60minütige Inkubation bei 4 °C; α -Fluorescein-Antikörper: 100 μ g/ml in PBS, 2stündige Inkubation bei Raumtemperatur). Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz (Mittelwert \pm Standardabweichung) in Abhängigkeit der Anzahl Streptokokken eines repräsentativen Experiments.

Internalisierungsversuche mit Fluorescein-gelabelten *S. pyogenes* zeigten allerdings, dass die Menge des eingesetzten Fluoresceinisothiocyanats einen negativen Einfluss auf das Internalisierungsverhalten der GAS hatte. Die bei Auszählungen ermittelte Invasionsrate sank im Vergleich zur Kontrolle um 49 % (siehe Abbildung 17).

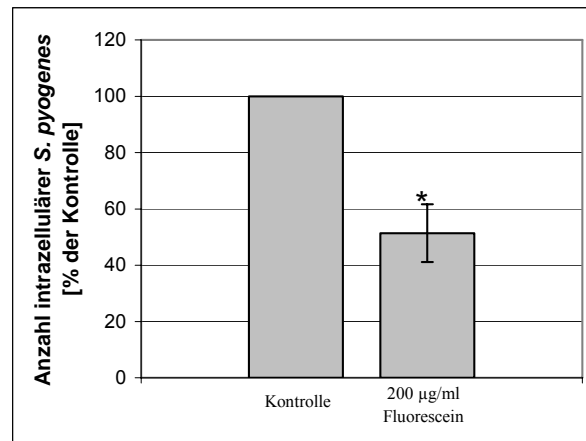


Abbildung 17: Quantitative Analyse der *S. pyogenes* A20-Internalisierung nach der Markierung der Streptokokken mit 200 µg/ml Fluoresceinisothiocyanat. Dargestellt ist die prozentuale Anzahl intrazellulärer Bakterien bezogen auf die Kontrolle (Mittelwert ± Standardabweichung, n = 2 Experimente). Ein signifikanter Unterschied ist mit einem Stern markiert (t-Test * $p < 0,05$).

Antikörperfärbung im Eppendorf-Gefäß

Bei der Antikörperfärbung wurden die GAS zuerst mit einem primären α -*S. pyogenes*-Antikörper, dann mit einem fluoreszierenden sekundären Antikörper markiert. Dabei wurden sowohl ein grün fluoreszierender (AlexaFluor®488) als auch ein rot fluoreszierender (AlexaFluor®568) sekundärer Antikörper eingesetzt. Mit dieser Färbemethode sollten die Streptokokken nach einem Internalisierungsversuch differentiell angefärbt werden.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, zeigten beide Kurven im unteren Zellzahlbereich einen nicht erwünschten Plateauverlauf.

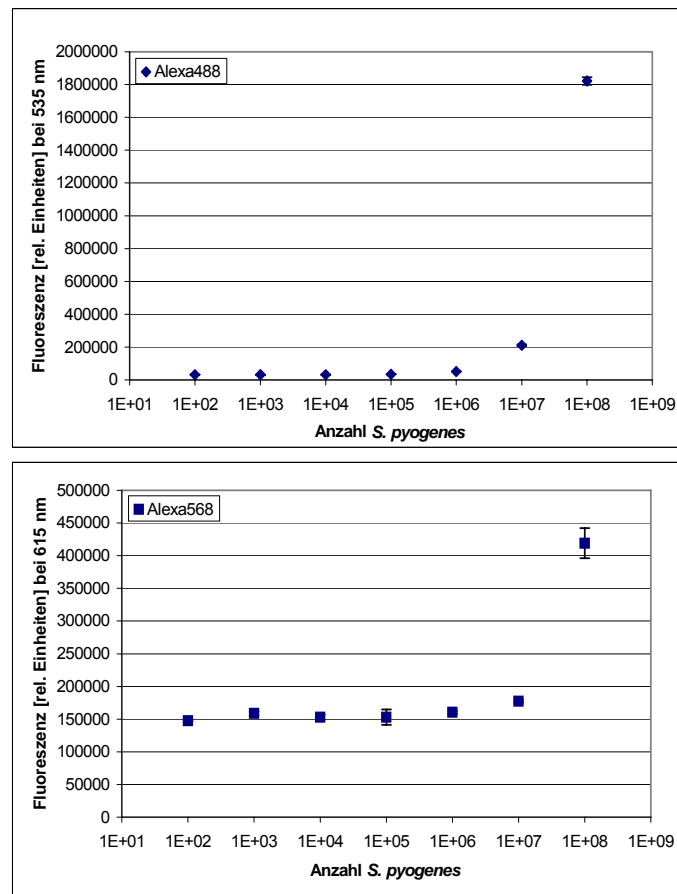


Abbildung 18: Antikörperfärbung von *S. pyogenes* A20 mit Antikörper im Eppendorf-Gefäß Primärer (1:100 in 1 % FCS/PBS, 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur) und fluoreszierender sekundärer Antikörper AlexaFluor®488 (1:200 in 1 % FCS/PBS, 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur) bzw. AlexaFluor®568 (1:300 in 1 % FCS/PBS, 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur). Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz (Mittelwert \pm Standardabweichung) in Abhängigkeit der Anzahl Streptokokken eines repräsentativen Experiments.

Antikörperfärbung in Mikrotiterplatte

Die Antikörperfärbung von *S. pyogenes* in der Mikrotiterplatte zeigte im Vergleich zur Anfärbung im Eppendorf-Gefäß eine deutliche Verbesserung. Der Kurvenverlauf des rot fluoreszierenden Antikörpers (AlexaFluor®568) zeigte allerdings bei niedrigen Zellzahlen einen nicht erklärbaren Anstieg der Fluoreszenz (siehe Abbildung 19). Aus diesem Grunde wurde die Anfärbung der Streptokokken mit AlexaFluor®568 verworfen und nur eine Kalibrationskurve mit dem grün fluoreszierenden AlexaFluor®488 erstellt (siehe Kapitel 4.4.2)

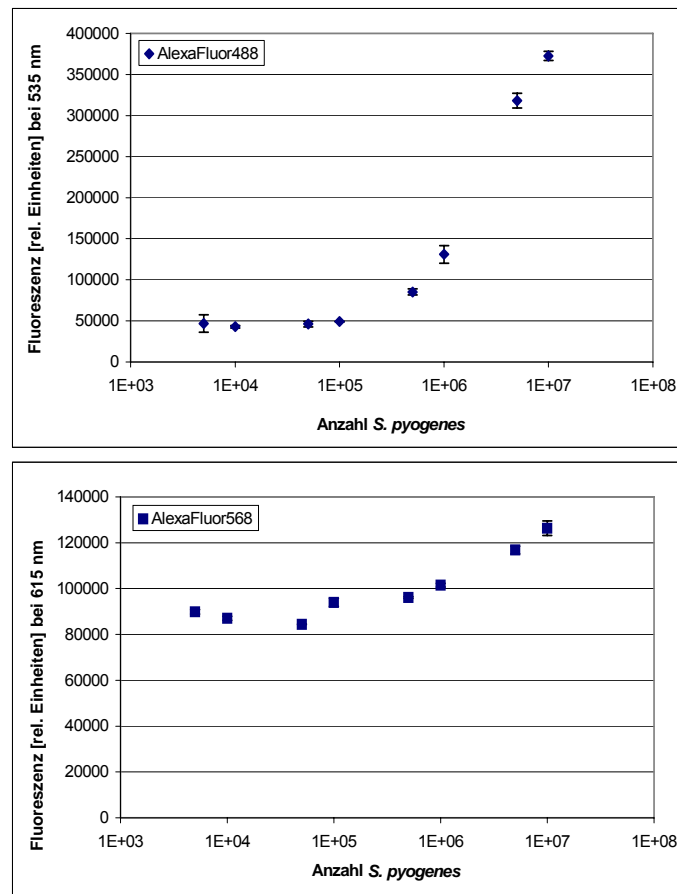


Abbildung 19: Antikörperfärbung von *S. pyogenes* A20 mit Antikörper in der Mikrotiterplatte Primärer (1:100 in 1 % FCS/PBS, 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur) und fluoreszierender sekundärer Antikörper AlexaFluor®488 (1:200 in 1 % FCS/PBS, 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur) bzw. AlexaFluor®568 (1:300 in 1 % FCS/PBS, 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur). Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz (Mittelwert \pm Standardabweichung) in Abhängigkeit der Anzahl Streptokokken eines repräsentativen Experiments.

4.4.2 Erstellung der Kalibrationskurve

Die für die Internalisierungsversuche benötigte Kalibrationskurve wurde mittels der oben beschriebenen Antikörperfärbung der Streptokokken erstellt. Nach der Berechnung des Bakterienverlusts bei der Erstellung der Kalibrationskurve ergaben sich die im Folgenden dargestellten Kurven (siehe Abbildung 20) für *S. pyogenes* A20 und A8.

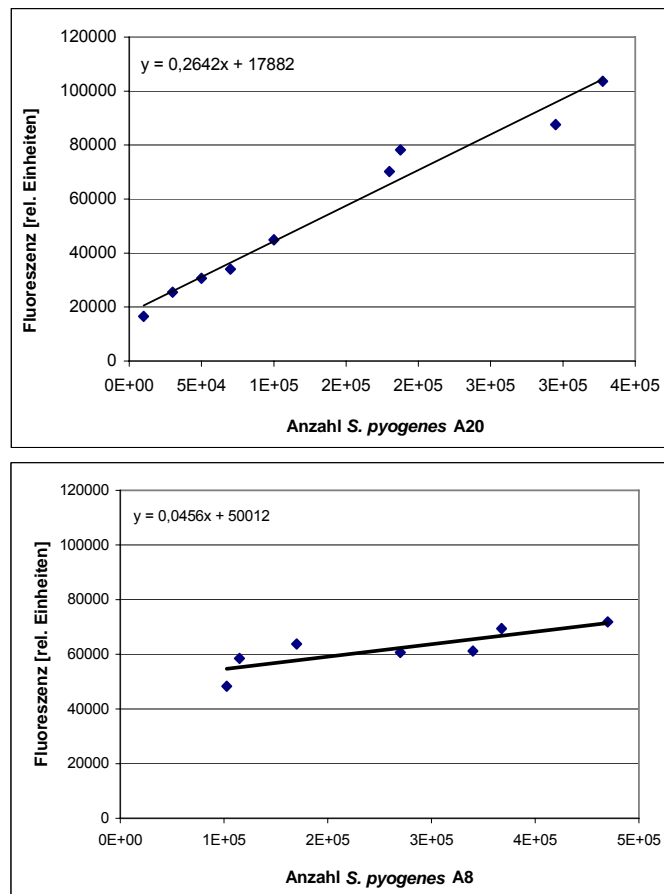


Abbildung 20: Antikörperfärbung von *S. pyogenes* A20 (oben) bzw. *S. pyogenes* A8 (unten) Primärer (1:100 in 1 % FCS/PBS, 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur) und fluoreszierender sekundärer Antikörper AlexaFluor®488 (1:200 in 1 % FCS/PBS, 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur). Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit der Anzahl Streptokokken sowie die Gleichung der eingezeichneten Regressionsgerade.

Die in Abbildung 20 dargestellten Gleichungen beschreiben die jeweiligen Eigenschaften der Kurven. Über das Auflösen der Gleichungen nach x erhält man bei der Auswertung der biologischen Tests die Anzahl der Streptokokken.

4.5 Test der Peptide

Zusätzlich zu den während dieser Arbeit synthetisierten Peptiden wurden zwei weitere Peptide in den biologischen Test näher untersucht. Dabei handelte es sich um das so genannte T37Y und das 31mer; beide stellen Varianten des 49mers dar, die während einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Chemische Biologie synthetisiert worden

waren (Hahn 2002). Die Sequenzen beider Peptide sind in Tabelle 17 dargestellt. Bei dem Peptid T37Y handelt es sich um eine Sequenzvariante des 49mers; bei der Synthese wurde an Position 37 versehentlich statt eines Threonin ein Tyrosin eingebaut. Da der Effekt des Austausches einer einzelnen Aminosäure hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität interessant erschien, wurde das Peptid T37Y bereits im Rahmen der Diplomarbeit in Internalisierungsassays untersucht. Das Peptid 31mer zeigt eine Möglichkeit der Kürzung des 49mers auf. Die Kriterien für die Streichung bestimmter Aminosäuren waren zum einen, dass die für die Aktivität bekanntermaßen wichtigen Enden nicht beschnitten wurden, zum anderen, dass schwierige Kopplungen während der Synthese vermieden werden sollten. Auch das 31mer wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit auf inhibitorische Aktivitäten untersucht.

Tabelle 17. Sequenzen der Peptide 49mer, T37Y und 31mer

Peptid	Sequenz
49mer	1 11 21 31 41 KDQSPLAGES GETEYITEVY GNQQNPVDID KKLNETGFS GNMVETEDT
T37Y	1 11 21 31 41 KDQSPLAGES GETEYITEVY GNQQNPVDID KKLNEYGFS GNMVETEDT
31mer	1 11 31 41 KDQSPLAGES G.....D KKLNETGFS GNMVETEDT

4.5.1 Adhäsions- und Invasionsassay

Die Fähigkeiten zur Inhibition der Adhäsion bzw. der Internalisierung von *S. pyogenes* an HEp-2-Zellen wurde in zwei getrennten Versuchen getestet. Dabei wurden im Adhäsionsassay die Zahl der adhärenenten, im Invasionsassay die Zahl der internalisierten *S. pyogenes* ermittelt. Dazu wurden die ermittelten Fluoreszenzwerte in die Geradengleichung der Kalibrationskurve eingesetzt und die Anzahl der Streptokokken berechnet.

4.5.1.1 Lineare Peptide

Neben den Peptidbibliotheken wurden weitere, lineare Peptide aus L-Aminosäuren im Adhäsions- bzw. Invasionsassay getestet. Während für das 49mer bereits Inhibitionsdaten bezüglich der Adhäsion/Invasion von verschiedenen SfbI-exprimierenden Streptokokken-Stämmen vorlagen (Hahn 2002), wurden alle anderen Peptide erstmalig mit dieser Fragestellung getestet.

49mer und T37Y

In Vorarbeiten (Hahn 2002) konnte gezeigt werden, dass das 49mer nicht nur die Bindung von Fibronectin an *S. gordonii* SGO30, sondern auch dessen Adhäsion an Hep-2-Zellen im mikromolaren Bereich inhibiert. Die Variante T37Y des 49mers, bei der an Position 37 statt eines Threonins ein Tyrosin integriert wurde, zeigte im Fibronectin-Bindungsassay eine 100fach geringere Aktivität als das native 49mer.

Die Untersuchung der beiden Peptide im Adhäsions- bzw. Invasionsassay machte deutlich, dass beide in der Lage sind, sowohl die Adhäsion als auch die Invasion von GAS A20 konzentrationsabhängig zu inhibieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Durch den Einsatz des 49mer mit einer Konzentration von 10 μM konnte die Adhäsion der GAS um 31 %, durch den Einsatz des T37Y um 45 % reduziert werden. Ein signifikanter Unterschied der inhibitorischen Aktivität der beiden Peptide konnte nicht festgestellt werden. Auch im Invasionsassay zeigten beide Peptide eine konzentrationsabhängige Inhibition der Internalisierung von GAS A20. Die höchste Inhibition konnte bei einer Peptidkonzentration von 10 μM erzielt werden. Hier lag die Anzahl der internalisierten GAS bei 38 % (49mer) bzw. 50 % (T37Y) im Vergleich zur Kontrolle. Für beide Peptide konnte nur im Invasionsassay ein IC_{50} -Wert ermittelt werden; er lag für das 49mer bei 0,435 μM , für das T37Y bei 0,368 μM . Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied in der Inhibitionsaktivität der beiden Peptide festgestellt werden.

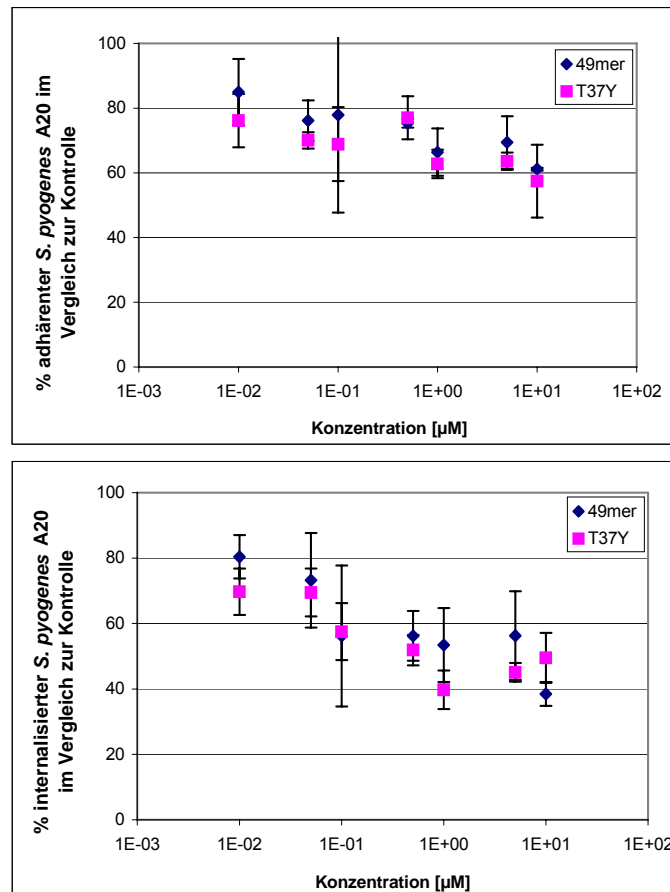


Abbildung 21: Untersuchung der Peptide 49mer und T37Y in verschiedenen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay. Dargestellt sind im oberen Diagramm die adhärenenten, im unteren Diagramm die internalisierten *S. pyogenes* A20 im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert (\pm Standardabweichung) jeweils eines repräsentativen Experimentes.

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse der Assays in den Mikrotiterplatten wurde zusätzlich die Aktivität des 49mers in Infektionsversuchen getestet, die nach differentieller Fluoreszenzfärbung der GAS unter dem Mikroskop ausgezählt wurden. Wie in Abbildung 22 dargestellt, konnten zwischen den beiden Untersuchungsmethoden keine signifikanten Unterschiede in den erhaltenen Ergebnissen festgestellt werden. Die Tatsache, dass die bei der Auszählung erhaltenen Werte höher liegen als beim Assay in der Mikrotiterplatte, ist durch eine unterschiedliche Infektionsrate in beiden Ansätzen zu erklären.

