

1. Einleitung

Eine bedeutende Entwicklung in der modernen Medizin leitete die Entdeckung des Penicillins durch Flemming, Chain und Florey ein [1]. Diese Substanz, von dem Pilz *Penicillium notatum* produziert, zeichnete sich dadurch aus, dass sie das Wachstum grampositiver Bakterien verhinderte, indem sie die Synthese der Bakterienzellwand inhibierte. Die Verabreichung von Penicillin erwies sich als erfolgreiche Behandlung bakterieller Infektionen und führte rasch zu einem großen Bedarf an Antibiotika. Weitere Verbindungen wurden beschrieben, wie das Streptomycin [2], welches sich ebenfalls als erfolgreiches Antibiotikum erwies und erstmals die Heilung der Tuberkulose ermöglichte.

Heute steht mit den traditionellen Antibiotika ein breites Spektrum von Wirkstoffen zur Verfügung, die meist durch einen gezielten Eingriff in den Stoffwechsel von Bakterien ihre Wirkung entfalten. Diese Antibiotika wurden und werden in großem Umfang in der Medizin eingesetzt und haben zu einem starken Rückgang bakterieller Infektionen in der westlichen Welt geführt. Sie werden aber auch als Futterzusätze in der Tierzucht, insbesondere zur Therapie und zur Wachstumsförderung, eingesetzt [3]. Die daraus resultierende weite Verbreitung der Antibiotika in unserer Umwelt begünstigt die Entwicklung resistenter Stämme. Infolgedessen nehmen Infektionen mit resistenten und multiresistenten Bakterien besonders in Krankenhäusern zu und stellen vor allem in den Industrienationen ein zunehmendes Problem dar [4, 5].

In den Entwicklungsländern ist die Versorgung mit Antibiotika wesentlich schlechter und demzufolge treten hier bakterielle Infektionen häufiger auf, die in der westlichen Welt kaum noch eine Gefährdung darstellen. Von besonderer Bedeutung ist die Tuberkulose. Die Zahl der Infizierten wird weltweit auf 1,8 Milliarden geschätzt, das sind 32 % der Weltbevölkerung [6]. Dass auch hier die Resistenzentwicklung ernst genommen werden muss, zeigt die Tatsache, dass in

einigen asiatischen Staaten mehr als 10 % der Infektionen auf multiresistente Stämme von *Mycobacterium tuberculosis* zurückzuführen sind [7].

Trotz dieser Tatsachen nahm die Zahl neu zugelassener Antibiotika seit den 1980er Jahren kontinuierlich ab und neue Kandidaten sind nicht in Sicht [8-10]. Um der Zunahme an Resistenzen begegnen zu können, müssen neue Antibiotika, die an anderen Zielen in den Krankheitserregern angreifen, entwickelt werden. Die traditionellen Antibiotika sind mit Ausnahme einiger synthetischer Strukturen aus Bakterien und Pilzen isoliert beziehungsweise von diesen abgeleitet. Ihre Wirkung richtet sich überwiegend auf die Biosynthese der Proteine, der Nukleinsäuren, der Zellwand und der Folsäure [8]. Das angeborene Immunsystem höherer Organismen verfügt jedoch auch über Mechanismen bakterielle Infektionen abzuwehren, die uns zu neuen Wirkstoffen führen könnten, welche an anderen Zielstrukturen angreifen. Ein wichtiger Bestandteil dieses angeborenen Immunsystems sind die antimikrobiellen Peptide.

1.1. Entdeckung und Vorkommen antimikrobieller Peptide

Eine exakte begriffliche Abgrenzung für die antimikrobiellen Peptide existiert nicht. Üblicherweise werden unter diesem Begriff alle diejenigen Polypeptide aus bis zu 100 Aminosäuren zusammengefasst, die durch Gene kodiert sind, ribosomal exprimiert werden und eine antimikrobielle Wirkung zeigen. Zusätzlich existieren synthetische Peptide, die von den natürlichen antimikrobiellen Peptiden abgeleitet sind und daher ebenfalls dieser Gruppe zugerechnet werden. Diese Definition unterscheidet die antimikrobiellen Peptide jedoch von den meisten Peptidantibiotika der Pilze und Bakterien, die in speziellen Stoffwechselwegen nicht-ribosomal synthetisiert werden und häufig nicht-proteinogene Aminosäuren enthalten.

Erstmalig wurden antimikrobielle Peptide durch Boman *et al.* [11] in Studien des Immunsystems der Motte *Hyalophora cecropia*, beschrieben. Das Immun-

system der Insekten weist deutliche Unterschiede zu dem der Vertebraten auf, es verfügt zum Beispiel nicht über Lymphozyten und Immunglobuline. Dennoch konnte eine effektive Immunantwort der Puppen von *H. cecropia* auf eine bakterielle Infektion festgestellt werden. Unter den isolierten Proteinen und Peptiden, die für diese Reaktion verantwortlich waren, befand sich das bereits bekannte Lysozym. Es wurden aber auch bislang unbekannte Peptide gefunden, die im Gegensatz zum Lysozym auch eine Aktivität gegen gramnegative Bakterien aufwiesen [12]. Diese 35-39 Aminosäuren umfassenden Peptide wurden später „Cecropine“ genannt.