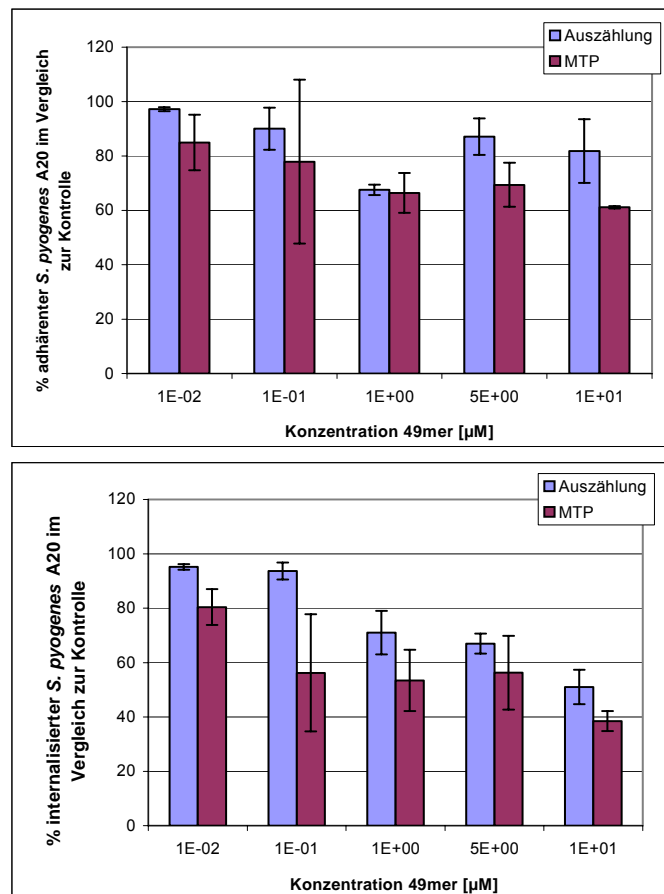


Abbildung 22: Vergleich der Ergebnisse der inhibitorischen Aktivität des 49mers. Verglichen wurden die Ergebnisse von Auszählung (n = 50 Zellen) und Assay in einer 96-well-Mikrotiterplatte (MTP). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung.

Ausgehend von der Annahme, dass die Peptide 49mer und T37Y die spezifisch SfbI-vermittelte Internalisierung inhibieren, wurde der SfbI-negative GAS-Stamm A8 in weiteren Internalisierungsversuchen eingesetzt. Durch das Fehlen des SfbI-Proteins sollte hier keine Inhibition der Adhäsion bzw. der Internalisierung auftreten. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 23 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass sowohl das 49mer als auch das T37Y in der Lage waren, die Adhäsion bzw. die Invasion von GAS A8 deutlich zu inhibieren. Signifikante Unterschiede in der Inhibitionsaktivität gegenüber GAS A20 sind mit einem Stern gekennzeichnet.

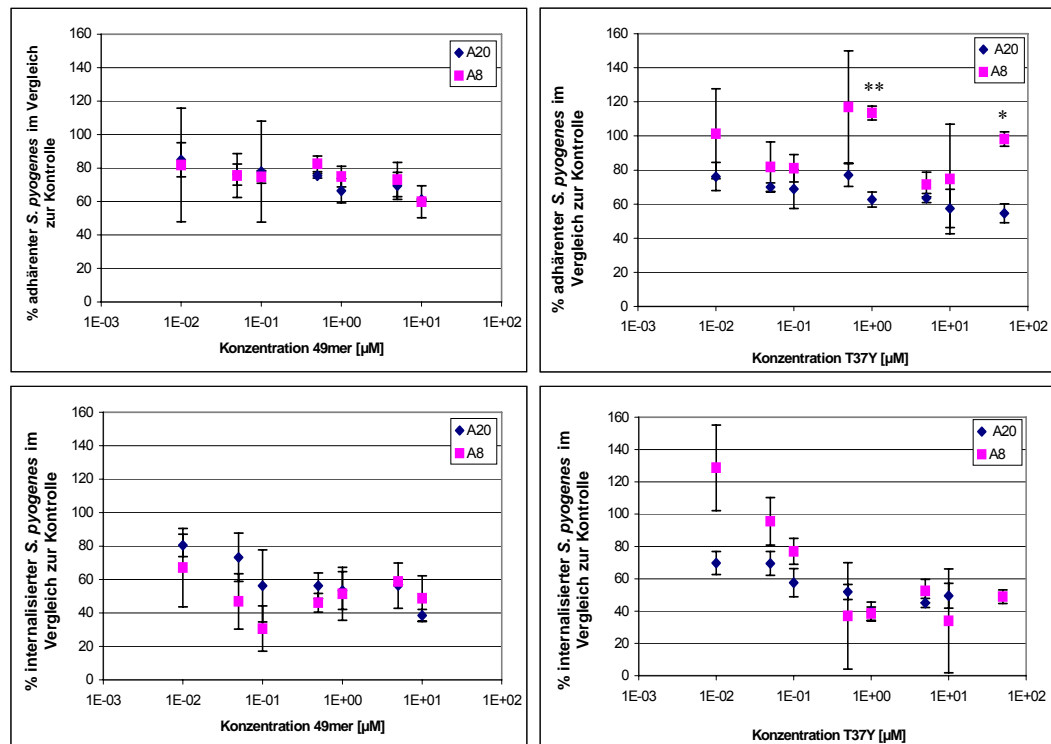


Abbildung 23: Untersuchung der Peptide 49mer (links) und T37Y (rechts) in verschiedenen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay mit GAS A20 und A8.

Dargestellt sind im oberen Diagramm die adhärenenten, im unteren Diagramm die internalisierten *S. pyogenes* im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert (\pm Standardabweichung) jeweils eines repräsentativen Experimentes. Ein signifikanter Unterschied ist mit einem Stern markiert (t-Test, * $< 0,05$; ** $p < 0,005$).

31mer

Wie bereits beschrieben, stellt das 31mer eine verkürzte Variante des 49mers dar. Während die für die Aktivität wichtigen Enden des Peptids nicht beschnitten wurden, wurden innerhalb des Peptides als schwierige Kopplungen bei der Synthese prognostizierte Aminosäuren herausgekürzt. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass das 31mer in einem Kompetitionsassay, in dem es mit dem ^{125}I markierten 70 kDa-Fragment des Fibronectin um die SfbI-vermittelte Bindung an den rekombinanten *Streptococcus gordonii* Stamm SGO30 konkurrierte, keine inhibitorischen Aktivitäten zeigte. Im Vergleich dazu konnte unmarkiertes Fibronectin die Bindung mit einem IC_{50} -Wert von $0,3 \mu\text{M}$ inhibieren (Hahn 2002).

In dieser Arbeit wurde nun die inhibitorische Aktivität des 31mers in unterschiedlichen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

Im Adhäsionsassay war bei einer Konzentration von 5 μM eine Reduzierung der adhärenen GAS auf 67 % im Vergleich zur Kontrolle festzustellen, die mit abnehmender Peptidkonzentration wie erwartet schwächer wurde. Allerdings zeigten die Messwerte ab einer Konzentration von 0,1 μM einen deutlichen Anstieg der Inhibition; diese lag hier bei 56 %. Eine Erklärung für diesen Effekt konnte nicht gefunden werden. Mit abnehmender Peptidkonzentration stieg die Anzahl der adhärenen GAS zwar wieder, aber im Rahmen dieser Untersuchung konnte kein vollständiger Verlust der inhibitorischen Aktivität erreicht werden.

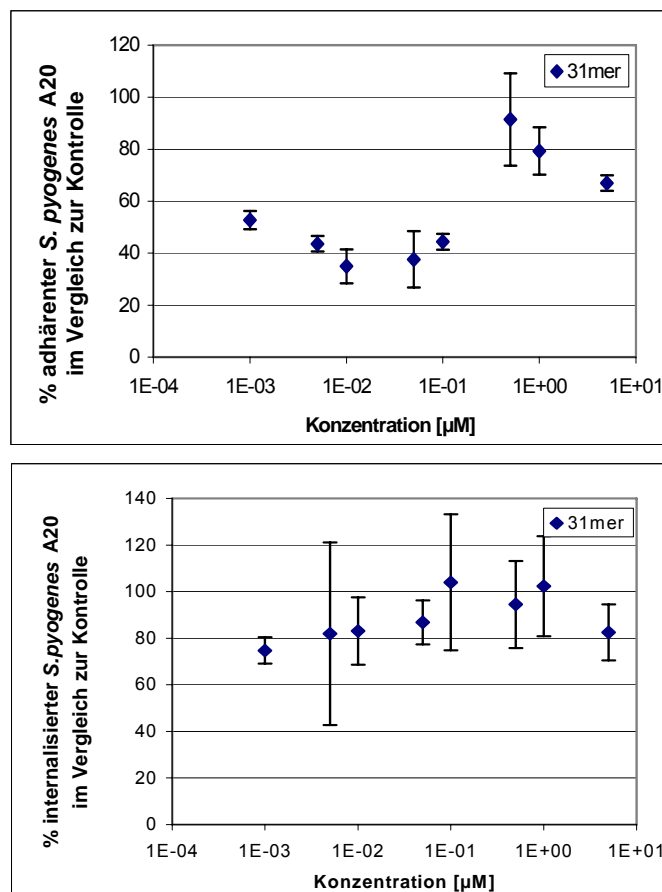


Abbildung 24: Untersuchung des Peptides 31mer in verschiedenen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay.

Dargestellt sind im oberen Diagramm die adhärenen, im unteren Diagramm die internalisierten *S. pyogenes* A20 im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert (\pm Standardabweichung) jeweils eines repräsentativen Experimentes.

Der Kurvenverlauf im Invasionsassay (siehe Abbildung 24) macht deutlich, dass auf Grund der vorliegenden Daten nicht von einer inhibitorischen Aktivität ausgegangen werden kann. Eine Erklärung für den dargestellten Kurvenverlauf und der auftretenden hohen Streuung der Messwerte konnte nicht gefunden werden.

DMBT1pbs1

Das Glykoprotein DMBT1 (deleted in malignant brain tumors 1) gehört zur Gruppe B der Familie der *Scavenger Receptor Cysteine-Rich-* (SRCR-) Proteine und wird von mucosalen Epithelien, Drüsen und Immunzellen exprimiert. Es wird vermutet, dass es in die epitheliale Differenzierung und die angeborene Immunabwehr mukosaler Oberflächen involviert ist (Müller *et al.* 2005). Neben seinen Funktionen in der Aktivierung des Komplementsystems und der Chemokinese von alveolären Makrophagen interagiert es auch mit Viren wie HIV oder Influenza A Virus (Müller *et al.* 2005) und human-pathogenen Bakterien wie *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* und *Helicobacter pylori* (Bikker *et al.* 2004). Bikker *et al.* (2004) konnten die minimale Bakterienbindungsstelle des DMBT1 definieren. Das aus 11 Aminosäuren bestehende Motiv DMBT1pbs1 konnte sowohl Gram-positive (*S. mutans*, *S. gordonii*) als auch Gram-negative (*E. coli*, *H. pylori*) binden und agglutinieren.

Die Untersuchung des Peptids DMBT1pbs1 im Adhäsionsassay zeigte seine Fähigkeit, die Adhäsion von GAS A20 an HEp-2-Zellen zu inhibieren (siehe Abbildung 25). Über ein breites Konzentrationsspektrum (1 μM bis 0,005 μM) konnte die Adhäsion um 50-60 % im Vergleich zur Kontrolle inhibiert werden. Eine konzentrationsabhängige Wirkung des DMBT1pbs1 konnte allerdings nicht festgestellt werden. Im Invasionsassay konnte ebenfalls eine deutliche Inhibition (bis zu 61 %) der Internalisierung festgestellt werden. Diese Inhibition ist wahrscheinlich bedingt durch die ebenfalls reduzierte Adhäsion der Streptokokken.

Wie in Abbildung 25 dargestellt konnte im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen bei abnehmender Peptidkonzentration kein völliger Verlust der inhibitorischen Aktivität erreicht werden. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden.

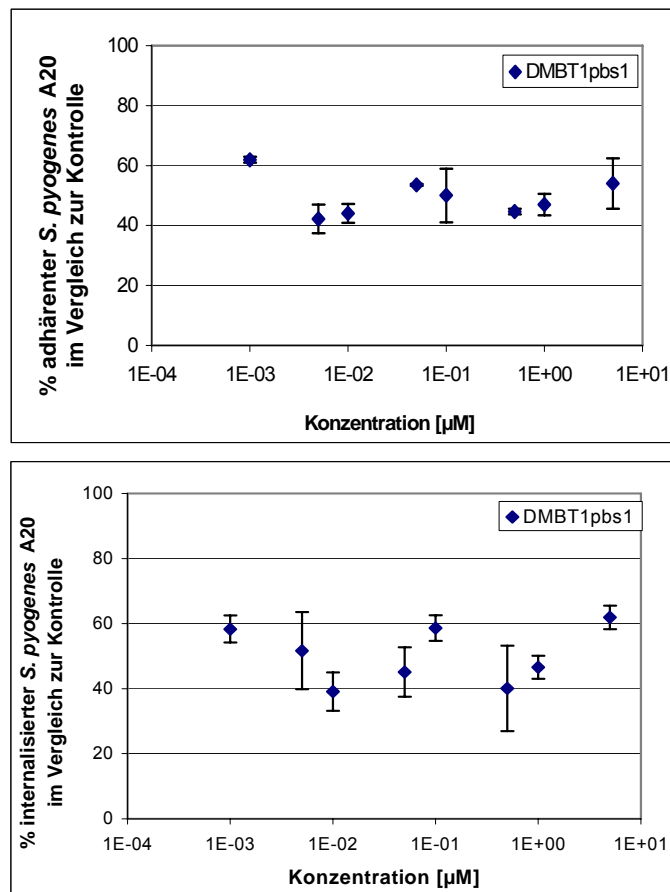


Abbildung 25: Untersuchung des Peptides DMBT1pbs1 in verschiedenen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay.

Dargestellt sind im oberen Diagramm die adhärenenten, im unteren Diagramm die internalisierten *S. pyogenes* A20 im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert (\pm Standardabweichung) jeweils eines repräsentativen Experimentes.

PyOT5

Das Peptid PyOT5 ist Bestandteil des von *S. pyogenes* exprimierten SfbI-Proteins. Es liegt im fünften Fibronectin-bindenden Repeat und umfasst die Positionen 567-591. (Schwarz-Linek *et al.* 2004) konnten zeigen, dass synthetisches PyOT5 eine hohe Affinität gegenüber dem Fibronectin-Modulpaar $^1F1^2F1$ besitzt. Die Dissoziationskonstante (K_d -Wert) für diese Interaktion konnte auf 0,45 μ M festgelegt werden.

Die Ergebnisse des Adhäsionsassays zeigen, dass PyOT5 die Adhäsion von GAS A20 konzentrationsabhängig inhibiert. Bei der höchsten eingesetzten Peptidkonzentration von 5 μ M konnte die Adhäsion um 65 % inhibiert werden (siehe Abbildung 26). Auch

die Internalisierung von *S. pyogenes* konnte durch den Einsatz von PyOT5 reduziert werden; allerdings trat hierbei eine zum Teil sehr hohe Streuung der Messwerte auf. Bei einer Konzentration von 5 μM lag eine Inhibition von 50 % im Vergleich zur Kontrolle vor. Zuverlässige IC_{50} -Werte, d.h. die Konzentration, bei der eine 50%ige Inhibition vorliegt, konnten über die in den Assays eingesetzten Peptidkonzentrationen nicht ermittelt werden. Wie in Abbildung 26 dargestellt konnte auch hier im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen bei abnehmender Peptidkonzentration kein völliger Verlust der inhibitorischen Aktivität erreicht werden.

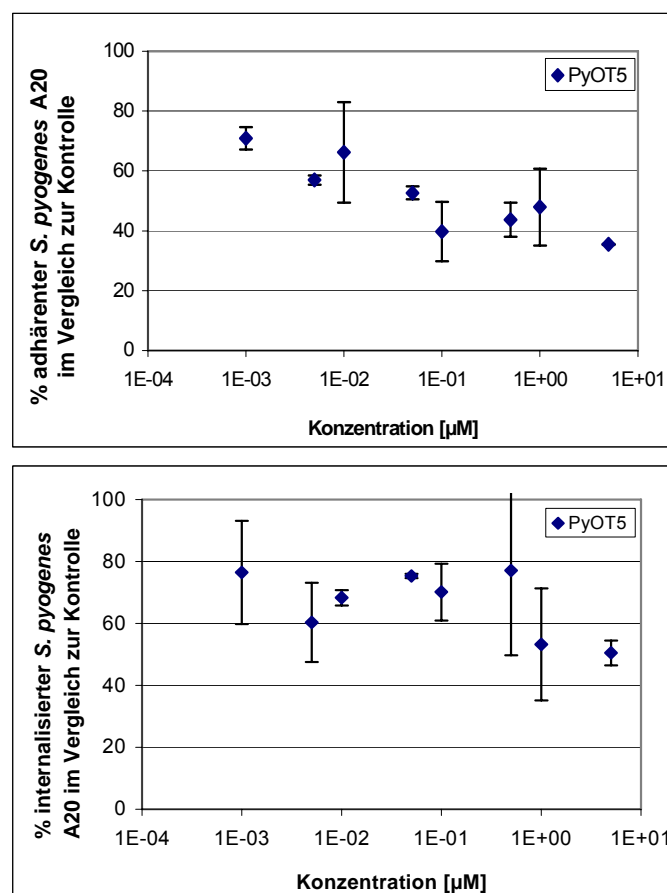


Abbildung 26: Untersuchung des Peptides PyOT5 in verschiedenen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay.

Dargestellt sind im oberen Diagramm die adhärenenten, im unteren Diagramm die internalisierten *S. pyogenes* A20 im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert (\pm Standardabweichung) jeweils eines repräsentativen Experimentes.

4.5.1.2 Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren der Struktur xxx-o₁o₂-xxx-DKP

Die Untersuchung der Bibliothek linearer Peptide auf inhibitorische Aktivitäten wies sowohl im Adhäsions- als auch im Invasionsassay einige Subbibliotheken auf, bei deren Einsatz die Anzahl der Streptokokken im Vergleich zur Kontrolle reduziert wurde. Die Ergebnisse aus dem Adhäsionsassay sind in Abbildung 27, die des Invasionsassays in Abbildung 28 graphisch dargestellt. Aus den beiden Darstellungen wird ersichtlich, dass die inhibitorisch aktiven Peptidgemische keinem bestimmten Muster unterliegen, sondern randomisiert auftreten.

Die höchste inhibitorische Aktivität im Adhäsionsassay erreichte die Subbibliothek xxx-ty-xxx-DKP. Hier konnte die Adhäsion der Streptokokken um 62 % im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden. Auch die Anzahl der internalisierten *S. pyogenes* wurde durch diese Subbibliothek auf 97 % im Vergleich zur Kontrolle verringert. Insgesamt konnte bei 32 der 361 Subbibliotheken eine Reduzierung sowohl der adhärenen als auch der internalisierten Streptokokken festgestellt werden.

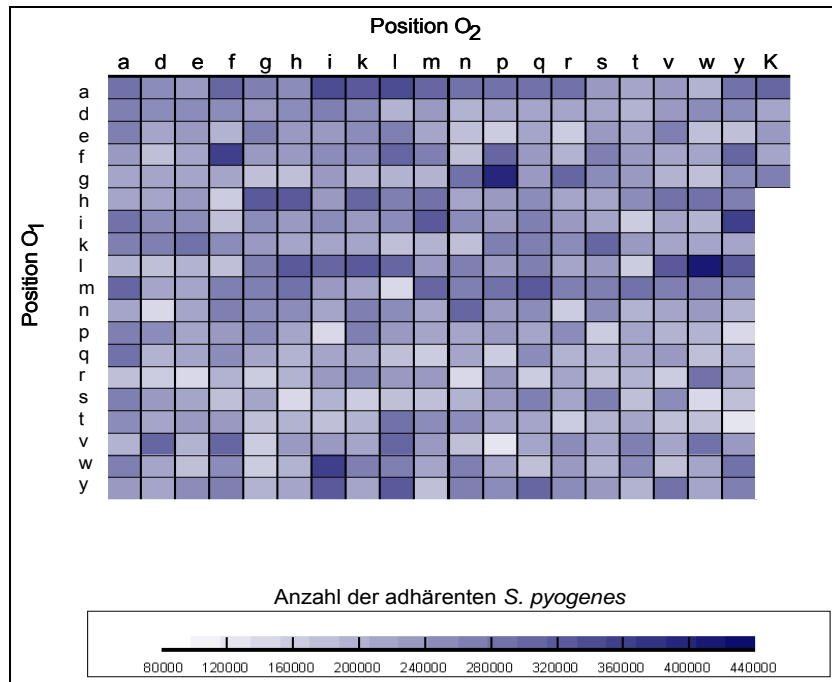


Abbildung 27: Untersuchung Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäure der Struktur xxx-o₁o₂-xxx-DKP im Adhäsionsassay.