In den darauffolgenden Jahren wurde gezeigt, dass das Vorkommen antimikrobieller Peptide bei weitem nicht auf *H. cecropia* beschränkt ist. Vielmehr sind diese Peptide Bestandteil des angeborenen Immunsystems der Invertebraten und Vertebraten, einschließlich der Säugetiere, und sie treten auch in den Epithelien einiger Pflanzen auf [13-16]. Heute sind über 500 solcher Peptide bekannt (siehe „Antimicrobial Sequences Database“: <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/search.htm>), eine Auswahl ist in Tabelle 1 aufgeführt. Sie werden überwiegend im Epithelgewebe, in den Phagozyten der Vertebraten und in den Zellen der Hämolymphe der Invertebraten exprimiert. Die Expression erfolgt oft konstitutiv, sie kann aber durch Induktion verstärkt werden.

EINLEITUNG

Name	Herkunft	Gewebe	Sequenz	Lit.
Invertebraten				
Cecropin A	Cecropiamotte	Hämolymphe	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIKAGPAVAVVGQATQIAK-NH ₂	[11]
Tachyplesin	Pfeilschwanzkrebs	Hämolymphe	RWC ₁ FRVC ₂ YRGIC ₂ YRKC ₁ R-NH ₂	[17]
Androctonin	Skorpion	Hämolymphe	RSVC ₁ RQIKIC ₂ RRRGCC ₂ YYKC ₁ TNRPY	[18]
Andropin	Drosophila	Samenleiter	VFIDLDKVENAIHNAAQVGIGFAKPFKELINPK	[19]
Apidaecin	Biene	Hämolymphe	GNNRPVYISQPRPPHPRL	[20]
Vertebraten				
Magainin	Frosch	Haut	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS-NH ₂	[21]
Indolicidin	Rind	Granulozyten	ILPWKWPWWPWR-NH ₂	[22]
Dermaseptin	Frosch	Haut	ALWKTMLKKLGTMLHAGKAALGAAADTISQGTQ	[23]
LL-37	Mensch	Granulozyten	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE	[24]
Buforin II	Kröte	Magen	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	[25]
Protegrin 1	Schwein	Leukozyten	RGGRLC ₁ YC ₂ RRRFC ₂ VC ₁ VGR-NH ₂	[26]
Pflanzen				
γ-Thionin 5	Spinat	Epidermis	MFSSKKCKTVXKTFRGPCVRNAN	[27]
MBP-1	Mais	Keim	RSRGECRRQLRRHEGQPWETQECMRRRCRRRG	[28]

Tabelle 1: Auswahl einiger antimikrobieller Peptide und deren Vorkommen. Ein -NH₂ am Ende der Sequenz zeigt eine C-terminale Amidierung an.

1.2. Regulation der Biosynthese antimikrobieller Peptide

Die neben der konstitutiven Expression mögliche Induktion der Produktion antimikrobieller Peptide ist sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten weitgehend an die Aktivierung des angeborenen Immunsystems gekoppelt. Als Anzeichen einer mikrobiellen Infektion dienen die für pathogene Mikroorganismen typischen PAMP („pathogen-associated molecular patterns“). Dazu gehören zum Beispiel die Peptidoglykane, Lipopolysaccharide (LPS), Teichonsäuren, Lipoteichonsäuren und bakterielle Lipoproteine. Durch diese können generell zwei unterschiedliche Signalwege, die Toll- und die Imd-Signalkaskade,

aktiviert werden, welche bei *Drosophila* bereits sehr gut charakterisiert sind. Von besonderer Bedeutung für die Aktivierung scheinen hier die Peptidoglykane zu sein.

Grampositive Bakterien verfügen in ihrer Zellwand über Peptidoglykane des Lysintyps, die von dem Protein PGRP-SA (für „peptidoglycan-recognition protein“) extrazellulär gebunden werden [29]. Dies führt zu einer Aktivierung der Toll-Signalkaskade (Abbildung 1), an deren Ende es zu einer intrazellulären Freisetzung von Dif aus dem Dif/Cactus-Komplex kommt [30]. Das homologe Protein für Dif bei Vertebraten ist der Transkriptionsfaktor NFκB; es kommt