Die Peptidgemische wurden in einer Konzentration von ca. 300 µM eingesetzt. K = Kontrolle, d.h. HEp-2-Zellen wurden ohne Peptid, nur mit dem Lösungsmittelgemisch der Bibliothek, vorinkubiert. Dargestellt ist die Anzahl adhärenter *S. pyogenes* A20.

Ein interessanter Effekt trat bei 188 der 361 Subbibliotheken auf. Hier wurde durch den Einsatz der Peptidgemische die Zahl der adhärennten Streptokokken reduziert, während die Zahl der internalisierten Streptokokken jeweils über 100 % im Vergleich zur Kontrolle lag. Bei zwei Subbibliotheken wurde die Anzahl der adhärennten GAS sogar um mehr als 40 % reduziert. Als Beispiel soll die Subbibliothek xxx-**ml**-xxx-DKP genannt werden. Hier lag die Anzahl der adhärennten Streptokokken bei 59 % im Vergleich zur Kontrolle, die Anzahl der internalisierten Streptokokken bei 113 % im Vergleich zur Kontrolle. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wäre, dass diese Subbibliotheken die Internalisierung auf eine nicht geklärte Art beschleunigen. So reduziert sich die Anzahl der adhärennten Streptokokken, während die der internalisierten über den Kontrollwert hinaus ansteigt

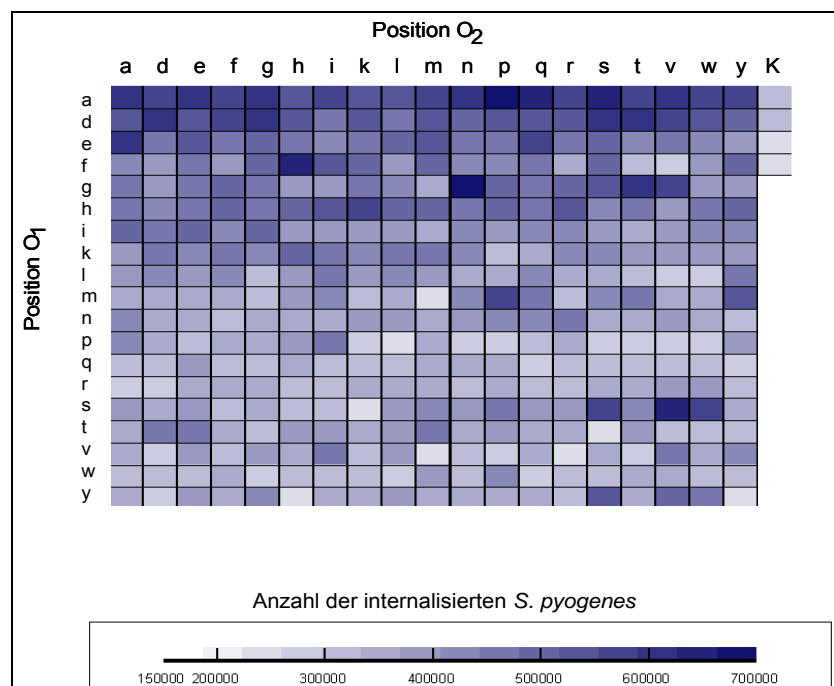


Abbildung 28: Untersuchung der Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren der Struktur xxx-o₁o₂-xxx-DKP im Invasionsassay.

Die Peptidgemische wurden in einer Konzentration von ca. 300 µM eingesetzt. K = Kontrolle, d.h. HEp-2-Zellen wurden ohne Peptid, nur mit dem Lösungsmittelgemisch der Bibliothek, vorinkubiert. Dargestellt ist die Anzahl internalisierter *S. pyogenes* A20.

Ein weiterer beobachteter Effekt war die Tatsache, dass bei dem Einsatz einiger Subbibliotheken zwar die Anzahl der internalisierten Streptokokken um bis zu 28 % im

Vergleich zur Kontrolle reduziert wurden, die Anzahl der adhärennten Streptokokken jedoch über 100 % im Vergleich zur Kontrolle lagen. Als Beispiele der insgesamt 13 Subbibliotheken mit diesem Effekt lassen sich xxx-**mm**-xxx-DKP und xxx-**lv**-xxx-DKP aufführen. Hier lag die Anzahl der adhärennten Streptokokken bei 121 % bzw. 134 % im Vergleich zur Kontrolle, während die Zahl der internalisierten Streptokokken bei 72 % bzw. 85 % im Vergleich zur Kontrolle lag. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Peptidgemische zwar eine gute Adhäsion der Bakterien an die Zelle ermöglichen, die Internalisierung aber auf unbekannte Weise verzögern. Somit würden die Streptokokken auf der Zelloberfläche akkumulieren, was den Anstieg der Anzahl adhärennter GAS über den Kontrollwert hinaus erklären würde.

Bei der Erläuterung der oben dargestellten Ergebnisse der linearen D-Aminosäure-Bibliothek muss gleichzeitig die im Assay auftretende Streuung der Messwerte berücksichtigt werden, die die dargestellten Ergebnisse unter Umständen verzerren kann.

Um zu zeigen, dass die gefundenen inhibitorischen Aktivitäten bestimmter Subbibliotheken konzentrationsabhängig und reproduzierbar sind, wurde die komplette lineare D-Aminosäure-Bibliothek erneut mit einer stark reduzierten Konzentration von durchschnittlich 5 μM im Adhäsions- bzw. Invasionsassay getestet. Entgegen den Erwartungen konnte nur bei 176 Subbibliotheken ein Anstieg der adhärennten, bei 38 Subbibliotheken ein Anstieg der internalisierten GAS festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine mögliche Erklärung liegt in der Vitalität der eingesetzten *S. pyogenes*. Da aus Gründen der praktischen Handhabung eine Mehrfachbestimmung der gesamten Bibliothek in unterschiedlichen Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt nicht möglich war, wurden die Versuche mit den unterschiedlichen Konzentrationen nicht parallel, sondern an verschiedenen Tagen durchgeführt. Somit könnte eine variierende Vitalität der Streptokokken und/oder der HEp-2-Zellen sowie die auftretende Streuung der Messwerte im Assay Grund für dieses Ergebnis sein.

Die Subbibliothek xxx-**ts**-xxx-DKP zeigte bei der o. g. Konzentrationserniedrigung den erwarteten Effekt des Anstiegs der Anzahl adhärennter GAS. Deshalb wurde diese Subbibliothek bezüglich der Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung näher untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Die Anzahl der adhärennten bzw. internalisierten GAS nimmt im Bereich von 300 μM bis 150 μM mit abnehmender

Peptidkonzentration wie erwartet zu. Ab einer eingesetzten Konzentration von 30 μM pendelten die erhaltenen Werte im niedrigen Konzentrationsbereich um die 100 %-Marke. Daraus lässt sich schließen, dass die inhibitorische Fähigkeit der Subbibliothek xxx-ts-xxx-DKP im hohen $\mu\text{molaren}$ Bereich beginnt. Zugleich ist die Inhibierung der Adhäsion in den getesteten Konzentrationen besser als die Inhibierung der Internalisierung.

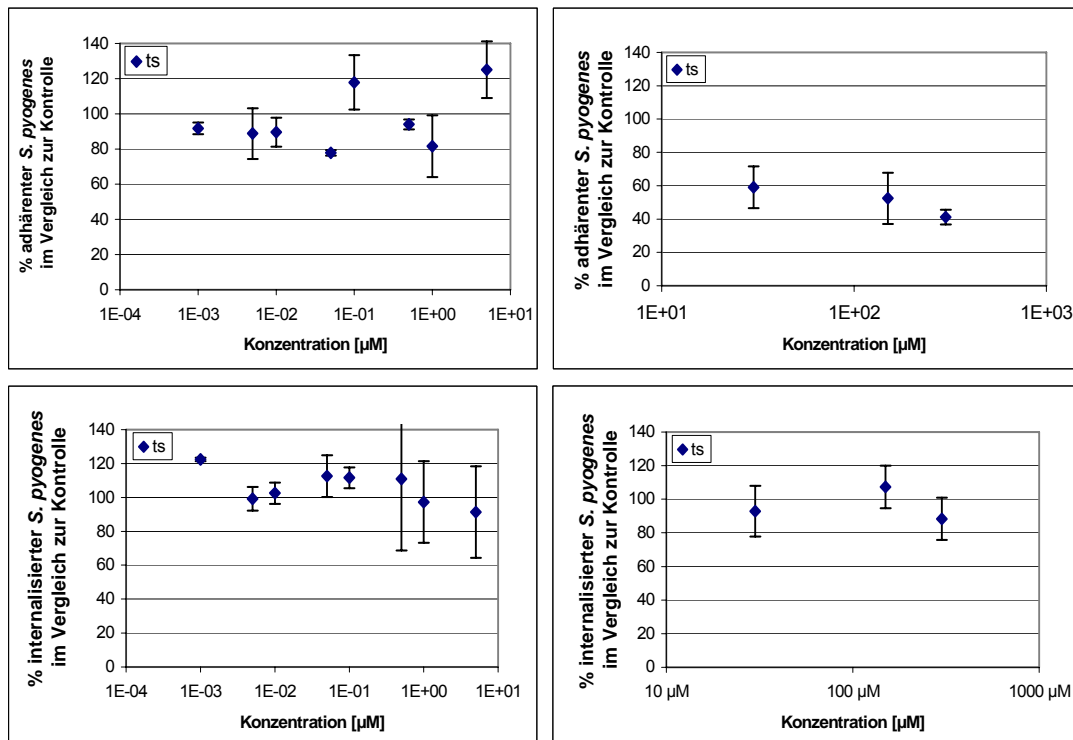


Abbildung 29: Einsatz der Subbibliothek xxx-ts-xxx-DKP in verschiedenen Konzentrationen. Die oberen Diagramme zeigen die Anzahl der adhärenenten Streptokokken, die unteren Diagramme die Anzahl der internalisierten Streptokokken im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert (\pm Standardabweichung) jeweils eines repräsentativen Experimentes.

Die nachsynthetisierten Subbibliotheken mit den definierten Positionen **gr**, **ts**, **tv** und **vm** wurden sowohl im Adhäsions- als auch im Invasionsassay mit den Subbibliotheken der Originalsynthese verglichen (siehe Abbildung 30). Dabei sollte untersucht werden, ob auftretende Effekte durch z. B. Verunreinigungen in der Stammlösung bedingt waren. Die vier Positionen wurden auf Grund ihrer vorhandenen bzw. nicht vorhandenen inhibitorischen Aktivität im Adhäsions- bzw. Invasionsassay ausgewählt.

Die Positionen **ts**, **tv** und **vm** zeigten in den Assays eine Reduzierung der adhärenenten bzw. internalisierten GAS im Vergleich zur Kontrolle, die Position **gr** nicht. Bei einem Einsatz von ca. 300 μM je Peptidgemisch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Synthesen festgestellt werden (t-Test: $p > 0,05$). Somit liegen entweder keine Verunreinigungen der Stammlösungen vor, oder aber beide Synthesen enthalten dieselben Verunreinigungen, wie z.B. Schutzgruppenreste aus der Synthese. Auf eine entsprechende Analytik der Subbibliotheken wurde verzichtet.

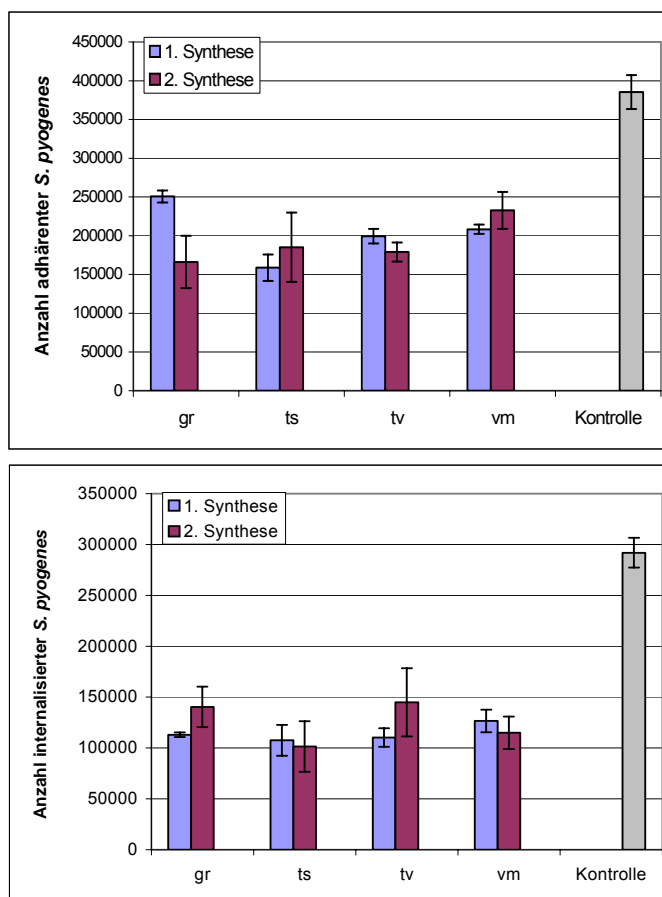


Abbildung 30: Vergleich der Originalsynthese mit der Nachsynthese bestimmter Positionen aus der Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren.

Alle Peptide wurden mit einer Konzentration von ca. 300 μM eingesetzt. Dargestellt ist im oberen Diagramm die Anzahl adhärenenten, im unteren Diagramm die Anzahl internalisierter GAS (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Synthesen festgestellt werden.

4.5.1.3 Zyklische Peptide der Struktur [aa-o₁o₂-aac]zyklo

Die Untersuchung der zyklischen Peptide auf inhibitorische Aktivitäten wies sowohl im Adhäsions- als auch im Invasionsassay einige Peptide auf, bei deren Einsatz die Anzahl der Streptokokken im Vergleich zur Kontrolle reduziert wurde. Die Ergebnisse aus dem Adhäsionsassay sind in Abbildung 31, die des Invasionsassays in Abbildung 32 dargestellt. Aus den beiden Abbildungen wird ersichtlich, dass die inhibitorisch aktiven Peptide keinem bestimmten Muster unterliegen, sondern randomisiert auftreten.

Insgesamt konnte bei 177 der 361 Peptide eine Reduzierung sowohl der adhärenenten als auch der internalisierten Streptokokken festgestellt werden. Die höchsten inhibitorischen Aktivitäten im Adhäsionsassay erreichten die Peptide [aa-**me**-aac]zyklo und [aa-**pn**-aac]zyklo. Hier konnte die Adhäsion der Streptokokken um 48 % bzw. 44 % im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden. Auch die Anzahl der internalisierten *S. pyogenes* wurde durch diese Sequenzen auf 81 % bzw. 71 % im Vergleich zur Kontrolle verringert.

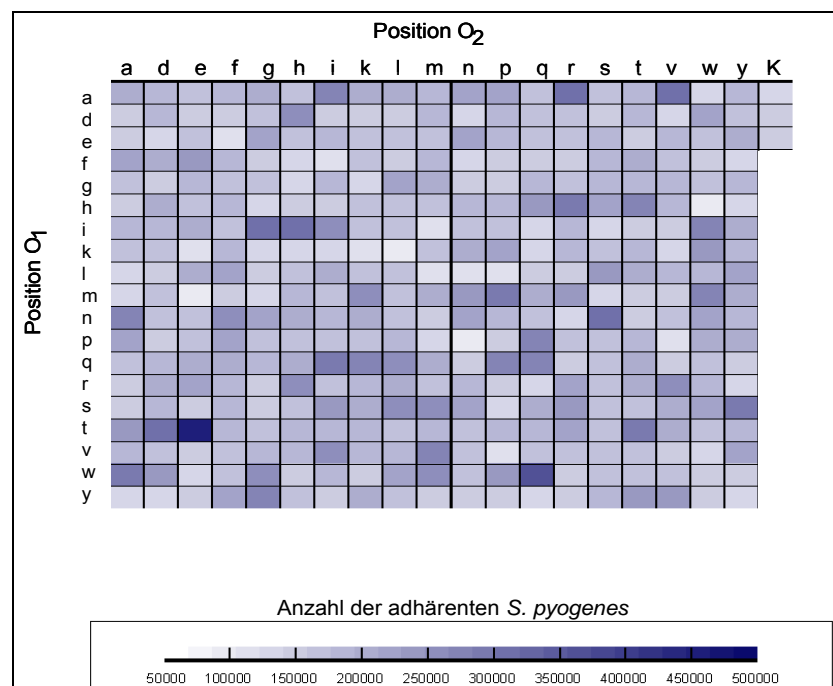


Abbildung 31: Untersuchung der zyklischen Peptide der Struktur [aa-o₁o₂-aac]zyklo im Adhäsionsassay.

Die Peptide wurden in einer Konzentration von ca. 350 µM eingesetzt. K = Kontrolle, d.h. HEp-2-Zellen wurden ohne Peptid, nur mit dem Lösungsmittelgemisch der Bibliothek, vorinkubiert. Dargestellt ist die Anzahl adhärenenten *S. pyogenes* A20.

Bei insgesamt 41 der 361 Peptide wurde die Anzahl der adhärenen *S. pyogenes* reduziert, während die Zahl der internalisierten GAS jeweils über 100 % im Vergleich zur Kontrolle lag. Als Beispiele sollen die Sequenzen [aa-**kk**-aac]zyklo und [aa-**ln**-aac]zyklo genannt werden. Hier lag die Anzahl der adhärenen Streptokokken bei 57 % bzw. 60 %, während die der internalisierten Streptokokken 112 % bzw. 129 % betrug. Wie schon bei der Bibliothek der linearen Peptide wäre ein möglicher Befund, dass diese Peptide die Internalisierung der Streptokokken auf eine bis jetzt nicht geklärte Art beschleunigen. Dies führt zu einer Reduzierung der adhärenen Streptokokken, während die Zahl der internalisierten GAS über den Kontrollwert hinaus ansteigt.

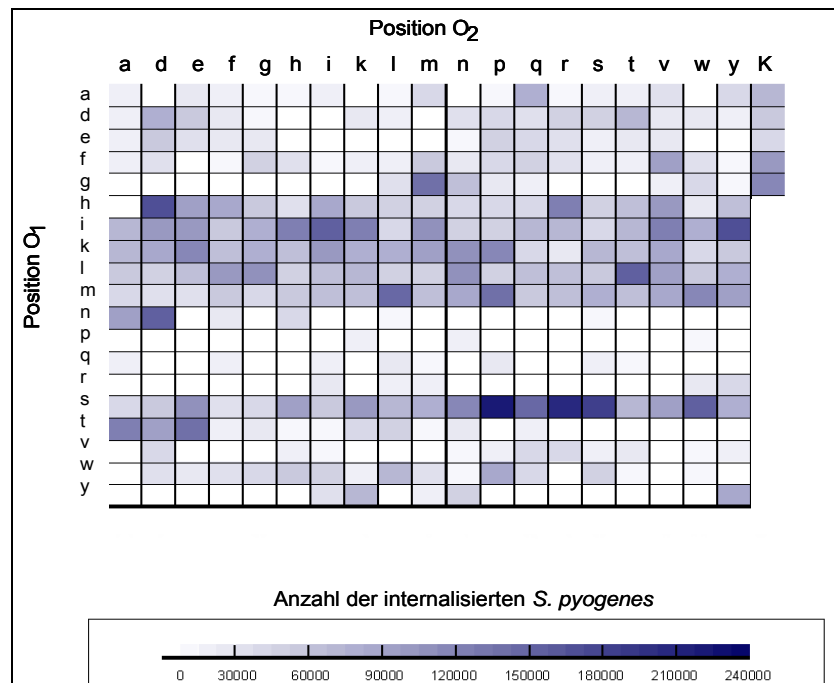


Abbildung 32: Untersuchung der zyklischen Peptide der Struktur [aa-o₁o₂-aac]zyklo im Invasionsassay.

Die Peptide wurden in einer Konzentration von ca. 350 µM eingesetzt. K = Kontrolle, d.h. HEp-2-Zellen wurden ohne Peptid, nur mit dem Lösungsmittelgemisch der Bibliothek, vorinkubiert. Dargestellt ist die Anzahl internalisierter *S. pyogenes* A20.

Bei 96 der 361 Peptide wurde ein anderer Effekt detektiert. Hier wurde die Anzahl der internalisierten Streptokokken um bis zu 64 % reduziert, während die Anzahl der adhärenen Streptokokken jedoch über 100 % im Vergleich zur Kontrolle lagen. Als Beispiele sollen die Sequenzen [aa-**re**-aac]zyklo und [aa-**yt**-aac]zyklo aufgeführt

werden. Hier lag die Anzahl der adhärenen Streptokokken bei 119 % bzw. 133 % im Vergleich zur Kontrolle, während die Zahl der internalisierten GAS bei 43 % bzw. 36 % im Vergleich zur Kontrolle lag. Wie bereits im Abschnitt der Bibliothek aus linearen Peptiden erwähnt, wäre eine mögliche Erklärung hierfür, dass die Peptide zwar eine gute Adhäsion der Bakterien an die Zelle ermöglichen, die Internalisierung aber durch einen nicht geklärten Mechanismus verzögern. Somit würden die Streptokokken auf der Zelloberfläche akkumulieren, was den Anstieg der Anzahl adhärenen GAS über den Kontrollwert hinaus erklären würde.

Bei der Erklärung der oben dargestellten Ergebnisse der zyklischen Peptide muss, wie bereits erläutert, gleichzeitig die im Assay auftretende Streuung der Messwerte berücksichtigt werden, die die dargestellten Ergebnisse unter Umständen verzerren kann.

Um auch hier zu zeigen, dass die gefundenen inhibitorischen Aktivitäten bestimmter Sequenzen konzentrationsabhängig sind, wurden einige inhibitorisch aktive Peptide in verschiedenen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay untersucht. Die Ergebnisse sind exemplarisch an der Sequenz [aa-**ps**-aac]zyklo dargestellt (siehe Abbildung 33). Auffallend bei den Ergebnissen des Adhäsionsassays war, dass bei einer Konzentrationsverringerung von 300 μM auf 150 μM zwar der erwartete Anstieg der Zahl adhärenen *S. pyogenes* auftrat, bei weiterer Reduzierung der Konzentration die Anzahl adhärenen GAS dann aber sank. Erst ab einer Konzentration von 1 μM konnte bei einer weiteren Reduzierung der Konzentration der erwartete Anstieg der Zahl adhärenen Streptokokken festgestellt werden. Dieser Effekt konnte auch durch die Variation der Lösungsmittel (Infektionsmedium bzw. PBS) nicht verringert werden. Eine Erklärung für den unerwarteten Kurvenverlauf konnte nicht gefunden werden.

Die Ergebnisse des Invasionsassays zeigen den zu erwartenden konzentrationsabhängigen Effekt der eingesetzten Sequenz: mit abnehmender Konzentration des Peptides nimmt die Zahl der internalisierten *S. pyogenes* A20 zu.

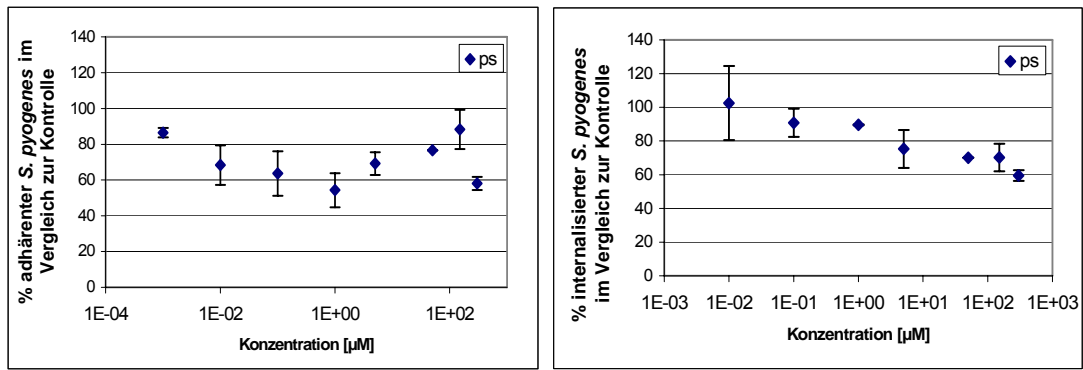


Abbildung 33: Einsatz der Sequenz [aa-ps-aac]zyklo in verschiedenen Konzentrationen. Das linke Diagramm zeigt die Anzahl der adhärenen Streptokokken, das rechte Diagramm die Anzahl der internalisierten Streptokokken im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert (\pm Standardabweichung) jeweils eines repräsentativen Experimentes.

Die nachsynthetisierten Sequenzen mit den definierten Positionen **aa**, **ae**, **hw**, **in**, **iq**, **kq** und **lq** wurden sowohl im Adhäsions- als auch im Invasionsassay mit den entsprechenden Peptiden der Originalsynthese verglichen (siehe Abbildung 34). Bei einem Einsatz von ca. $350 \mu\text{M}$ je Peptid konnte im Adhäsionsassay für die Sequenz [aa-**hw**-aac]zyklo ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Synthesen festgestellt werden. Das Gleiche gilt für die Sequenz [aa-**aa**-aac]zyklo im Invasionsassay. Alle anderen untersuchten Peptide wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Synthesen auf. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Effekte einiger Peptide in eventuellen Verunreinigungen der Stammlösungen begründet lagen.

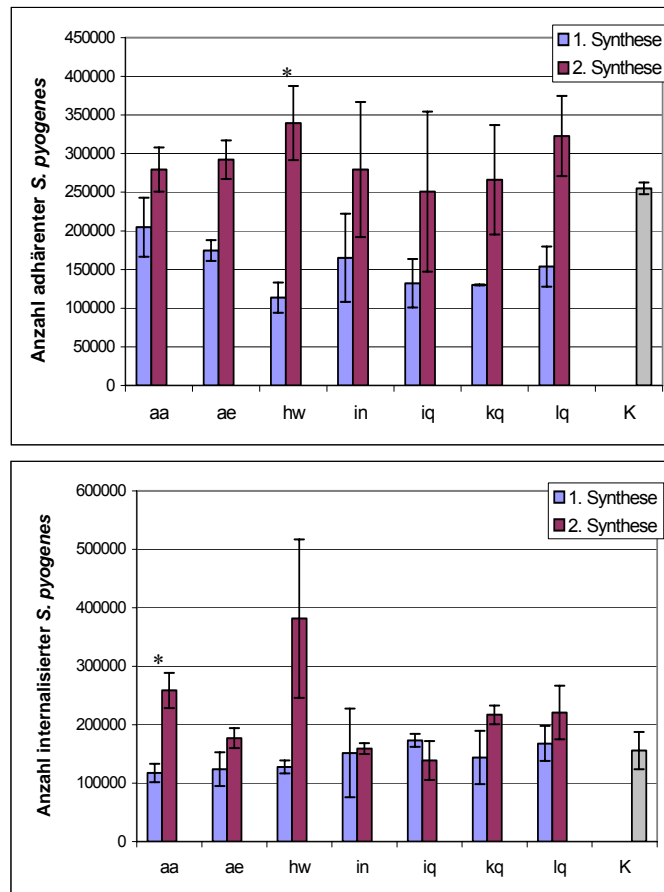


Abbildung 34: Vergleich der Originalsynthese mit der Nachsynthese bestimmter zyklische Peptide.

Alle Peptide wurden mit einer Konzentration von ca. 350 μM eingesetzt. Dargestellt ist im oberen Diagramm die Anzahl adhärenter, im unteren Diagramm die Anzahl internalisierter GAS (Mittelwert \pm Standardabweichung). Ein signifikanter Unterschied ist mit einem Stern markiert (t-Test; * $p < 0,05$).

4.5.2 Test auf Zytotoxizität

Beim Test auf Zytotoxizität nach (Mosmann 1983) wird die Zellvitalität ermittelt. Nach der Zugabe der MTT-Lösung reduzieren mitochondriale Succinatdehydrogenasen das MTT zu violetten Formazankristallen. Diese werden mittels Isopropanol aufgelöst. Die anschließende Absorptionsmessung erlaubt eine Quantifizierung des gebildeten Formazanprodukts und somit eine Quantifizierung der mitochondrialen Aktivität. Da diese Aktivität nur in lebenden Zellen vorhanden ist, lässt die gemessene MTT-Aktivität einen Rückschluss auf die Vitalität der Zellen zu.

Alle Peptide wurden auf einen möglichen zytotoxischen Effekt auf die HEp-2-Zellen getestet, um ausschließen zu können, dass im Adhäsions-/Invasionsassay festgestellte inhibitorische Aktivitäten auf eine mögliche Zytotoxizität der Peptide zurückzuführen sind. Die Konzentration der Peptide entsprach der aus den Adhäsions-/Invasionsassays.

4.5.2.1 Lineare Peptide

Die eingesetzten linearen Peptide zeigten keine signifikante Reduzierung der MTT-Aktivität (siehe Abbildung 35). Allerdings ließ sich mit abnehmender Peptidkonzentration der Peptide PyOT5 und DMBT1pbs1 eine leichte Verschlechterung der MTT-Aktivität feststellen.

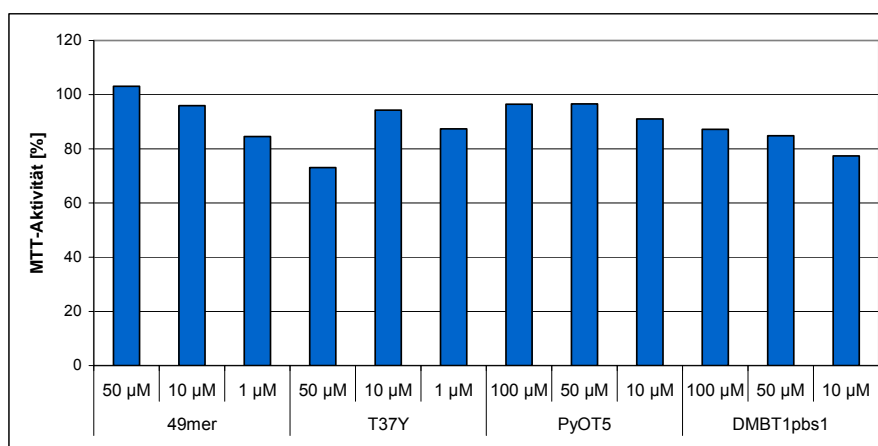


Abbildung 35: Test der linearen Peptide auf einen zytotoxischen Effekt auf die HEp-2-Zellen. Diese wurden vor der Durchführung des Tests 3 h mit den Peptiden in unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubiert. Dargestellt ist MTT-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.

4.5.2.2 Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäure der Struktur xxx-0₁0₂-xxx-DKP

Die Bibliothek linearer Peptide wurde in einer 1:10-Verdünnung, das entspricht einer Durchschnittskonzentration von ca. 300 µmol, eingesetzt. Die gemessene Absorption zeigte keinen deutlich zytotoxischen Effekt auf die HEp-2-Zellen; die geringste ermittelte MTT-Aktivität lag bei 97 % (siehe Abbildung 36). Da bei fast allen Peptidgemischen eine im Vergleich zur Kontrolle höhere MTT-Aktivität vorlag, ist

davon auszugehen, dass inhibitorische Eigenschaften von Peptiden aus dieser Bibliothek nicht auf zytotoxische Effekte zurückzuführen sind.

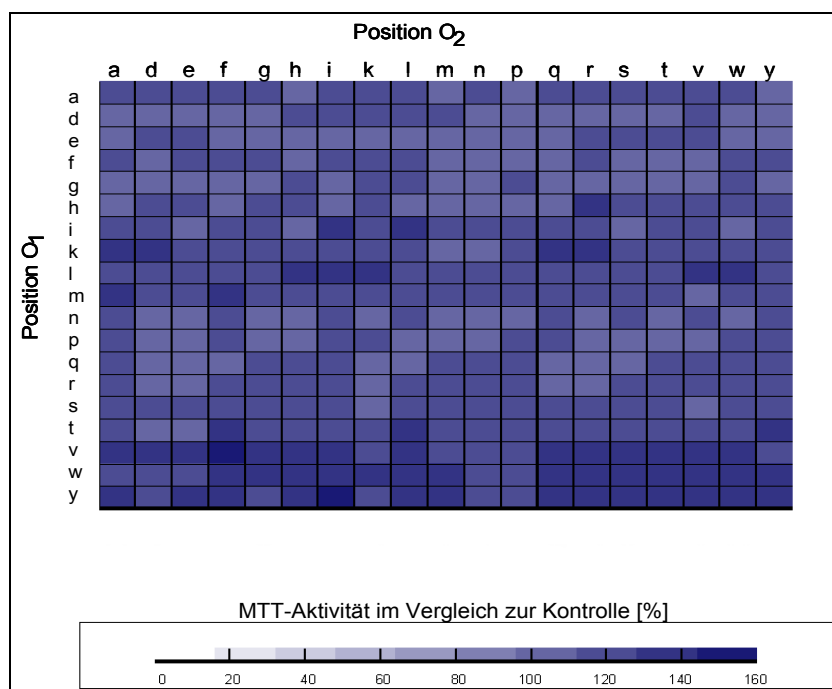


Abbildung 36: Test der Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren der Struktur $\text{xxx-o}_1\text{o}_2\text{-xxx-DKP}$ auf einen zytotoxischen Effekt auf die HEp-2-Zellen. Diese wurden vor der Durchführung des Tests 3 h mit den Peptidgemischen vorinkubiert. Dargestellt ist die MTT-Aktivität als Prozent im Vergleich zur Kontrolle.

Auch eine fünftägige Inkubation der HEp-2-Zellen mit den Peptiden dieser Bibliothek zeigte keine signifikante Erniedrigung der MTT-Aktivität (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.5.2.3 Zyklische Peptide der Struktur $[\text{aa-o}_1\text{o}_2\text{-aac}]$ zyklo

Die zyklischen Peptide wurden in einer 1:10-Verdünnung, das entspricht einer Durchschnittskonzentration von ca. 350 μmol , eingesetzt. Die Ergebnisse des Tests auf Zytotoxizität sind in Abbildung 37 dargestellt. Besondere Auffälligkeit zeigten die Sequenzen mit den definierten Positionen **hw**, **ie**, **in**, **iq**, **kq**, **lq**, **kr** und **wf**. Hier lag die ermittelte MTT-Aktivität unter 50 % im Vergleich zur Kontrolle; diese Peptide zeigten also einen deutlichen, zum Teil signifikanten, zytotoxischen Effekt auf die HEp-2-Zellen.

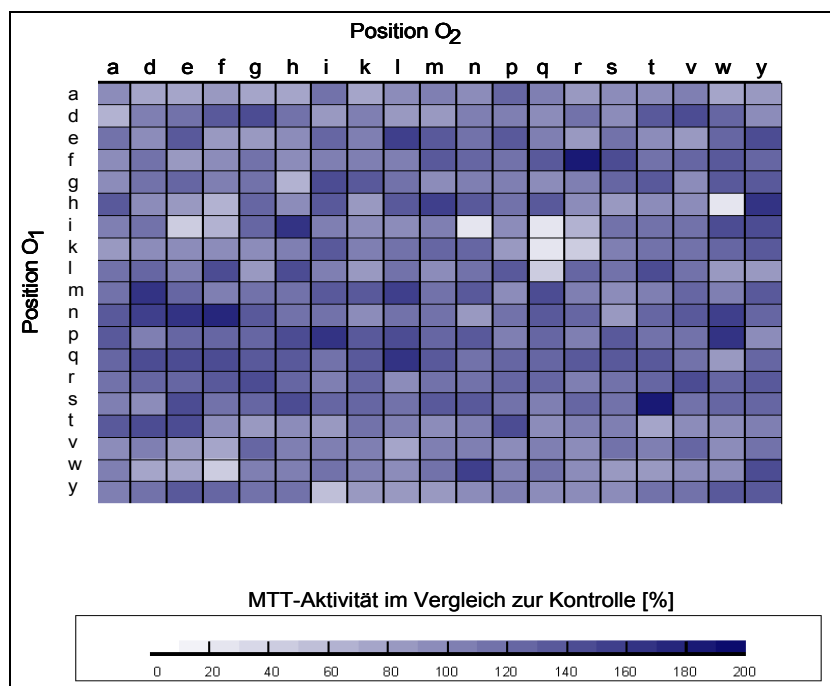


Abbildung 37: Test der zyklischen Peptide der Struktur [aa-o₁o₂-aac]zyklo auf einen zytotoxischen Effekt auf die HEp-2-Zellen. Diese wurden vor der Durchführung des Tests 3 h mit den Peptiden vorinkubiert. Dargestellt ist die MTT-Aktivität als Prozent im Vergleich zur Kontrolle.

In weiteren Verdünnungsreihen mit den oben hervorgehobenen Sequenzen konnte gezeigt werden, dass der auftretende zytotoxische Effekt konzentrationsabhängig ist. Exemplarisch dargestellt sind die konzentrationsabhängigen Effekte zweier Sequenzen in Abbildung 38.

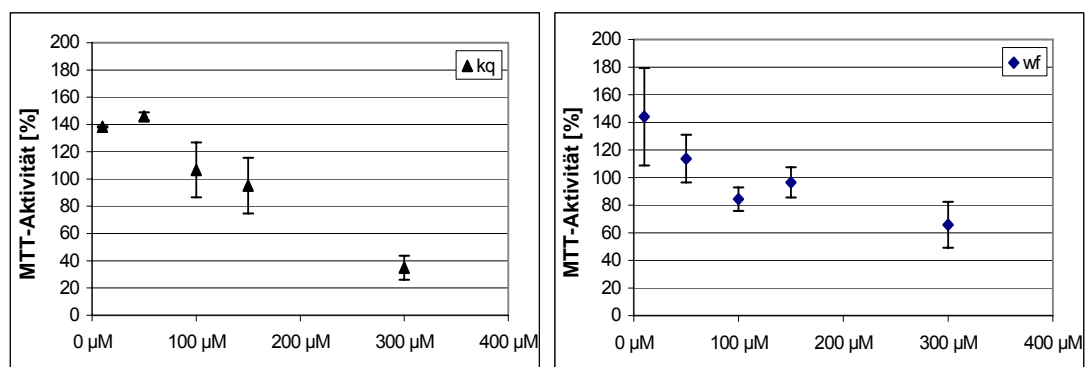


Abbildung 38: Konzentrationsabhängiger zytotoxischer Effekt der Sequenzen [aa-kq-aac]zyklo (links) und [aa-wf-aac]zyklo (rechts) auf HEp-2-Zellen. Diese wurden vor der Durchführung des Tests 3 h mit den Peptiden vorinkubiert. Dargestellt ist die MTT-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert ± Standardabweichung).