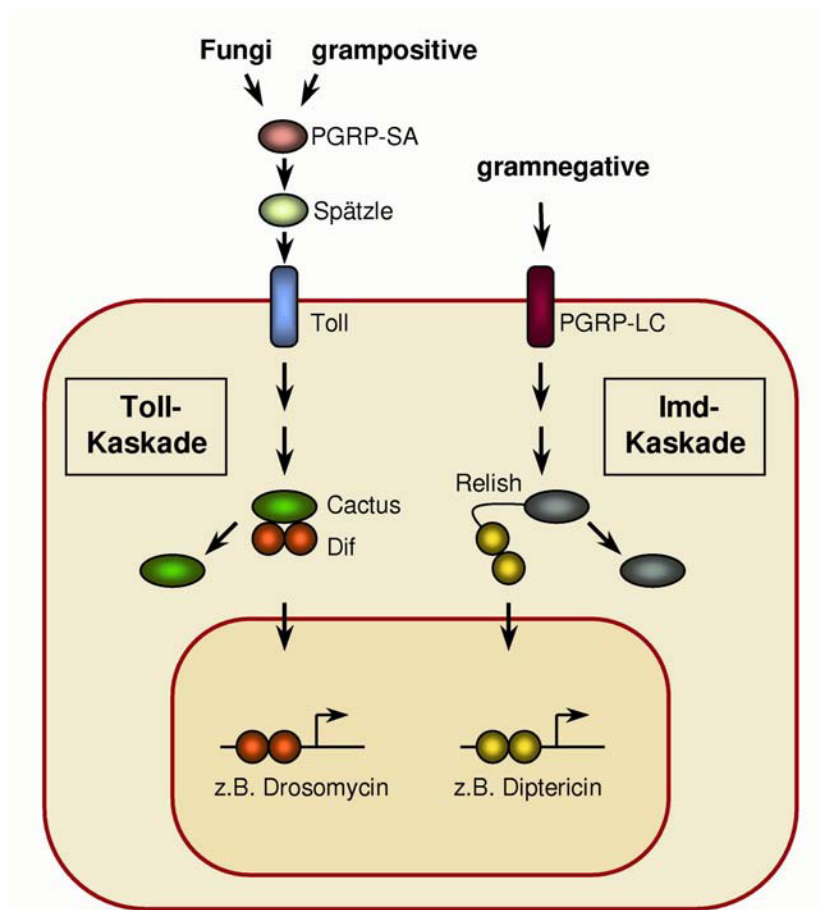


Abbildung 1: Aktivierung der Expression antimikrobieller Peptide bei *Drosophila*. Die Aktivierung der Genexpression antimikrobieller Peptide ist grundsätzlich auf zwei Wegen möglich. Die pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP) der Fungi und grampositiven Bakterien aktivieren in erster Linie die Toll-Kaskade und damit die Transkription unter Dif. Die PAMP der Gramnegativen führen zur Aktivierung des Imd-Weges und somit zur Transkription unter Relish.

somit zu einer Aktivierung der Genexpression unter anderem des Drosomycins, einem antimikrobiellen Peptid von *Drosophila*.

Gramnegative Bakterien hingegen verfügen über Peptidoglykane vom Diaminopimelinsäuretyp und werden über den membranständigen Rezeptor PGRP-LC erkannt [31]. Daraufhin wird die Imd-Kaskade aktiviert, an deren Ende es zur Aktivierung von Relish, ebenfalls ein NFκB-Homologes, und somit zur Genaktivierung kommt. Unter den Genprodukten befindet sich das antimikrobielle Peptid Diptericin. Das Auftreten zweier unterschiedlicher Signalkaskaden ermöglicht somit eine differenzierte Immunantwort und eine Expression spezifischer Peptide für Infektionen durch grampositive und gramnegative Bakterien.

Auch bei Vertebraten wird die Kontrolle der Expression über PAMP gesteuert. Von Bedeutung scheinen hier ebenfalls die Peptidoglykane aber auch die Lipopolysaccharide der Bakterien zu sein. So sind Peptidoglykane in der Lage den Toll-ähnlichen Rezeptor 2 (TLR2) zu aktivieren, LPS führt zur Aktivierung des TLR4 [32]. Die Toll-Signalkaskade mündet in der Aktivierung des NFκB und führt damit zur Expression antimikrobieller Peptide.

Das Produkt der Genexpression ist in der Regel ein Präpropeptid, das eine Erkennungssequenz für den Export in das endoplasmatische Retikulum trägt [33, 34]. Hier können weitere Modifikationen, wie proteolytische Spaltung, Amidierung des C-Terminus und Schließung von Disulfidbrücken, erfolgen. Je nach Art und Funktion des exprimierenden Gewebes erfolgt eine direkte Abgabe in den Extrazellulärraum [21, 35-37] oder eine Lagerung der Peptide, beziehungsweise ihre Vorläufer, in Granulen [38-40], damit sie im Bedarfsfall abgegeben werden können.

1.3. Unterteilung antimikrobieller Peptide

Der Versuch, antimikrobielle Peptide nach ihrer Primärstruktur zu klassifizieren, erweist sich aufgrund ihrer hohen Diversität und der großen Zahl der

bisher entdeckten Peptide als äußerst schwierig. Zwar existieren homologe Peptide in nah verwandten Spezies, bei denen eine Klassifizierung nach Sequenzähnlichkeiten möglich wäre, aber eine Gruppierung würde zu einer großen Zahl an Klassen mit nur wenigen Vertretern führen und wäre äußerst unpraktisch [41].

Es hat sich daher durchgesetzt, als Merkmal zur Klassifizierung die Sekundärstruktur zugrunde zu legen. Auf dieser Basis lassen sich grob vier Klassen unterscheiden (Abbildung 2).

1. lineare Peptide mit α -helikalen Strukturen, in der Regel nur aus einer α -Helix bestehend (z.B. Cecropin [42] und Magainin [43]).
2. β -Faltblattstrukturen, die oft durch eine oder mehrere Disulfidbrücken stabilisiert werden. Die Zahl der β -Faltblätter kann unterschiedlich sein (z. B. Tachyplesin [44] und Androctonin [45]).
3. Strukturen, in denen sowohl α -helikale Elemente als auch β -Faltblattstrukturen auftreten (z.B. das humane β -Defensin-1 [46]).
4. lineare nicht- α -helikale Strukturen, oft in gestreckter aber auch in Schleifenkonformation (z. B. Indolicidin [47]).