Neben den in dieser Arbeit nachsynthetisierten Positionen **aa**, **ae** und **ks** wurden weiterhin die Positionen **hw**, **in**, **iq**, **kq**, und **lq** von Dr. Werner Tegge (HZI) noch einmal synthetisiert. Diese Sequenzen wurden ebenfalls erneut auf ihre zytotoxische Aktivität untersucht. Alle nachsynthetisierten Sequenzen zeigten jedoch im Test nicht den erwarteten hohen zytotoxischen Effekt (siehe Abbildung 39). Bei den Sequenzen der definierten Positionen **hw**, **in** und **iq** wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt. Offensichtlich lagen in den Stammlösungen der Originalsynthese Verunreinigungen vor, die einen toxischen Effekt auf die Zellen und Bakterien haben. Eine eingehende Analyse von Nebenprodukten in den Peptid-Stammlösungen der ersten Synthese war mit zu erwartenden erheblichen Schwierigkeiten verbunden, und wurde zum derzeitigen Zeitpunkt nicht für sinnvoll erachtet und nicht durchgeführt.

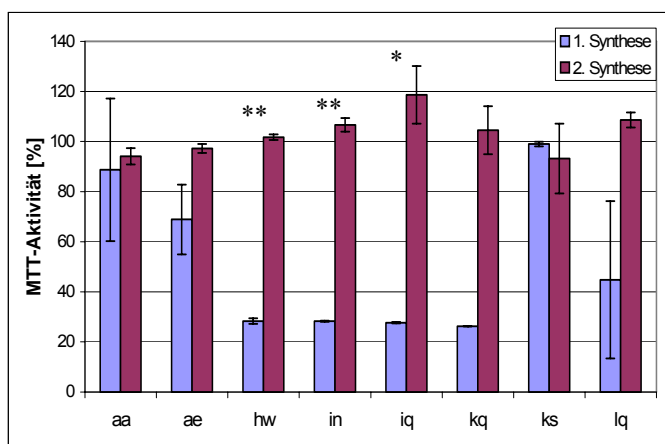


Abbildung 39: Vergleich der 1. und 2. Synthese einzelner zyklischer Peptide.

Getestet wurde der zytotoxische Effekt auf HEP-2-Zellen nach einer 3stündigen Inkubation mit ca. 350 μ M Peptid. Dargestellt ist die MTT-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert \pm Standardabweichung). Ein signifikanter Unterschied ist mit einem Stern markiert (t-Test, $*p < 0,05$, $**p < 0,005$)

Nach einer fünftägigen Inkubation der HEP-2-Zellen mit den zyklischen Peptiden zeigten lediglich zwei Sequenzen ([aa-**kk**-aac]zyklo und [aa-**ir**-aac]zyklo) eine signifikante Erniedrigung der MTT-Aktivität (Ergebnisse nicht dargestellt). Da diese Sequenzen aber nicht ein zweites Mal synthetisiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der aufgetretene Effekt durch ein Syntheseartefakt und/oder eine Verunreinigung der Stammlösung hervorgerufen wurde.

4.5.3 Test auf bakteriostatische Wirkung

Alle Peptide wurden auf einen möglichen bakteriostatischen Effekt auf *S. pyogenes* A20 getestet. Somit sollte ausgeschlossen werden, dass im Adhäsions-/Invasionsassay festgestellte inhibitorische Aktivitäten auf die mögliche bakteriostatische oder bakterizide Wirkung der Peptide zurückzuführen ist.

4.5.3.1 Lineare Peptide

Die linearen Peptide zeigten in den eingesetzten Konzentrationen keinen signifikanten bakteriostatischen Effekt auf *S. pyogenes* A20 (siehe Abbildung 40). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass inhibitorische Effekte der Peptide im Adhäsions- bzw. Invasionsassay auf ihre bakteriostatischen Eigenschaften zurückzuführen waren.

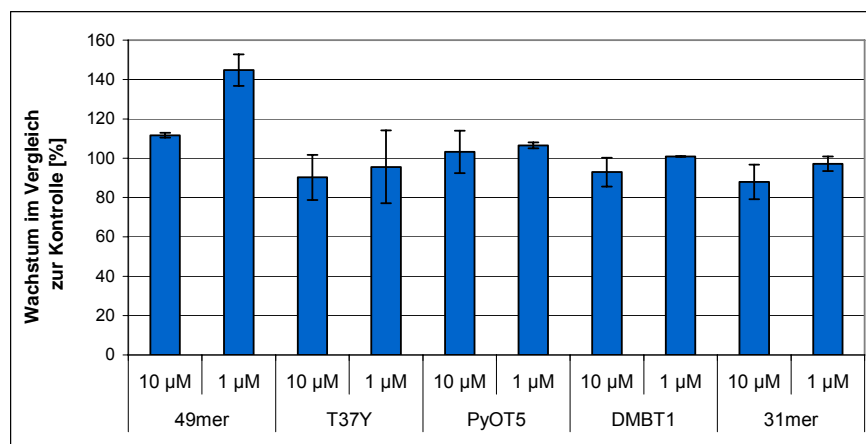


Abbildung 40: Test der linearen Peptide auf einen möglichen bakteriostatischen Effekt auf *S. pyogenes* A20.

Dargestellt ist das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle nach einer 19stündigen Inkubation mit den Peptiden in verschiedenen Konzentrationen.

4.5.3.2 Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren der Struktur xxx-0₁0₂-xxx-DKP

Der Test auf bakteriostatische Eigenschaften der Bibliothek linearer Peptide auf *S. pyogenes* A20 zeigte keine signifikanten Effekte (siehe Abbildung 41) bei einer eingesetzten Konzentration von durchschnittlich 300 µM. Das geringste ermittelte

Wachstum lag bei 83 % im Vergleich zur Kontrolle (definierte Positionen **mf** und **sn**). Bei 328 der 361 Peptidgemische war das gemessene Wachstum nach 19 Stunden mindestens genau so hoch wie bei den Kontrollen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass inhibitorische Eigenschaften von Peptiden dieser Bibliothek nicht auf bakteriostatische Eigenschaften zurückzuführen sind.

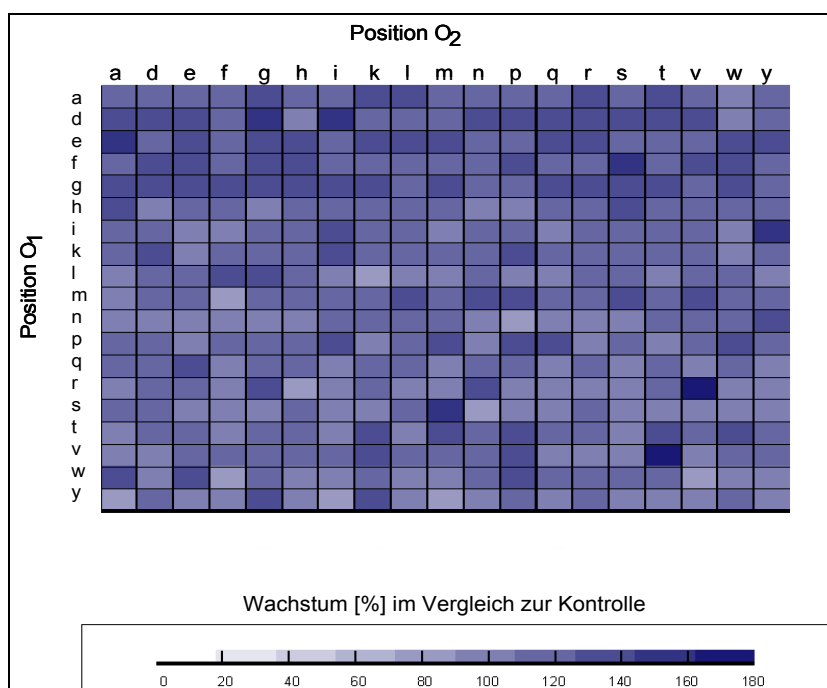


Abbildung 41: Test der Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren der Struktur xxx-o₁o₂-xxx-DKP (eingesetzte Konzentration ca. 300 µM) auf einen möglichen bakteriostatischen Effekt auf *S. pyogenes* A20. Dargestellt ist das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle nach einer 19stündigen Inkubation mit den Peptidgemischen.

Die Wachstumskurve von *S. pyogenes* A20 während der Präsenz eines Peptides dieser Bibliothek ist in Abbildung 42 exemplarisch dargestellt. Während die Kurve bei der Präsenz des Gemisches xxx-**dq**-xxx-DKP in den ersten sechs Stunden nach der Zugabe stetig anstieg, erreichte die Kurve nach der Zugabe des Gemisches xxx-**mf**-xxx-DKP nach einer Stunde ein Plateau, welches sich bei etwa 90 % Wachstum im Vergleich zur Kontrolle einpendelte. Somit konnte für das Peptidgemisch xxx-**mf**-xxx-DKP zwar ein geringer, jedoch kein signifikanter bakteriostatischer Effekt festgestellt werden. Das bei dem Gemisch xxx-**dq**-xxx-DKP erhöhte Wachstum, das Wachstum von GAS A20 liegt

hier höher als das der Kontrolle, lässt sich auf einen eventuell wachstumsfördernden Effekt zurückführen.

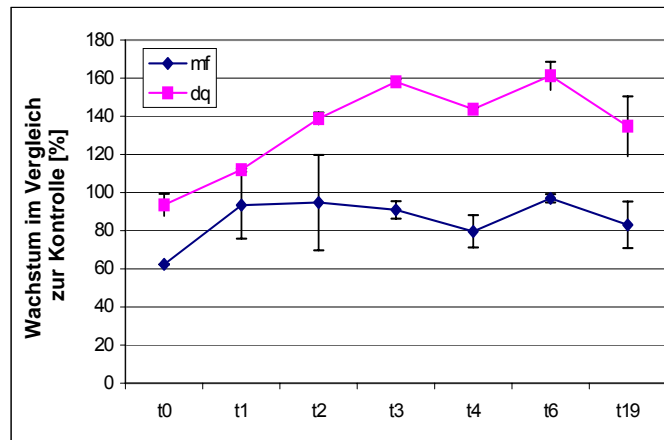


Abbildung 42: Wachstumskurve von *S. pyogenes* A20 während der Präsenz der Peptide xxx-**mf**-xxx-DKP und xxx-**dq**-xxx-DKP. Die eingesetzte Konzentration betrug jeweils ca. 300 μ M (t0 = Messung nach Zugabe des Peptidgemisches, t1 = Messung nach 1 h, etc.) Dargestellt ist das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert \pm Standardabweichung).

4.5.3.3 Zyklische Peptidsammlung der Struktur [aa-o₁o₂-aac]zyklo

Der Test auf bakteriostatische Eigenschaften der zyklischen Peptidsammlung zeigte, dass einige Sequenzen das Wachstum von *S. pyogenes* A20 deutlich inhibierten (siehe Abbildung 43). Zu diesen zählten die Sequenzen mit den definierten Positionen **aa**, **ae**, **hw**, **in**, **iq**, **kq** und **lq**. Hier lag das gemessene Wachstum unter 60 % im Vergleich zur Kontrolle. Auffällig war, dass die Positionen **hw**, **in**, **iq**, **kq** und **lq** auch im Test auf Zytotoxizität bereits durch toxische Eigenschaften hervorgetreten waren.

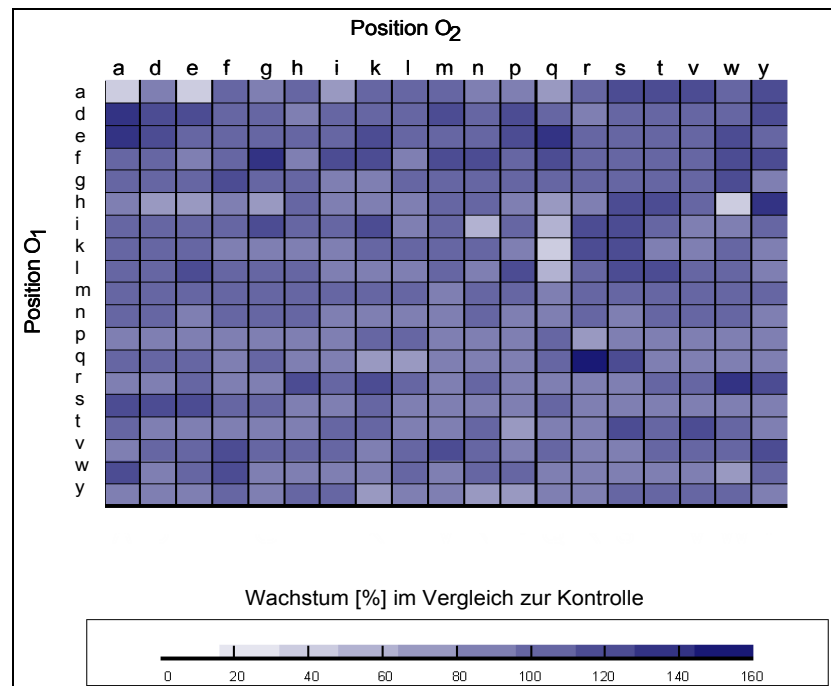


Abbildung 43: Test der zyklischen Peptide der Struktur [aa-o₁o₂-aac]zyklo (eingesetzte Konzentration ca. 350 μ M) auf einen möglichen bakteriostatischen Effekt auf *S. pyogenes* A20. Dargestellt ist das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle nach einer 19stündigen Inkubation mit den Peptiden.

Die Untersuchung der nachsynthetisierten Peptide zeigte allerdings auch hier, wie schon beim Test auf Zytotoxizität beschrieben, einen Verlust der bakteriostatischen Eigenschaften (siehe Abbildung 44). Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass inhibitorische Eigenschaften der Peptide im Adhäsions- bzw. Invasionsassay auf Syntheseartefakte und/oder eine Verunreinigung der Stammlösung zurückzuführen war. Auf eine genauere Untersuchung dieser Tatsache wurde, wie in Kapitel 4.5.2.3 beschrieben, verzichtet.

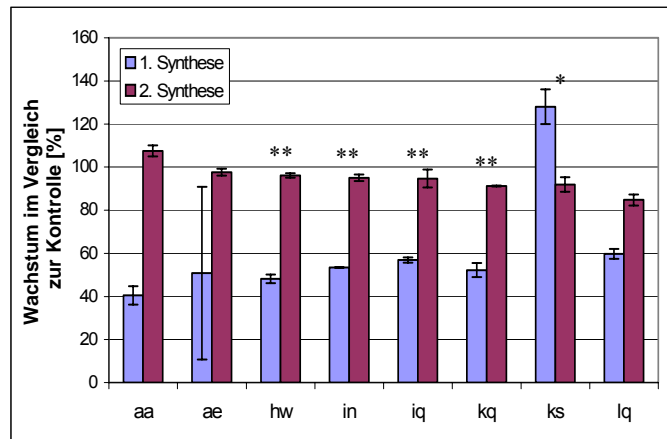


Abbildung 44: Vergleich der 1. und 2. Synthese einzelner zyklischer Peptide. Getestet wurde der bakteriostatische Effekt auf *S. pyogenes* A20 nach einer 19stündigen Inkubation mit ca. 350 μ M Peptid. Dargestellt ist die MTT-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert \pm Standardabweichung). Ein signifikanter Unterschied ist mit einem Stern markiert (t-Test; ** $p < 0,005$, * $p > 0,05$)

5 Diskussion

Infektionen mit dem humanpathogenen Erreger *S. pyogenes* sind seit langer Zeit von großer Bedeutung. Auch heute erkranken trotz fortschrittlicher Behandlungsmöglichkeiten noch immer über 760 Millionen Menschen pro Jahr an einer von ihm ausgelösten Infektion. Bei der Mehrzahl der Infektionen handelt es sich um lokale Infektionen. Doch seit Mitte der 1980er Jahre treten weltweit immer wieder Fälle schwerer systemischer Streptokokkeninfektionen und des *streptococcal toxic shock syndrome* (STSS) auf (Ayoub 1992; Cone *et al.* 1987; Stromberg *et al.* 1991). Für die effektive Behandlung einer GAS-Infektion ist es notwendig, die Mechanismen und Abläufe, die letztendlich zum Ausbruch von invasiven Streptokokkeninfektionen führen, zu untersuchen und zu verstehen. Erst dann können neue Therapieansätze entwickelt werden.

Die Pathogenese einer Streptokokkeninfektion beginnt mit der Anheftung der Bakterien an das Haut- und/oder Rachenepithel des Wirtes. Erst nach dieser Anheftung sind die Streptokokken in der Lage, sich in tiefere Gewebeschichten und auch in den Blutkreislauf des Wirtes auszubreiten. Ein erster Schritt zur genaueren Erforschung der Invasionsstrategien wäre z. B. die selektive Ausschaltung einzelner Adhäsions- bzw. Invasionsfaktoren. So könnte nach und nach die Rolle einzelner Faktoren bei der Internalisierung aufgeklärt werden. Die Suche nach Substanzen, die die Adhäsion und somit auch die Invasion von Streptokokken inhibieren, läuft mittlerweile weltweit.