Neben dieser Klassifizierung anhand der Sekundärstruktur lassen sich einige antimikrobielle Peptide auch anhand eines auffällig häufigen Auftretens einer oder mehrerer Aminosäuren von anderen Peptiden unterscheiden. So spricht man zum Beispiel bei Bac5 [48] und PR-39 [49] von Prolin- und Arginin-reichen Peptiden, Indolicidin hat einen hohen Gehalt an Tryptophan und Histatin 5 [50] enthält viel Histidin. Unabhängig von der Klassifizierung verfügen jedoch fast alle antimikrobiellen Peptide über einen Überschuss basischer Aminosäuren, wodurch sie im neutralen pH-Bereich positiv geladen sind. Dies ist von großer Bedeutung für ihren Wirkungsmechanismus [41].

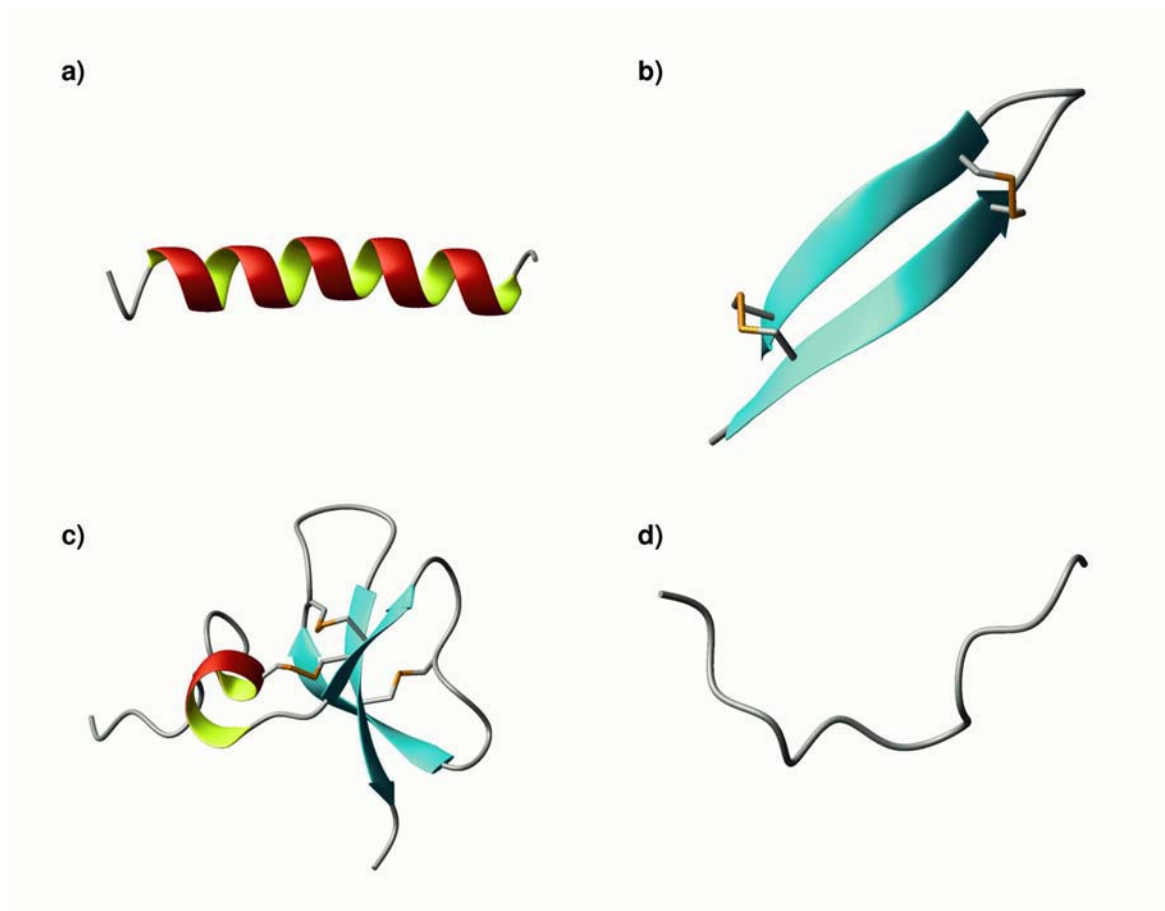


Abbildung 2: Strukturen antimikrobieller Peptide. a) Magainin bildet eine α -helikale Struktur, PDB-Kode: 2MAG. b) Das β -Faltblatt des Tachyplesin wird durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert, PDB-Kode: 1WO0. c) Humanes β -Defensin 1 bildet eine Struktur aus einer N-terminalen α -Helix und einem β -Faltblatt. Die Struktur wird durch drei Disulfidbrücken stabilisiert, PDB-Kode: 1KJ6. d) Indolicidin enthält weder α -helikale noch β -faltblattartige Strukturelemente, PDB-Kode: 1G89.