Die Konsequenz aus dem Vorhaben, eine große Anzahl von Substanzen auf ihre inhibitorische Aktivität zu testen, ist die Entwicklung eines zuverlässigen Hochdurchsatz-Screenings. Dies war ein Ziel dieser Arbeit. In dem zu entwickelnden Assay sollte parallel die Anzahl der adhärenenten und internalisierten *S. pyogenes* abgelesen werden können. Für eine solche quantitative Detektion ist allerdings eine Markierung der Streptokokken notwendig. Aus der Literatur sind unterschiedliche Ansätze bekannt, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigen. So wurden Bakterien mit verschiedenen Lebendfarbstoffen angefärbt (Fuller *et al.* 2000; Bachrach *et al.* 2005; Hytonen *et al.* 2006; Drevets & Elliott 1995), biotinyliert

(Ofek *et al.* 1986; Agerer *et al.* 2004) oder radioaktiv markiert (Mosoni *et al.* 1997; Athamna & Ofek 1988; Kishore 1981). Der Nachteil dieser bereits etablierten Methoden ist die Tatsache, dass sie nur adhärenz bzw. nur internalisierte bzw. nur die Gesamtsumme der vorhandenen Bakterien detektieren. Ein Internalisierungsassay mit einer differentiellen Doppelimmunofluoreszenzfärbung wie bei (Molinari *et al.* 2000; Molinari & Chhatwal 1998) beschrieben ist im Mikrotiterplatten-Format aus der Literatur noch nicht bekannt. Zunächst wurde versucht, die Streptokokken erst mittels einer Lebendfärbung bzw. Biotinylierung zu markieren, um später im Assay die externen GAS mit Hilfe eines Antikörpers von den internalisierten zu differenzieren. Entgegen den Literaturangaben färbten die eingesetzten Farbstoffe nur partiell und/oder hatten negativen Einfluss auf das Adhäsions-/Invasionsverhalten von *S. pyogenes*. Da die Erstellung einer Kalibrationskurve mit dem rot fluoreszierenden Ziege- α -Kaninchen Antikörper AlexaFluor®568 nicht möglich war, musste auf eine differentielle Doppelimmunofluoreszenzfärbung der Streptokokken verzichtet werden. Stattdessen wurde die Anzahl der adhärenz und der internalisierten *S. pyogenes* in getrennten Assays ermittelt. Die alternative Möglichkeit der radioaktiven Markierung der Streptokokken wurde auf Grund der komplizierten Handhabung während der biologischen Tests für nicht praktikabel gehalten. (LeBlay G. *et al.* 2004) konnten bei Vergleichsuntersuchungen zeigen, dass die ELISA-basierte Detektion von Bakterien bei einem Einsatz von Antikörpern mit guter Spezifität mit der Detektion radioaktiv markierter Bakterien vergleichbar ist. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse aus den Adhäsions- bzw. Invasionsassays dieser Arbeit wurde durch Auszählungen unter dem Mikroskop überprüft und ergab keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der detektierten Streptokokken. Der Nachteil des entwickelten Hochdurchsatz-Assays liegt in dem hohen benötigten Zeitaufwand, bedingt durch manuelles Pipettieren. Dies ließe sich durch den Einsatz eines Pipettierroboters deutlich verbessern. Der Einsatz eines solchen Roboters würde gleichzeitig die Möglichkeit eröffnen, die Assays in 384-Well-Mikrotiterplatten durchzuführen. Dadurch würden sowohl die benötigte Menge der Testsubstanzen als auch die eingesetzten Mengen der Antikörper reduziert werden können. Auch der Einsatz eines automatischen Mikroskops, wie bereits durch (Barthelson *et al.* 1999) beschrieben, wäre denkbar. Hier könnten dann adhärenz und internalisierte Bakterien nach einer Doppelimmunofluoreszenzfärbung parallel detektiert und ausgewertet werden. Ein weiterer kritischer Punkt des entwickelten

Hochdurchsatz-Assays ist die auftretende Streuung der Messwerte. Wie auch bei den Auszählungen unter dem Mikroskop traten im Mikrotiterplatten-basierten Assay zum Teil große Streuungen bei den Messwerten einer Mehrfachbestimmung auf. Diese konnten im Rahmen dieser Arbeit zwar verringert, nicht aber verhindert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten linearen Einzelpeptide wiesen alle eine inhibitorische Aktivität gegenüber der Adhäsion bzw. der Invasion von GAS auf. Dabei konnte in den meisten Fällen gezeigt werden, dass die Inhibierung der Internalisierung von der Inhibierung der Adhäsion abhängig ist, d. h. adhäreren weniger GAS an die HEp-2-Zellen, können auch in der Gesamtsumme weniger in die Wirtszelle eindringen. Untersuchungen bezüglich bakteriostatischer und zytotoxischer Effekte der linearen Peptide zeigten keine Auffälligkeiten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die aufgetretenen inhibitorischen Aktivitäten nicht auf eine negative Beeinflussung der Streptokokken bzw. der Epithelzellen zurück zu führen sind.

Das Peptid 49mer besteht aus den sechs N-terminalen Aminosäuren des ersten Repeats (SfbI-1) und 43 benachbarten Aminosäuren des Spacers (siehe auch Abbildung 45). Aufgrund der Länge der zu synthetisierenden Sequenz und der enthaltenen komplizierten Kopplungen mussten verschiedene Synthesestrategien getestet werden. Bei der Fragmentkondensation wird das Peptid in mehreren, hier in zwei Teilen synthetisiert, die dann später aneinander gekoppelt werden. Der Vorteil hierbei ist, dass mit der geringeren Länge der beiden zu synthetisierenden Peptidfragmente auch die auftretenden Syntheseprobleme reduziert werden können. Des Weiteren wurden bei einer Totalsynthese des 49mers so genannte Pseudoproline in die Sequenz eingebaut. Pseudoproline sind Dipeptide, deren Serin- oder Threoninrest reversibel als TFA-labiles Oxazolidin geschützt ist. Durch den Einbau von Pseudoprolinen in eine Sequenz wird die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die die Synthese behindern können, verhindert. Letztlich führte eine Variation der Aktivierungs- und Kopplungsreagenzien, statt TBTU und Hünig-Base wurden DIC und HOBt eingesetzt, zu einer erfolgreichen Totalsynthese. Eine zuvor synthetisierte Variante des 49mer, das T37Y (Hahn 2002), wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls auf inhibitorische Aktivitäten bezüglich der

zellulären Invasion von GAS getestet. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass beide Peptide die Bindung von Fibronectin an *S. gordonii* SGO30 inhibieren (Hahn 2002).

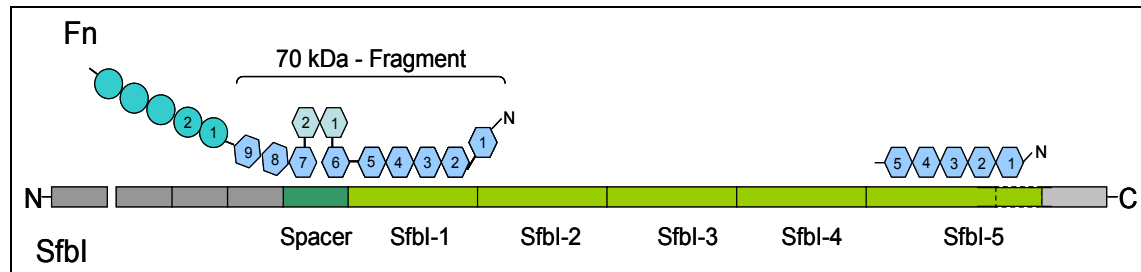


Abbildung 45: Schema der Bindung von SfbI an Fibronectin (modifiziert nach (Schwarz-Linek *et al.* 2006)).

Beispielhaft dargestellt ist lediglich die Bindung von Fn and SfbI-1 und SfbI-5. SfbI-1 bis SfbI-5: fibronectinbindende Repeats. Die ermittelten K_d -Werte von UR/SfbI-1 und SfbI-5 gegenüber Fn waren deutlich niedriger als die der anderen fibronectinbindenden Repeats (siehe (Schwarz-Linek *et al.* 2006)).

Die Ergebnisse aus den Adhäsions- und Invasionsassays zeigen, dass beide Peptide in der Lage sind, den Internalisierungsprozess von GAS A20 zu inhibieren. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied der Inhibitionsaktivität zwischen den beiden Peptiden festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass der Austausch der Aminosäure Threonin gegen Tyrosin an Position 37 des Peptides T37Y keinen Einfluss auf die Aktivität des Peptides hat. Während für beide Peptide in den in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen kein IC_{50} -Wert für die Adhäsion ermittelt werden konnte, lagen die IC_{50} -Werte für die Invasion bei $0,435 \mu\text{M}$ für das 49mer und bei $0,368 \mu\text{M}$ für das T37Y. Die Tatsache, dass es keinen signifikanten Unterschied in der inhibitorischen Aktivität der beiden Peptide gibt, bestätigt die bereits erwähnten Ergebnisse von Edwards *et al.*, dass es keine Relation zwischen der Fähigkeit der Bindung von Fibronectin und der Fähigkeit die Adhäsion von GAS zu inhibieren gibt (Edwards *et al.* 2004a). Denn im o. g. Fibronectin-Bindungsassay zeigte das T37Y eine zehnfach geringere Inhibitionsaktivität als das 49mer. Da bekannt ist, dass das SfbI-Protein bzw. Abschnitte des SfbI-Proteins, wie das 49mer, die SfbI-vermittelte Adhäsion inhibieren, wurden sowohl das 49mer als auch das T37Y im Rahmen dieser Arbeit auf ihre inhibitorischen Aktivitäten gegenüber einem SfbI-negativen *S. pyogenes*-Stamm (GAS A8) untersucht. Sollten die Peptide eine Spezifität gegenüber der SfbI-vermittelten Internalisierung besitzen, dürften sie die Adhäsion bzw. die

Invasion eines SfbI-negativen Stammes nicht inhibieren. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass beide Peptide in der Lage sind, sowohl die Adhäsion als auch die Invasion des SfbI-negativen GAS A8 an HEp-2-Zellen zu inhibieren. Diese Ergebnisse waren unerwartet, da in der Literatur postuliert wurde, dass die Internalisierung von GAS A8 Fibronectin-unabhängig verläuft (Molinari *et al.* 2000). Allerdings führte die Inhibition der Fibronectinbindung durch anti- $\alpha 5\beta 1$ -Antikörper bzw. durch ein RGD-Peptid zu einer reduzierten Adhäsion bzw. Invasion von GAS A8. Diese Reduktion war zwar nicht signifikant, schließt aber eine wenn auch nur geringfügige Beteiligung des Fibronectins an der Adhäsion von GAS A8 nicht aus. Weiterhin konnten Molinari *et al.* zeigen, dass die Adhäsion von GAS A8 an HEp-2-Zellen eine Rekrutierung von Microvilli auslöst, die die Streptokokken nach und nach als Netzwerk umgeben und zur Internalisierung in die Wirtszelle führen. Begleitet ist dieser Prozess von einer massiven Aktinrekrutierung und -polymerisation. Der genaue Ablauf dieses Prozesses und seine Induktion sind noch nicht vollständig geklärt. Aus der Literatur ist aber auch bekannt, dass *S. pyogenes* A8 das Gen für das Protein SfbII besitzt (Kreikemeyer *et al.* 1999). Es ist noch unklar, ob das SfbII-Protein an der Fibronectin-vermittelten Adhäsion beteiligt ist. Denn obwohl es klar von SfbI-Protein zu unterscheiden ist, besitzt es Homologien zu den Fibronectin-bindenden Regionen von SfbI (Kreikemeyer *et al.* 1995). Diese homologen Repeats des SfbII-Proteins, bestehend aus zwei ganzen und einem unvollständigen Repeat, befinden sich am C-terminalen Ende und sind in der Lage, Fibronectin zu binden. Eine genauere Charakterisierung dieser Fibronectinbindung wurde durch (Oehmcke *et al.* 2004) durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass das SfbII-Protein sowohl ganzes Fibronectin als auch nur das 30 kDa-Fragment des Fibronectins bindet. Dabei ist die Bindungsstärke aber deutlich geringer als bei anderen bekannten MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Weiterhin ist das SfbII-Protein im Gegensatz zum SfbI-Protein nicht in der Lage, an das 45 kDa-Fragment des Fibronectins zu binden. Zusammen mit der Tatsache der geringeren Bindungsstärke lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die SfbII-Fibronectin-Interaktion im Gegensatz zum SfbI-Protein keinen kooperativen Bindungsmechanismus besitzt, der die Internalisierung der Bakterien induziert (Oehmcke *et al.* 2004). Die Rolle des SfbII-Proteins als Adhäsins konnte aber bestätigt werden. Berücksichtigt man die Tatsache, dass das SfbII-Protein als schwaches Adhäsins einer Fibronectin-vermittelten Adhäsion fungiert, lassen sich die Ergebnisse dieser

Arbeit durchaus erklären. So könnte die Funktion des SfbII-Proteins darin bestehen, einen ersten, schwachen Kontakt mit dem membrangebundenen Fibronektin der HEp-2-Zellen herzustellen. Nach der erfolgreichen Kontaktaufnahme wird dann die Rekrutierung sowohl der Microvilli als auch des Aktins der Wirtszelle induziert. Bei einer Vorinkubation der HEp-2-Zellen mit dem Peptid 49mer bzw. T37Y binden diese nun an das membrangebundene Fibronektin der HEp-2-Zellen. Somit verhindern sie nach der Zugabe der GAS A8 deren Bindung an das Fibronektin. Dies hat zur Folge, dass der zur Induktion der Internalisierung benötigte Kontakt der Bakterien mit der Wirtszelle über das Fibronektin nicht hergestellt werden kann. Die Adhäsion und somit auch die Invasion werden also inhibiert.

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Immunisierung von Mäusen mit dem SfbI-Protein bzw. mit den Fibronektin-bindenden Regionen des SfbI-Proteins die Mortalitätsrate nach einer GAS-Infektion deutlich senken konnte (Guzman *et al.* 1999; Schulze *et al.* 2001; Schulze *et al.* 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch kürzere Abschnitte des SfbI-Proteins *in vitro* in der Lage sind, die Internalisierung von GAS zu reduzieren. Ein möglicher Einsatz dieser kurzen, leicht herzustellenden Peptide als mögliche Immunsierungsreagenzien im Mausmodell wäre zu untersuchen.

Das Peptid 31mer stellt, wie bereits beschrieben, eine verkürzte Variante des 49mers dar. Nach den bereits bekannten Ergebnissen aus den Kompetitionsassays (Hahn 2002) war zu erwarten, dass das 31mer auch bei der Internalisierung der Streptokokken keine inhibitorischen Aktivitäten aufzeigen würde. In der vorliegenden Studie wurde jedoch festgestellt, dass das 31mer in der Lage ist, sowohl die Adhäsion als auch die Internalisierung von GAS A20 zu inhibieren. Diese Ergebnisse lassen sich durch folgende Ansätze erklären: Erstens ist aus der Literatur bekannt, dass es keine signifikante Relation zwischen der Fähigkeit Fibronektin zu binden und der Fähigkeit der Adhäsion an Epithelzellen gibt (Edwards *et al.* 2004a). Auch ist der Grad der Inhibition der Adhäsion durch ein bestimmtes Peptid abhängig vom eingesetzten *S. pyogenes*-Stamm (Edwards *et al.* 2004b). So konnten Edwards *et al.* zeigen, dass ein auf Teilen des SfbI-Proteins basierendes 16mer die Adhäsion von FBP-positiven *S. pyogenes*-Stämmen in ganz unterschiedlichem Ausmaß inhibierte. Somit lassen die mit *S. gordonii* SGO30 erhaltenen Ergebnisse der Fibronektinbindung nur einen bedingten Rückschluss auf die inhibitorischen Aktivitäten im zellbasierten

Internalisierungsassay mit GAS A20 zu. Außerdem sind die für die Aktivität wichtigen N- und C-terminalen Abschnitte des Peptids nicht verändert worden, so dass eine inhibitorische Aktivität nicht auszuschließen ist. Die oben beschriebene Inhibierung der Internalisierung verlief jedoch nicht mit der erwarteten Konzentrationsabhängigkeit. Vielmehr nahm die Inhibition mit abnehmender Konzentration des 31mers zu. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die große Streuung der Einzelmessungen im Assay. Diese Streuungen konnten durch Optimierung der Assay-Bedingungen zwar verringert, aber nicht verhindert werden.

Während die Varianten des 49mers bereits in Vorarbeiten auf inhibitorische Fähigkeiten gegenüber der zellulären Invasion von GAS untersucht wurden, wurden die Peptide PyOT5 und DMBT1pbs1 erstmalig mit dieser Fragestellung getestet.

Das Protein PyOT5 besteht aus den Aminosäureresten 567-591 des fünften Fibronectin-bindenden Repeats von SfbI. Dieser 50 Aminosäurereste lange Repeat ist der einzige, der eine Bindungsstelle für das N-terminale Fibronectin-Modul ¹F1 besitzt. Bindungsstudien von Schwarz-Linek *et al.* zeigten eine hohe Affinität des Peptids PyOT5 zu Fibronectin. Der ermittelte K_d -Wert für die Interaktion mit den Modulen ¹F1²F1 des Fibronectins lag bei 0,45 μ M (Schwarz-Linek *et al.* 2004). Die Entdeckung dieser zweiten hoch affinen Bindungsstelle des SfbI-Proteins an Fibronectin (siehe Abbildung 45) machte eine erstmalige Untersuchung des Peptids in Internalisierungsassays interessant. Die Ergebnisse zeigen, dass PyOT5 in der Lage ist, die Adhäsion und die Invasion von *S. pyogenes* A20 deutlich zu inhibieren. Diese Ergebnisse machen PyOT5 zu einem interessanten Kandidaten bei der Suche nach Inhibitoren der zellulären Adhäsion von GAS. Vorschläge für weiterführende Untersuchungen wären z. B. eine Verkürzung der Sequenz, um die für die Wirkung relevanten Abschnitte innerhalb der Sequenz festzustellen. Auch der gezielte Austausch von Aminosäuren in der Sequenz lässt eine Schlussfolgerung auf die essentiellen Aminosäuren in der Sequenz zu.

Eine Erklärung für die inhibitorische Aktivität von DMBT1pbs1 bietet die bereits von (Bikker *et al.* 2004) beschriebene Fähigkeit des Peptids, Bakterien zu binden, wobei der Mechanismus der Bindung noch nicht komplett aufgeklärt ist. Nach Zugabe des Peptids zu den HEP-2-Zellen besteht die Möglichkeit, dass das Peptid nicht an die eukaryotischen Zellen bindet, sondern frei im Medium verbleibt. Wird nun *S. pyogenes*

zugegeben, bindet DMBT1pbs1 an die GAS und blockiert so ihre Fibronectin-Bindungsstellen. Dadurch können die GAS kein Fibronectin und in der Folge nicht an die HEp-2-Zellen binden und bleiben als Streptokokken-DMBT1pbs1-Komplex frei im Medium. Durch die Waschschriffe am Ende der Assays werden sie dann entfernt. Eine Aufklärung dieses beschriebenen Mechanismus der Inhibition wäre sehr interessant, da die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse eine nur sehr geringe Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition zeigen.

Die Suche nach Substanzen, die die Adhäsion und somit auch die Invasion von Streptokokken inhibieren, läuft weltweit. Neben der Untersuchung einzelner Peptide auf ihre inhibitorischen Qualitäten (Edwards *et al.* 2004b; Molinari *et al.* 1997) bezüglich der Adhäsion und Invasion von GAS an Wirtszellen wird oft lediglich die Inhibition der Bindung von Fibronectin an Streptokokken bzw. eukaryotische Zellen getestet (Ozeri *et al.* 1996; Tomasini-Johansson *et al.* 2001). Dabei werden in letzter Zeit auch Peptidbibliotheken eingesetzt (Hiro-O Ito *et al.* 2006): Ito *et al.* untersuchten eine so genannte *Positional Scan Library*, bestehend aus biotinylierten 6meren, auf ihre Bindung an einen anti-Fibronectin-Antikörper, der die bakterielle Fibronectin-Bindung behindert. Während einige der Peptidgemische eine hohe Bindungsaffinität gegenüber dem Antikörper aufwiesen, zeigte die synthetisierte Konsensus-Sequenz jedoch keine Aktivität. Der Einsatz solcher Bibliotheken, die sowohl auf biologischem Wege als auch über chemische Synthese entstehen können (Rinnová & Lebl 1996), erhöht dabei statistisch die Chance, einen Wirkstoff zu finden. Dank der automatisierten Festphasen-Peptidsynthese ist die Herstellung umfangreicher Peptidbibliotheken deutlich vereinfacht worden. Doch die Komplexität der Bibliotheken birgt auch Nachteile. Wie die Synthese der Bibliothek linearer Peptide im Rahmen dieser Arbeit gezeigt hat, können große Unterschiede in der Ausbeute der einzelnen Subbibliotheken auftreten. Gründe für die unterschiedliche Ausbeute können z.B. auftretende Probleme in der Automatisierung der Synthese sein. Da der Syntheseroboter meist unbeobachtet und über Nacht läuft, können Probleme wie unvollständiges Absaugen der Flüssigkeiten im Synthesereaktor, zu geringe Zugabe an Kopplungsreagenzien, da die Kanüle verstopft ist, etc. nicht ausgeschlossen werden. Dies kann nur durch eine regelmäßige Überwachung der Synthese umgangen werden. Unterschiede in der Ausbeute der

einzelnen Subbibliotheken durch eine ungleiche Verteilung des Syntheseharzes kann ausgeschlossen werden, da das Harz mit der *Balanced-Density*-Methode auf die Synthesereaktoren verteilt wurde. Die Aminosäurequantifizierung einiger Stichproben aus der Bibliothek ergab ein Konzentrationsspektrum der Subbibliotheken von 0,12 mM bis 8,3 mM. Um in den biologischen Tests eine gleiche Konzentration einsetzen zu können, müssten alle Subbibliotheken quantifiziert werden, was sowohl kostspielig als auch zeitraubend ist. Deshalb wurde aufgrund der stichprobenartigen Quantifizierung von einer Durchschnittskonzentration von ca. 3 mM ausgegangen.

Weiterhin ist eine Verunreinigung der Stammlösung durch Schutzgruppenreste, die während der Waschschriffe nicht entfernt wurden, möglich. Dieser Effekt trat wahrscheinlich bei der in dieser Arbeit getesteten Sammlung zyklischer Peptide aus D-Aminosäuren auf. Sequenzen, die in verschiedenen biologischen Untersuchungen Aktivitäten aufwiesen, wurden erneut synthetisiert und getestet, hatten aber dann keinerlei Aktivität mehr. Auf die Untersuchung der genauen Ursache dieses Effektes wurde auf Grund der Komplexität der durchzuführenden Untersuchungen verzichtet. Eine bakterielle Kontamination der Stammlösungen durch den nicht sterilen Herstellungsprozess ist unwahrscheinlich, da aus der Literatur bekannt ist, dass DMSO sowohl bakterizide als auch fungizide Wirkung besitzt (Chan & Gadebusch 1968).

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Peptidbibliotheken machen die statistisch erhöhten Chancen auf eine aktive Sequenz deutlich. In beiden getesteten Bibliotheken bzw. Sammlungen wurden gleich mehrere Subbibliotheken bzw. Sequenzen bestimmt, die gezielt die Adhäsion und die Invasion von *S. pyogenes* A20 inhibieren können. Im Falle der Bibliothek aus linearen Peptiden sind dabei nur zwei des aus insgesamt acht Aminosäuren bestehenden Peptides definiert. Durch die Synthese einer zweiten und dritten Bibliotheks-Generation, in denen die noch unbestimmten Positionen definiert werden, kann die inhibitorische Aktivität unter Umständen noch verbessert werden. Gleiches gilt für die zyklische Peptidsammlung; hier können die eingesetzten D-Alanin-Aminosäuren in nachfolgenden Synthesen durch andere definierte Aminosäuren ersetzt werden.

Neben den beschriebenen Effekten der Reduzierung von adhärenenten und internalisierten GAS traten bei der getesteten Bibliothek bzw. Sammlung noch anderer Effekte auf. So

wurden bei einigen Subbibliotheken zwar die Anzahl der adhärenen GAS reduziert, die Zahl der internalisierten Streptokokken lag aber über der der Kontrolle. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse wäre, dass diese Subbibliotheken auf eine nicht geklärte Weise die Invasion der Streptokokken beschleunigen. So findet man nach Abbruch des Experiments nur wenige adhärenente, aber sehr viele internalisierte Bakterien. Auch der gegenteilige Effekt, nämlich die Reduzierung der internalisierten *S. pyogenes* bei gleichzeitiger Anhäufung adhärenenter GAS trat bei Subbibliotheken bzw. Sequenzen beider Bibliotheken auf. Diese Ergebnisse lassen sich durch folgende Hypothese begründen: die Subbibliotheken ermöglichen zwar eine Adhärenz an die Wirtszelle, verhindern aber auf bisher nicht bekannte Weise den Internalisierungsprozess. Somit akkumulieren die GAS an der Außenseite der Wirtszellen. Eine genauere Charakterisierung dieser hier beschriebenen Effekte könnte zu einem besseren Verständnis des Invasionsmechanismus und der daran beteiligten Faktoren führen. Bei der Erklärung oben genannter Effekte der getesteten Peptidgemische darf die bereits beschriebene Streuung der Messwerte nicht außer Acht gelassen werden. Sie könnte eine Überbewertung eines detektierten Effektes veranlassen.

Sowohl die Bibliothek linearer Peptide als auch die Sammlung zyklischer Peptide wurden auf eine mögliche Zytotoxizität gegenüber den HEp-2-Zellen untersucht.

Die Ergebnisse zeigten keine signifikant erniedrigte MTT-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Somit kann ausgeschlossen werden, dass zytotoxische Eigenschaften die inhibitorische Aktivität in den Internalisierungsassays beeinflusst haben. Bei beiden Bibliotheken traten gleichzeitig Positionen auf, die die MTT-Aktivität der HEp-2-Zellen positiv zu beeinflussen scheinen. Bei diesen Positionen lag die gemessene Aktivität über der der Kontrolle. Erklärungen hierfür liegen zum einen in der Streuung der erhaltenen Messwerte. Zum anderen ist bekannt, dass D-Aminosäuren in den Peroxisomen eukaryotischer Zellen zu Ketosäuren degradiert werden (Baudhuin *et al.* 1964). Diese Ketosäuren könnten in den weiteren Stoffwechsel der Zellen integriert werden und könnten somit ihre Fitness, gemessen an der MTT-Aktivität erhöhen. Inwieweit diese Umsetzung aber in den Ergebnissen des MTT-Tests zum Tragen kommt, ist fraglich.

Die Untersuchung auf bakteriostatische Eigenschaften der Peptidsammlungen ergab kein signifikant erniedrigtes bakterielles Wachstum. Die Tatsache, dass einige

Subbibliotheken zu einem verstärkten bakteriellen Wachstum führten, lässt sich dadurch erklären, dass die Bakterien einige D-Aminosäuren wie z. B. D-Alanin oder D-Glutamin in ihre Zellwände einbauen. Durch das Vorhandensein solcher Rohstoffe kann das Wachstum gefördert werden. Einige Subbibliotheken der Bibliothek linearer Peptide zeigten einen geringen, wenn auch nicht signifikanten bakteriostatischen Effekt. Durch eine weitere Sequenzauflösung, d.h. die Definition der restlichen Aminosäuren in einer Sequenz, könnte dieser Effekt unter Umständen noch verstärkt werden. Geeignete Peptide könnten dann als antimikrobiell wirkende Peptide eingesetzt werden. Diese synthetisch hergestellten Peptide hätten den Vorteil, dass sie nicht, wie die meisten der bekannten kurzkettigen antimikrobiellen Peptide (AMP) in der Regel zytotoxisch sind (Kagan *et al.* 1994). Ob die synthetischen antimikrobiellen Peptide ein genauso breites Wirkungsspektrum wie die natürlichen AMPs besitzen (Hancock & Scott 2000), müsste dann untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden erstmalig komplette Peptidbibliotheken in einem neu entwickelten Hochdurchsatz-Screening auf ihre inhibitorischen Aktivitäten gegenüber der zellulären Adhäsion und Invasion von *S. pyogenes* getestet. Neben einigen aktiven Subbibliotheken, deren inhibitorische Qualitäten durch eine ausführlichere Definition der Sequenz näher bestimmt werden sollten, konnte die inhibitorische Aktivität verschiedener linearer Peptide, z. T. basierend auf dem SfbI-Protein, gezeigt werden. Mit den in dieser Arbeit entdeckten inhibitorisch aktiven Peptiden bzw. Peptidgemischen wurde somit die Grundlage für weitere Untersuchungen im Bereich der Infektionen mit Gruppe A Streptokokken gelegt. Die ermittelten aktiven Peptide könnten sowohl zur weiteren Aufklärung der zurzeit noch nicht vollständig geklärten Internalisierungsmechanismen als auch zur Untersuchung neuer Immunisierungsstrategien im Mausmodell eingesetzt werden.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Acord, J., Maskell, J. & Sefton, A. (2005). A rapid microplate method for quantifying inhibition of bacterial adhesion to eukaryotic cells. *J.Microbiol.Methods*, 60, 55-62.

Agerer, F., Waeckerle, S. & Hauck, C. R. (2004). Microscopic quantification of bacterial invasion by a novel antibody-independent staining method. *J.Microbiol.Methods*, 59, 23-32.

Alouf, J. E. (1980). Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin). *Pharmacol.Ther.*, 11, 661-717.

Ashbaugh, C. D., Warren, H. B., Carey, V. J. & Wessels, M. R. (1998). Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft-tissue infection. *J.Clin.Invest*, 102, 550-560.

Athamna, A. & Ofek, I. (1988). Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of attachment and ingestion stages of bacterial phagocytosis. *J.Clin.Microbiol.*, 26, 62-66.

Atherton, E. & Sheppard, R. C. (1989). *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. IRL Press a Oxford Universtiy Press Oxford; New York.

Ayoub, E. M. (1992). Resurgence of rheumatic fever in the United States. The changing picture of a preventable illness. *Postgrad.Med.*, 92, 133-142.

Bachrach, G., Ianculovici, C., Naor, R. & Weiss, E. I. (2005). Fluorescence based measurements of *Fusobacterium nucleatum* coaggregation and of fusobacterial attachment to mammalian cells. *FEMS Microbiol.Lett.*, 248, 235-240.

Barthelson, R., Hopkins, C. & Mobasser, A. (1999). Quantitation of bacterial adherence by image analysis. *J.Microbiol.Methods*, 38, 17-23.

Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O. Z., Wattiaux, R., Jacques, P. & De, D. C. (1964). Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochem.J.*, 92, 179-184.

Berge, A. & Sjobring, U. (1993). PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J.Biol.Chem.*, 268, 25417-25424.

- Bikker, F. J., Ligtenberg, A. J., End, C., Renner, M., Blaich, S., Lyer, S., Wittig, R., van't, H. W., Veerman, E. C., Nazmi, K., de Blicke-Hogervorst, J. M., Kioschis, P., Nieuw Amerongen, A. V., Poustka, A. & Mollenhauer, J. (2004). Bacteria binding by DMBT1/SAG/gp-340 is confined to the VEVLXXXXW motif in its scavenger receptor cysteine-rich domains. *J.Biol.Chem.*, 279, 47699-47703.
- Blondelle, S. E., Houghten, R. A. & Perez-Paya, E. (1996). Identification of inhibitors of melittin using nonsupport-bound combinatorial libraries. *J.Biol.Chem.*, 271, 4093-4099.
- Brandt, E. R., Sriprakash, K. S., Hobb, R. I., Hayman, W. A., Zeng, W., Batzloff, M. R., Jackson, D. C. & Good, M. F. (2000). New multi-determinant strategy for a group A streptococcal vaccine designed for the Australian Aboriginal population. *Nat.Med.*, 6, 455-459.
- Bray, A. M., Maeji, N. J. & Geysen, H. M. (1990). The simultaneous multiple production of solution phase peptides; assessment of the Geysen method of simultaneous peptide synthesis. *Tet.Lett.*, 31, 5811-5814.
- Brown, S. D. & Rybak, M. J. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* collected from patients across the USA, in 2001-2002, as part of the PROTEKT US study. *J.Antimicrob.Chemother.*, 54 Suppl 1, i7-15.
- Caparon, M. G., Stephens, D. S., Olsen, A. & Scott, J. R. (1991). Role of M protein in adherence of group A streptococci. *Infect.Immun.*, 59, 1811-1817.
- Chan, J. C. & Gadebusch, H. H. (1968). Virucidal properties of dimethyl sulfoxide. *Appl.Microbiol.*, 16, 1625-1626.
- Cho, K. H. & Caparon, M. G. (2005). Patterns of virulence gene expression differ between biofilm and tissue communities of *Streptococcus pyogenes*. *Mol.Microbiol.*, 57, 1545-1556.
- Cone, L. A., Woodard, D. R., Schlievert, P. M. & Tomory, G. S. (1987). Clinical and bacteriologic observations of a toxic shock-like syndrome due to *Streptococcus pyogenes*. *N.Engl.J.Med.*, 317, 146-149.
- Courtney, H. S., Dale, J. B. & Hasty, D. I. (1996). Differential effects of the streptococcal fibronectin-binding protein, FBP54, on adhesion of group A streptococci to human buccal cells and HEp-2 tissue culture cells. *Infect.Immun.*, 64, 2415-2419.
- Cue, D., Dombek, P. E., Lam, H. & Cleary, P. P. (1998). *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect.Immun.*, 66, 4593-4601.
- Cue, D., Southern, S. O., Southern, P. J., Prabhakar, J., Lorelli, W., Smallheer, J. M., Mousa, S. A. & Cleary, P. P. (2000). A nonpeptide integrin antagonist can inhibit epithelial cell ingestion of *Streptococcus pyogenes* by blocking formation of integrin alpha 5beta 1-fibronectin-M1 protein complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97, 2858-2863.

- Cunningham, M. W. (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin.Microbiol.Rev.*, 13, 470-511.
- Dale, J. B., Washburn, R. G., Marques, M. B. & Wessels, M. R. (1996). Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect.Immun.*, 64, 1495-1501.
- Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I. & Kent, S. B. (1994). Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, 266, 776-779.
- Dinkla, K., Rohde, M., Jansen, W. T., Carapetis, J. R., Chhatwal, G. S. & Talay, S. R. (2003a). Streptococcus pyogenes recruits collagen via surface-bound fibronectin: a novel colonization and immune evasion mechanism. *Mol.Microbiol.*, 47, 861-869.
- Dinkla, K., Rohde, M., Jansen, W. T., Kaplan, E. L., Chhatwal, G. S. & Talay, S. R. (2003b). Rheumatic fever-associated Streptococcus pyogenes isolates aggregate collagen. *J.Clin.Invest*, 111, 1905-1912.
- Drevets, D. A. & Elliott, A. M. (1995). Fluorescence labeling of bacteria for studies of intracellular pathogenesis. *J.Immunol.Methods*, 187, 69-79.
- Edwards, M. L., Fagan, P. K., Currie, B. J. & Sriprakash, K. S. (2004a). The fibronectin-binding capacity and host cell adherence of Streptococcus pyogenes strains are discordant with each other. *Microbes.Infect.*, 6, 1156-1162.
- Edwards, M. L., Fagan, P. K., Towers, R. J., Currie, B. J. & Sriprakash, K. S. (2004b). Inhibition of Streptococcus pyogenes adherence to HaCaT cells by a peptide corresponding to the streptococcal fibronectin-binding protein, SfbI, is strain dependent. *Microbes.Infect.*, 6, 926-928.
- Efstratiou, A. (2000). Group A streptococci in the 1990s. *J.Antimicrob.Chemother.*, 45 Suppl, 3-12.
- Eichler, J. (2003). *Kombinatorische Chemie. Methoden und Anwendungen*. Teubner Studienbücher Chemie.
- Fischetti, V. A., Jones, K. F. & Scott, J. R. (1985). Size variation of the M protein in group A streptococci. *J.Exp.Med.*, 161, 1384-1401.
- Fuller, M. E., Streger, S. H., Rothmel, R. K., Mailloux, B. J., Hall, J. A., Onstott, T. C., Fredrickson, J. K., Balkwill, D. L. & DeFlaun, M. F. (2000). Development of a vital fluorescent staining method for monitoring bacterial transport in subsurface environments. *Appl.Enviro.Microbiol.*, 66, 4486-4496.
- Guzman, C. A., Talay, S. R., Molinari, G., Medina, E. & Chhatwal, G. S. (1999). Protective immune response against Streptococcus pyogenes in mice after intranasal vaccination with the fibronectin-binding protein SfbI. *J.Infect.Dis.*, 179, 901-906.
- Hahn, A. (2002). Entwicklung von peptidischen Inhibitoren der zellulären Invasivität von *Streptococcus pyogenes*. *Diplomarbeit (HZI)*.

- Hancock, R. E. & Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97, 8856-8861.
- Hanski, E. & Caparon, M. (1992). Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 89, 6172-6176.
- Hiro-O Ito, Kiyoshi Nokihara, Sakiko Soutome & Takafumi Ohyama (2006). Screening of Peptides that Inhibit Bacterial Binding to Fibronectin using Combinatorial Peptide Libraries. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 12, 275-281.
- Horn, D. L., Zabriskie, J. B., Austrian, R., Cleary, P. P., Ferretti, J. J., Fischetti, V. A., Gotschlich, E., Kaplan, E. L., McCarty, M., Opal, S. M., Roberts, R. B., Tomasz, A. & Wachtfogel, Y. (1998). Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin? Report on a symposium. *Clin.Infect.Dis.*, 26, 1341-1345.
- Horstmann, R. D., Sievertsen, H. J., Knobloch, J. & Fischetti, V. A. (1988). Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 85, 1657-1661.
- Houghten, R. A., Pinilla, C., Blondelle, S. E., Appel, J. R., Dooley, C. T. & Cuervo, J. H. (1991). Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature*, 354, 84-86.
- Hytonen, J., Haataja, S. & Finne, J. (2006). Use of flow cytometry for the adhesion analysis of *Streptococcus pyogenes* mutant strains to epithelial cells: investigation of the possible role of surface pullulanase and cysteine protease, and the transcriptional regulator Rgg. *BMC.Microbiol.*, 6, 18.
- Jadoun, J., Ozeri, V., Burstein, E., Skutelsky, E., Hanski, E. & Sela, S. (1998). Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells. *J.Infect.Dis.*, 178, 147-158.
- Jaffe, J., Natanson-Yaron, S., Caparon, M. G. & Hanski, E. (1996). Protein F2, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, possesses two binding domains. *Mol.Microbiol.*, 21, 373-384.
- Jones, K. F., Hollingshead, S. K., Scott, J. R. & Fischetti, V. A. (1988). Spontaneous M6 protein size mutants of group A streptococci display variation in antigenic and opsonogenic epitopes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 85, 8271-8275.
- Kagan, B. L., Ganz, T. & Lehrer, R. I. (1994). Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology*, 87, 131-149.
- Kaplan, E. L., Chhatwal, G. S. & Rohde, M. (2006). Reduced ability of penicillin to eradicate ingested group A streptococci from epithelial cells: clinical and pathogenetic implications. *Clin.Infect.Dis.*, 43, 1398-1406.