1.4. Wirkungsweise der antimikrobiellen Peptide

1.4.1. Membranpermeabilisierung

Die meisten der traditionellen Antibiotika wirken durch eine spezifische Interaktion mit einem Protein oder einem Protein-Nukleinsäure-Komplex. Den meisten der beschriebenen antimikrobiellen Peptide konnte kein solches Zielprotein zugeordnet werden. Als gesichert gilt, dass die wichtigste Wechselwirkung mit den Pathogenen an der Zytoplasmamembran der Bakterien stattfindet. Dieser

Membran kommt bei Bakterien eine besondere Bedeutung zu. Sie ist zum Einen die Abgrenzung zwischen Zellinnerem und Zelläußerem, sie ist aber auch gleichzeitig der Ort, an dem die chemischen Gradienten zur Energiegewinnung erzeugt werden. Ihre Integrität ist somit für den Mikroorganismus lebensnotwendig.

Sehr gut untersucht ist der Wirkungsmechanismus des Magainins, das eine amphipathische Helix bildet [43] und damit eine hydrophobe Wechselwirkung mit Membranen ermöglicht. Für Magainin wurde eine Wirkung auf Membranen der Mikroorganismen wie die Depolarisierung der Membran [51], die Bildung von Anionenkanälen [52] und die Lyse von Zellen [53] beschrieben. Tachyplesin ist in der Lage, die Zytoplasmamembran verschiedener Bakterien für Kaliumionen durchlässig zu machen [54] und Farbstoffe aus Membranvesikeln freizusetzen [55], Cecropin kann negativ geladene Liposomen zerstören [56]. Auch für die Peptide Protegrin 1 [57], Indolicidin [58] und Androctonin [59] sind ähnliche Membranpermeabilisierungen nachgewiesen worden. Diese Beispiele sind nur eine Auswahl und bei weitem nicht alle experimentellen Befunde, die für eine Permeabilisierung der Zytoplasmamembran als Grundlage der antimikrobiellen Wirkung sprechen. Der Ablauf einer solchen Permeabilisierung wird im Folgenden geschildert.

Da antimikrobielle Peptide in der Regel positiv geladen sind, kommt es durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen zu einer Anlagerung der Peptide an die anionische Zytoplasmamembran. Bei Erreichen einer Grenzkonzentration erfolgt die Permeabilisierung der Membran. Es wurden unterschiedliche Modelle vorgeschlagen, wie eine solche Permeabilisierung erreicht werden kann (Abbildung 3).

Bei dem sogenannten „barrel-stave“-Modell durchspannen mehrere Peptide in einem Komplex die Membran, so dass eine Pore nur durch die hydrophile Seite der Peptide gebildet wird [60]. Der Nachteil dieses Modells ist, dass es nur Peptiden die Porenbildung gestattet, deren hydrophober Bereich den hydrophoben Kern der Membran durchspannen kann. Auf relativ kurze antimikrobielle Peptide ist dieses Modell nicht anwendbar.

Beim toroidalen Modell wird durch die Peptide eine Spannung in der Zytoplasmamembran erzeugt, die zu einer positiven Krümmung der Lipidfläche führt, so dass ebenfalls eine Pore entsteht [61]. In diesem Fall sind sowohl die hydrophilen Bereiche der Peptide als auch die Kopfgruppen der Lipide an der Auskleidung der Pore beteiligt. Die Pore kann durchaus von kurzer Lebensdauer sein und nur einen instabilen Zwischenzustand darstellen. Dieses Modell hat den Vorteil, dass es auch Peptiden, die relativ kurz sind, die Bildung einer membran-durchspannenden Pore erlaubt. Die Peptide müssen nicht den gesamten hydrophoben Bereich der Membran vor dem Wasser abschirmen, da diese Aufgabe gleichsam von den Lipidkopfgruppen übernommen wird.

Ein alternatives Modell wurde von Shai mit dem „carpet“-Modell vorgeschlagen [62]. Auch hier ist der initiale Schritt die Bindung der kationischen Peptide an die anionischen Lipide der Plasmamembran der Bakterien. Eine weitere Akkumulation von Peptiden führt zur Ausbildung einer Schicht aus antimikrobiellen Peptiden auf einer Seite der Plasmamembran. Bei Erreichen einer Grenzkonzentration führt die Destabilisierung der Lipiddoppelschicht nicht zu einer Porenbildung, sondern zu einem Zusammenbruch und einer Auflösung der Membran. Für ein solches Modell spricht unter anderem die Tatsache, dass die Zyklisierung einiger linearer antimikrobieller Peptide nicht zu deren Inaktivierung führt, wie von den beiden oben genannten Modellen erwartet werden könnte [63].

Für die Monomere vieler antimikrobieller Peptide existieren Strukturdaten mit guter Auflösung, auch im membrangebundenen Zustand beziehungsweise gebunden an Mizellen. Eine Porenbildung wurde aber bisher nur mit niedrigauflösenden [61, 64], nicht aber mit hochauflösenden Strukturanalyseverfahren, beobachtet. Somit existiert kein exaktes Bild des permeabilisierenden Zustandes. Auch andere biophysikalische Methoden haben bisher nicht zu einem Modell geführt, das für alle antimikrobiellen Peptide Gültigkeit besäße.

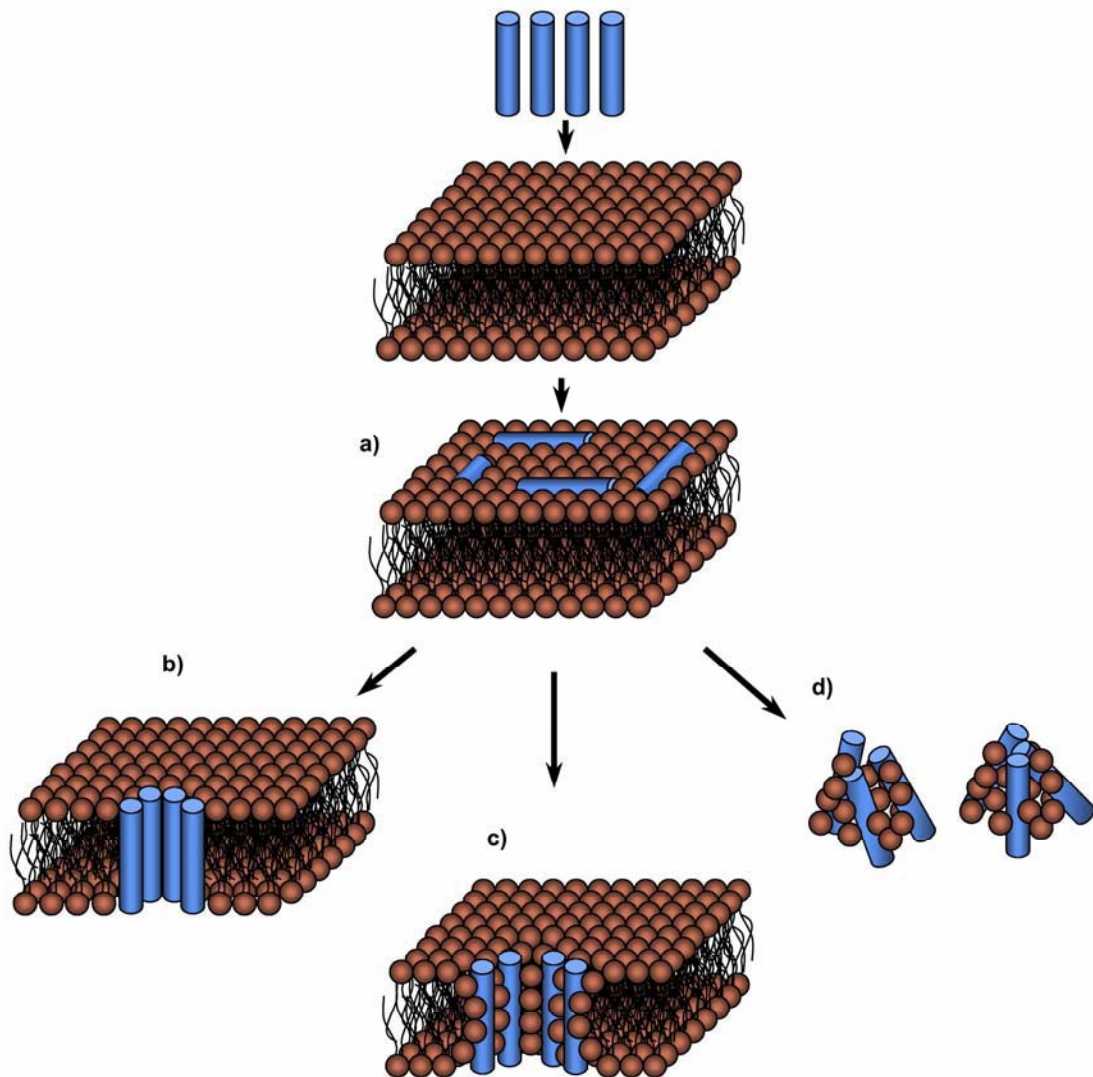


Abbildung 3: Membranpermeabilisierung durch antimikrobielle Peptide. Es existieren mehrere Modelle, wie antimikrobielle Peptide eine Permeabilisierung der Zytoplasmamembran der Bakterien erreichen. a) Im ersten Schritt erfolgt eine Einlagerung der Peptide durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen in die Plasmamembran. Diesen Schritt haben alle drei Modelle gemeinsam. b) Beim barrel-stave-Modell kommt es nach Erreichen einer Grenzkonzentration zu einer Porenbildung, bei der die Peptide allein den Poreinnenraum bilden. c) Ebenfalls eine Porenbildung beschreibt das toroidale Modell, allerdings sind Lipidkopfgruppen an der Porenbildung beteiligt. Es tritt eine positive Krümmung in der Lipidoberfläche auf. d) Nach dem carpet-Modell kommt es aufgrund der Destabilisierung zu einem Kollaps der Membran.

Nur für wenige Peptide sind andere Wirkungsweisen vorgeschlagen worden. Zu diesen alternativen Mechanismen zählt die Induktion autolytischer Enzyme [65-67] und die Hemmung der Protein- und DNS-Synthese durch eine Bindung

der Peptide an die DNS [68, 69]. Um an ihre intrazellulären Ziele zu gelangen, müssen aber auch diese Peptide die bakterielle Membran überwinden. Da für sie keine aktive Aufnahme ins Zellinnere festgestellt werden konnte, wird eine selbständige Penetration der Membran angenommen. Die erste wichtige Interaktion mit dem Pathogen findet also auch hier an der Zytoplasmamembran statt.