- Kaplan, E. L. & Johnson, D. R. (1988). Eradication of group A streptococci from the upper respiratory tract by amoxicillin with clavulanate after oral penicillin V treatment failure. *J.Pediatr.*, 113, 400-403.
- Kishore, R. (1981). Radiolabeled microorganisms: comparison of different radioisotopic labels. *Rev.Infect.Dis.*, 3, 1179-1185.
- Kreikemeyer, B., Martin, D. R. & Chhatwal, G. S. (1999). SfbII protein, a fibronectin binding surface protein of group A streptococci, is a serum opacity factor with high serotype-specific apolipoproteinase activity. *FEMS Microbiol.Lett.*, 178, 305-311.
- Kreikemeyer, B., Talay, S. R. & Chhatwal, G. S. (1995). Characterization of a novel fibronectin-binding surface protein in group A streptococci. *Mol.Microbiol.*, 17, 137-145.
- Lancefield, R. C. (1928). The Antigenic Complex of *Streptococcus haemolyticus*. *J.Exp.Med.*, 91-103.
- Lancefield, R. C. (1933). A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. *J.Exp.Med.*, 57, 571-599.
- LaPenta, D., Rubens, C., Chi, E. & Cleary, P. P. (1994). Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91, 12115-12119.
- LeBlay G., Fliss, I. & Lacroix, C. (2004). Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cells with ELISA, radioactivity and plate count methods. *J.Microbiol.Methods*, 59, 211-221.
- Marouni, M. J., Barzilai, A., Keller, N., Rubinstein, E. & Sela, S. (2004). Intracellular survival of persistent group A streptococci in cultured epithelial cells. *Int.J.Med.Microbiol.*, 294, 27-33.
- Medina, E., Rohde, M. & Chhatwal, G. S. (2003). Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. *Infect.Immun.*, 71, 5376-5380.
- Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. *J.Am.Chem.Soc.*, 85, 2149-2154.
- Molinari, G. & Chhatwal, G. S. (1998). Invasion and survival of *Streptococcus pyogenes* in eukaryotic cells correlates with the source of the clinical isolates. *J.Infect.Dis.*, 177, 1600-1607.
- Molinari, G., Rohde, M., Guzman, C. A. & Chhatwal, G. S. (2000). Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells. *Cell Microbiol.*, 2, 145-154.
- Molinari, G., Talay, S. R., Valentin-Weigand, P., Rohde, M. & Chhatwal, G. S. (1997). The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the

- internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect.Immun.*, 65, 1357-1363.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods*, 65, 55-63.
- Mosoni, P., Fonty, G. & Gouet, P. (1997). Competition between ruminal cellulolytic bacteria for adhesion to cellulose. *Curr.Microbiol.*, 35, 44-47.
- Muir, T. W., Dawson, P. E. & Kent, S. B. (1997). Protein synthesis by chemical ligation of unprotected peptides in aqueous solution. *Methods Enzymol.*, 289, 266-298.
- Müller, H., End, C., Bhandiwad, A., Weiß, C., Renner, M., Bauer, J., Beedgen, B., Hafner, M., Mollenhauer, J. & Linderkamp, O. (2005). Pulmonale Expression von DMBT1 bei beatmeten Früh- und Neugeborenen. *Z Geburtshilfe Neonatol*, 209.
- Musser, J. M., Hauser, A. R., Kim, M. H., Schlievert, P. M., Nelson, K. & Selander, R. K. (1991). Streptococcus pyogenes causing toxic-shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 88, 2668-2672.
- Oehmcke, S., Podbielski, A. & Kreikemeyer, B. (2004). Function of the fibronectin-binding serum opacity factor of Streptococcus pyogenes in adherence to epithelial cells. *Infect.Immun.*, 72, 4302-4308.
- Ofek, I., Courtney, H. S., Schifferli, D. M. & Beachey, E. H. (1986). Enzyme-linked immunosorbent assay for adherence of bacteria to animal cells. *J.Clin.Microbiol.*, 24, 512-516.
- Olivier, C. (2000). Rheumatic fever--is it still a problem? *J.Antimicrob.Chemother.*, 45 Suppl, 13-21.
- Orain, D., Ellard, J. & Bradley, M. (2002). Protecting groups in solid-phase organic synthesis. *J.Comb.Chem.*, 4, 1-16.
- Ozeri, V., Tovi, A., Burstein, I., Natanson-Yaron, S., Caparon, M. G., Yamada, K. M., Akiyama, S. K., Vlodaysky, I. & Hanski, E. (1996). A two-domain mechanism for group A streptococcal adherence through protein F to the extracellular matrix. *EMBO J.*, 15, 989-998.
- Pichichero, M. E. (1991). The rising incidence of penicillin treatment failures in group A streptococcal tonsillopharyngitis: an emerging role for the cephalosporins? *Pediatr.Infect.Dis.J.*, 10, S50-S55.
- Pinilla, C., Appel, J. R. & Houghten, R. A. (1993). Synthetic peptide combinatorial libraries (SPCLs): identification of the antigenic determinant of beta-endorphin recognized by monoclonal antibody 3E7. *Gene*, 128, 71-76.
- Rinnová, M. & Lebl, M. (1996). Molecular Diversity and Libraries of Structures: Synthesis and Screening. *Collect.Czech.Chem.Comm.*, 171-231.

- Rocha, C. L. & Fischetti, V. A. (1999). Identification and characterization of a novel fibronectin-binding protein on the surface of group A streptococci. *Infect.Immun.*, 67, 2720-2728.
- Rohde, M., Muller, E., Chhatwal, G. S. & Talay, S. R. (2003). Host cell caveolae act as an entry-port for group A streptococci. *Cell Microbiol.*, 5, 323-342.
- Schrager, H. M., Alberti, S., Cywes, C., Dougherty, G. J. & Wessels, M. R. (1998). Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A Streptococcus to CD44 on human keratinocytes. *J.Clin.Invest*, 101, 1708-1716.
- Schulze, K., Medina, E., Talay, S. R., Towers, R. J., Chhatwal, G. S. & Guzman, C. A. (2001). Characterization of the domain of fibronectin-binding protein I of Streptococcus pyogenes responsible for elicitation of a protective immune response. *Infect.Immun.*, 69, 622-625.
- Schulze, K., Olive, C., Ebensen, T. & Guzman, C. A. (2006). Intranasal vaccination with SfbI or M protein-derived peptides conjugated to diphtheria toxoid confers protective immunity against a lethal challenge with Streptococcus pyogenes. *Vaccine*, 24, 6088-6095.
- Schwarz-Linek, U., Hook, M. & Potts, J. R. (2006). Fibronectin-binding proteins of gram-positive cocci. *Microbes.Infect.*, 8, 2291-2298.
- Schwarz-Linek, U., Pilka, E. S., Pickford, A. R., Kim, J. H., Hook, M., Campbell, I. D. & Potts, J. R. (2004). High affinity streptococcal binding to human fibronectin requires specific recognition of sequential F1 modules. *J.Biol.Chem.*, 279, 39017-39025.
- Sela, S., Aviv, A., Tovi, A., Burstein, I., Caparon, M. G. & Hanski, E. (1993). Protein F: an adhesin of Streptococcus pyogenes binds fibronectin via two distinct domains. *Mol.Microbiol.*, 10, 1049-1055.
- Sela, S. & Barzilai, A. (1999). Why do we fail with penicillin in the treatment of group A streptococcus infections? *Ann.Med.*, 31, 303-307.
- Shet, A., Kaplan, E. L., Johnson, D. R. & Cleary, P. P. (2003). Immune response to group A streptococcal C5a peptidase in children: implications for vaccine development. *J.Infect.Dis.*, 188, 809-817.
- Sierig, G., Cywes, C., Wessels, M. R. & Ashbaugh, C. D. (2003). Cytotoxic effects of streptolysin o and streptolysin s enhance the virulence of poorly encapsulated group a streptococci. *Infect.Immun.*, 71, 446-455.
- Stevens, D. L. (1995). Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg.Infect.Dis.*, 1, 69-78.
- Stollerman, G. H. (1997). Rheumatic fever. *Lancet*, 349, 935-942.

- Stromberg, A., Romanus, V. & Burman, L. G. (1991). Outbreak of group A streptococcal bacteremia in Sweden: an epidemiologic and clinical study. *J.Infect.Dis.*, 164, 595-598.
- Stryer, L. (1999). *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Talay, S. R., Valentin-Weigand, P., Jerlstrom, P. G., Timmis, K. N. & Chhatwal, G. S. (1992). Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect.Immun.*, 60, 3837-3844.
- Talay, S. R., Valentin-Weigand, P., Timmis, K. N. & Chhatwal, G. S. (1994). Domain structure and conserved epitopes of Sfb protein, the fibronectin-binding adhesin of *Streptococcus pyogenes*. *Mol.Microbiol.*, 13, 531-539.
- Talay, S. R., Zock, A., Rohde, M., Molinari, G., Oggioni, M., Pozzi, G., Guzman, C. A. & Chhatwal, G. S. (2000). Co-operative binding of human fibronectin to Sfb protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol.*, 2, 521-535.
- Tomasini-Johansson, B. R., Kaufman, N. R., Ensenberger, M. G., Ozeri, V., Hanski, E. & Mosher, D. F. (2001). A 49-residue peptide from adhesin F1 of *Streptococcus pyogenes* inhibits fibronectin matrix assembly. *J.Biol.Chem.*, 276, 23430-23439.
- Valentin-Weigand, P., Talay, S. R., Kaufhold, A., Timmis, K. N. & Chhatwal, G. S. (1994). The fibronectin binding domain of the Sfb protein adhesin of *Streptococcus pyogenes* occurs in many group A streptococci and does not cross-react with heart myosin. *Microb.Pathog.*, 17, 111-120.
- Zang, X., Yu, Z. & Chu, Y. H. (1998). Tight-binding streptavidin ligands from a cyclic peptide library. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 8, 2327-2332.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer typischen <i>S. pyogenes</i> -Kette, aufgenommen während der Infektion von HUVEC-Zellen (aus: (Rohde et al. 2003)).....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung a) des modularen Aufbaus von SfbI; b) Model der kooperativen Interaktion zwischen SfbI und humanem Fibronectin (modifiziert nach Talay (2000)). Nähere Erläuterungen im Text.	7
Abbildung 3: Darstellung der L- und D-Form der Aminosäure Alanin	11
Abbildung 4: Konzept der Festphasen-Peptidsynthese	13
Abbildung 5: Syntheseautomat Syro der Firma MultiSynTech, mit dem für die Synthese der Bibliothek benutzten Syntheseblock aus Metallplatten.....	25
Abbildung 6: Fluoreszenz-Mikrotiterplattenreader Wallac™ 1420 Multilabel Counter, rechts mit messbereiter FluoroNunc™-96-Well-Platte	43
Abbildung 7: Chromatogramm des ungereinigten 49mers.....	49
Abbildung 8: HPLC/ESI-MS-Chromatogramm des aufgereinigten 49mer a) Peak 1, b) Peak 2.....	50
Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten PYOT5	51
Abbildung 10: HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten DMBT1pbs1	52
Abbildung 11: Färbung von <i>S. pyogenes</i> A20 mit CellTracker™ CMAC und CMFDA56	
Abbildung 12: Färbung von <i>S. pyogenes</i> A20 mit SYTO 13	57
Abbildung 13: Färbung von <i>S. pyogenes</i> A20 mit Hoechst 33258.....	58
Abbildung 14: Internalisierungs-Assay nach dem Standardprotokoll mit HEp-2-Zellen und <i>S. pyogenes</i> A20:.....	59
Abbildung 15: Färbung von <i>S. pyogenes</i> A20 mit Fluorescein bzw. mit Biotin und Streptavidin-AlexaFluor®647	60
Abbildung 16: Färbung von <i>S. pyogenes</i> A20 mit Fluorescein und α -Fluorescein-Antikörper.....	61
Abbildung 17: Quantitative Analyse der <i>S. pyogenes</i> A20-Internalisierung nach der Markierung der Streptokokken mit 200 μ g/ml Fluoresceinisothiocyanat.	62
Abbildung 18: Antikörperfärbung von <i>S. pyogenes</i> A20 mit Antikörper im Eppendorf-Gefäß.....	63

Abbildung 19: Antikörperfärbung von <i>S. pyogenes</i> A20 mit Antikörper in der Mikrotiterplatte	64
Abbildung 20: Antikörperfärbung von <i>S. pyogenes</i> A20 (oben) bzw. <i>S. pyogenes</i> A8 (unten).....	65
Abbildung 21: Untersuchung der Peptide 49mer und T37Y in verschiedenen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay.....	68
Abbildung 22: Vergleich der Ergebnisse der inhibitorischen Aktivität des 49mers.	69
Abbildung 23: Untersuchung der Peptide 49mer (links) und T37Y (rechts) in verschiedenen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay mit GAS A20 und A8.....	70
Abbildung 24: Untersuchung des Peptides 31mer in verschiedenen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay.....	71
Abbildung 25: Untersuchung des Peptides DMBT1pbs1 in verschiedenen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay.....	73
Abbildung 26: Untersuchung des Peptides PyOT5 in verschiedenen Konzentrationen im Adhäsions- bzw. Invasionsassay.....	74
Abbildung 27: Untersuchung Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäure der Struktur xxx-o ₁ o ₂ -xxx-DKP im Adhäsionsassay.....	75
Abbildung 28: Untersuchung der Bibliothek lineare Peptide aus D-Aminosäuren der Struktur xxx-o ₁ o ₂ -xxx-DKP im Invasionsassay.	76
Abbildung 29: Einsatz der Subbibliothek xxx-ts-xxx-DKP in verschiedenen Konzentrationen.....	78
Abbildung 30: Vergleich der Originalsynthese mit der Nachsynthese bestimmter Positionen aus der linearen D-Aminosäure-Bibliothek.	79
Abbildung 31: Untersuchung der zyklischen Peptide der Struktur [aa-o ₁ o ₂ -aac]zyklo im Adhäsionsassay.....	80
Abbildung 32: Untersuchung der zyklischen Peptide der Struktur [aa-o ₁ o ₂ -aac]zyklo im Invasionsassay.	81
Abbildung 33 Einsatz der Sequenz [aa-ps-aac]zyklo in verschiedenen Konzentrationen.	83
Abbildung 34: Vergleich der Originalsynthese mit der Nachsynthese bestimmter zyklische Peptide.	84

Abbildung 35: Test der linearen Peptide auf einen zytotoxischen Effekt auf die HEp-2-Zellen.	85
Abbildung 36: Test der Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren der Struktur xxx-o ₁ o ₂ -xxx-DKP auf einen zytotoxischen Effekt auf die HEp-2-Zellen.....	86
Abbildung 37: Test der zyklischen Peptide der Struktur [aa-o ₁ o ₂ -aac]zyklo auf einen zytotoxischen Effekt auf die HEp-2-Zellen.	87
Abbildung 38: Konzentrationsabhängiger zytotoxischer Effekt der Sequenzen [aa-kq-aac]zyklo (links) und [aa-wf-aac]zyklo (rechts) auf HEp-2-Zellen.....	87
Abbildung 39: Vergleich der 1. und 2. Synthese einzelner zyklischer Peptide.....	88
Abbildung 40: Test der linearen Peptide auf einen möglichen bakteriostatischen Effekt auf <i>S. pyogenes</i> A20.	89
Abbildung 41: Test der Bibliothek linearer Peptide aus D-Aminosäuren der Struktur xxx-o ₁ o ₂ -xxx-DKP (eingesetzte Konzentration ca. 300 µM) auf einen möglichen bakteriostatischen Effekt auf <i>S. pyogenes</i> A20.....	90
Abbildung 42: Wachstumskurve von <i>S. pyogenes</i> A20 während der Präsenz der Peptide xxx-mf-xxx-DKP und xxx-dq-xxx-DKP.	91
Abbildung 43: Test der zyklischen Peptide der Struktur [aa-o ₁ o ₂ -aac]zyklo (eingesetzte Konzentration ca. 350 µM) auf einen möglichen bakteriostatischen Effekt auf <i>S. pyogenes</i> A20.....	92
Abbildung 44: Vergleich der 1. und 2. Synthese einzelner zyklischer Peptide.....	93
Abbildung 45: Schema der Bindung von SfbI an Fibronectin (modifiziert nach (Schwarz-Linek et al. 2006)).	97

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte	18
Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel	19
Tabelle 3: Liste der verwendeten Antikörper	20
Tabelle 4: Liste der benutzten Software	21
Tabelle 5: Sequenz des 49mers (Ozeri <i>et al.</i> 1996; Tomasini-Johansson <i>et al.</i> 2001) ...	22
Tabelle 6: Synthesezyklus bei der Synthese des 49mers	22
Tabelle 7: Sequenzen der Peptide PyOT5 und DMBT1pbs1	24
Tabelle 8: Standard-Synthesezyklus bei der Synthese von PyOT5 bzw. DMBT1pbs1 .	24
Tabelle 9: Ablauf eines Synthesezyklus	27
Tabelle 10: Abspaltung der permanenten Schutzgruppen	28
Tabelle 11: Gradienten zur Reinigung der linearen Kontrollpeptide	32
Tabelle 12: Gradient analytische HPLC	33
Tabelle 13: Gradient HPLC/ESI-MS (A: H ₂ O + 0,0 5% TFA, B: MeCN + 0,05 % TFA)	33
Tabelle 14: Verwendete <i>S. pyogenes</i> -Stämme.....	35
Tabelle 15: Ergebnisse der Aminosäurequantifizierung ausgewählter Positionen der linearen D-Aminosäure-Bibliothek.....	53
Tabelle 16: Ergebnisse der Aminosäurequantifizierung nachsynthetisierter zyklischer Peptide	54
Tabelle 17. Sequenzen der Peptide 49mer, T37Y und 31mer	66

6.4 Abkürzungsverzeichnis

In den nachfolgenden Listen werden in dieser Arbeit benutzte Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

6.4.1 Abkürzungen

Abkürzung	Erläuterung
AMP	antimikrobielles Peptid
ATCC	American Type Culture Collection
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonylgruppe
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CMAC	7-Amino-4-Chloromethylcoumarin
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein Diacetate
DCM	Dichlormethan
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DKP	Diketopiperazin
DMEM	Dulbecco`s Mod Eagle Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eq.	Äquivalent
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenyl-9-Methoxycarbonyl
g	Gramm
GAS	Gruppe A Streptokokken
h	Stunde
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluroniumhexafluorophosphate

Abkürzung	Erläuterung
HCl	Salzsäure
HEp-2	humane Rachenepithelzellen (ATCC CCL-23)
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-NS-2-Ethansulfonsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-Azabenzotriazol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC ₅₀	halbmaximale Inhibitorkonzentration
kDa	Kilodalton
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MeOH	Methanol
min	Minute
mM	Milimol
ml	Mililiter
MPAT	Abteilung Mikrobielle Pathogenität, HZI
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid
μM	Mikromol
μl	Mikroliter
nm	Nanometer
NMP	N-Methyl-2-Pyrrolidon
O	definierte Position einer Subbibliothek
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
o. g.	oben genannt
<i>p</i>	<i>p</i> -Wert
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMN	polymorphkernige Leukozyten
PyBOP	(1H-Benzotriazol-1-yl-Oxy)-Tris(Pyrrolidino)Phosphonium-Hexafluorophosphat
rpm	Umdrehung pro Minute
s.	siehe

Abkürzung	Erläuterung
<i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SfbI	<i>streptococcal fibronectin-binding protein I</i>
SLO	Streptolysin O
SLS	Streptolysin S
Spe	pyrogene Extotoxine von Streptokokken
STSS	<i>streptococcal toxic shock syndrome</i>
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-Tetramethyl-Uronium Tetrafluoroborate
TFA	Trifluoressigsäure
TSB	Tryptic Soy Broth
X	undefinierte Position einer Subbibliothek
z.B.	zum Beispiel

6.4.2 Verzeichnis der Aminosäuren

Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code	Bezeichnung
Ala	A	L-Alanin
Cys	C	L-Cystein
Asp	D	L-Asparaginsäure
Glu	E	L-Glutaminsäure
Phe	F	L-Phenylalanin
Gly	G	L-Glycin
His	H	L-Histidin
Ile	I	L-Isoleucin
Lys	K	L-Lysin
Leu	L	L-Leucin
Met	M	L-Methionin
Asn	N	L-Asparagin
Pro	P	L-Prolin
Gln	Q	L-Glutamin
Arg	R	L-Arginin
Ser	S	L-Serin
Thr	T	L-Threonin
Val	V	L-Valin
Trp	W	L-Tryptophan
Try	Y	L-Tyrosin

In dieser Arbeit verwendete D-Aminosäuren wurden mit einem Kleinbuchstaben im Einbuchstaben-Code benannt, so entspricht z.B. a = D-Alanin.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Werner Tegge für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die vielen Hilfen und Unterstützungen während der ganzen Arbeit.

Des weiteren danke ich Dr. Ronald Frank für die Unterstützung dieser Arbeit und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe Chemische Biologie.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. G.S. Chhatwal für seine Unterstützung während der Arbeit, der Bereitschaft, sämtliche mikrobiologischen Experimente in der Abteilung MPAT durchführen zu können sowie der Übernahme des Referats.

An dieser Stelle möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Chemische Biologie für die herzliche Aufnahme in die Gruppe, die kreativen Diskussionen und die Beantwortung zahlreicher Biologen-Fragen bedanken. Mein Dank gilt gleichfalls dem Team der Mikrobiellen Pathogenität für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft nicht nur im Laboralltag.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich immer unterstützt haben, sowie Iven für sein Verständnis und seine Unterstützung.