1.4.2. Selektivität für bakterielle Membranen

Um bei einer Immunantwort die bakterielle Zytoplasmamembran aber nicht die körpereigenen Plasmamembranen zu attackieren, müssen Unterscheidungsmerkmale existieren, die diese Spezifität ermöglichen. Als ein Selektivitätskriterium wird die unterschiedliche Zusammensetzung der bakteriellen Membran und der Membran höherer Organismen angesehen. Bakterielle Membranen sind üblicherweise reich an anionischen Lipiden [70, 71]. Im Vergleich dazu ist die Außenseite eines Erythrozyten als Repräsentant einer Säugorzelle durch das Vorhandensein zwitterionischer Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine und Sphingomyeline neutral [72, 73]. Das begünstigt eine Interaktion der meist kationischen Peptide mit der bakteriellen Membran durch elektrostatische Wechselwirkung. Die höhere Affinität führt zu einer stärkeren Akkumulation der Peptide an der Zielmembran, so dass die Grenzkonzentration eher erreicht wird, als bei der körpereigenen Membran.

Die bakterielle Membran ist auch der Ort, an dem die oxidative Phosphorylierung stattfindet. Daher liegt an der Membran ein starkes Potential an, mit dem Zellinneren als negativen Pol. Dadurch wird die obengenannte elektrostatische Wechselwirkung und damit die Selektivität verstärkt [74]. Ein weiterer Unterschied ist das Vorhandensein von Cholesterol in den Plasmamembranen höherer Organismen. Daraus resultieren andere mechanische Eigenschaften in der Membran, die im Zusammenhang mit einer reduzierten Bindung amphipathischer Moleküle an diese Membranen diskutiert werden [75, 76].

Gramnegative Bakterien verfügen zusätzlich über eine äußere Membran, die überwunden werden muss (Abbildung 4). Sie ist reich an Lipopolysacchariden,

diese besitzen Bindungsstellen für Calcium- und Magnesiumionen [77], die für die strukturelle Stabilität der äußeren Membran von Bedeutung sind. Es ist bekannt, dass antimikrobielle Peptide an Lipopolysaccharide, speziell an das Lipid A (Abbildung 5) binden können und damit die äußere Membran permeabilisieren beziehungsweise zerstören können [58, 78, 79]. Dieser Prozess wird als „self-promoted uptake“ bezeichnet und ermöglicht den Peptiden, zur Zytoplasmamembran der Bakterien vorzudringen.

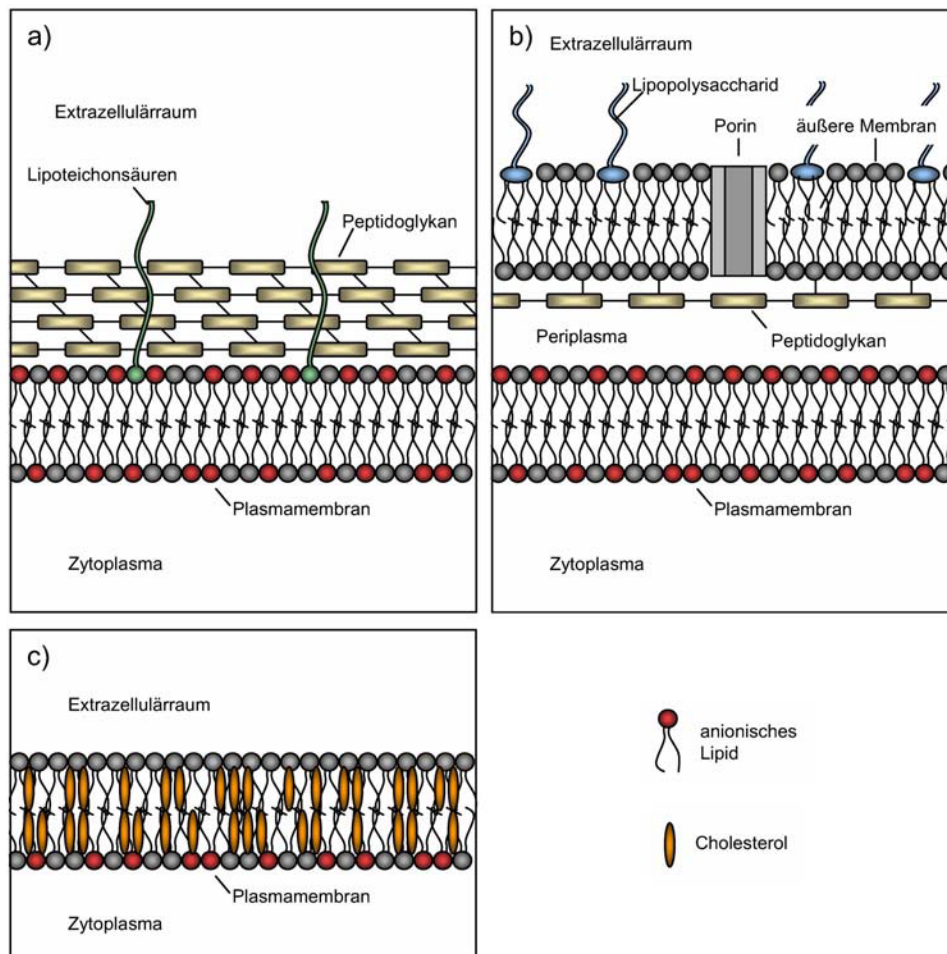


Abbildung 4: Vergleich der zellulären Abgrenzungen. a) grampositive Bakterien, b) gramnegative Bakterien, c) Erythrozytenmembran. Von Bedeutung für die Selektivität sind die anionischen Lipide in den Plasmamembranen der Grampositiven und Gramnegativen, sowie das Cholesterin in den Membranen höherer Organismen. Die äußere Membran der Gramnegativen wird durch den sogenannten self-promoted uptake überwunden.

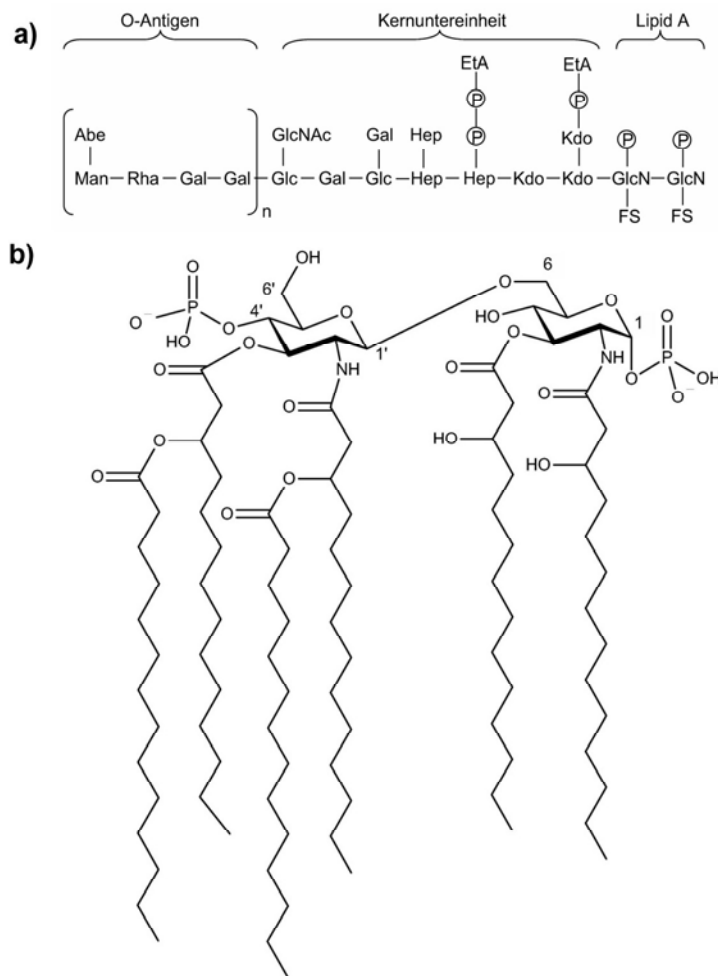


Abbildung 5: Lipopolysaccharid a) Lipopolysaccharid von *Salmonella*; Abe - Abequose; Man - Mannose; Rha - Rhamnose; Gal - Galaktose; Glc - Glukose; GlcNAc - Acetylglukosamin; Hep - Heptose; Kdo - 2-Keto-3-desoxyoctonsäure; GlcN - Glukosamin; P - Phosphat; FS - Fettsäuren. b) Struktur der Lipid-A-Komponente, die Kernuntereinheit befindet sich am 6'-Kohlenstoff.

1.4.3. Resistenz gegen antimikrobielle Peptide

Obwohl antimikrobielle Peptide zum Standardrepertoire des Immunsystems höherer Organismen gehören und pathogene Mikroorganismen ihnen somit häufig ausgesetzt sind, ist es bisher nur in wenigen Fällen zur Resistenzbildung gekommen [41]. Wie bereits erwähnt, stellen antimikrobielle Peptide eine in Primär- und Sekundärstruktur heterogene Gruppe von Peptiden dar, so dass kein einheitliches Strukturmotiv existiert, an dem sie vom Pathogen erkannt und unschädlich gemacht werden können. Zudem wird in der Regel eine Mischung

unterschiedlicher antimikrobieller Peptide vom Wirt produziert. Damit ein Stamm an Bakterien einen besonderen Selektionsvorteil erhielte, müsste er entweder alle Peptide erkennen und abwehren oder die Zielstruktur, auf welche die Peptide wirken, entscheidend verändern.

Einige gramnegative Bakterien sind in der Lage, die Ladung und Beschaffenheit ihrer äußeren Membran, insbesondere des Lipopolysaccharids, zu modulieren und dadurch widerstandsfähiger gegen antimikrobielle Peptide zu werden [80-82]. Diese Veränderung in der äußeren Membran führt zu einer Einschränkung des self-promoted uptake aber nicht zur vollständigen Resistenz gegen antimikrobielle Peptide.

Der Hauptangriffspunkt der antimikrobiellen Peptide, die Zytoplasmamembran, wird jedoch bei Resistenzbildungen anscheinend nicht verändert, obwohl dies sicher der direkte Weg wäre, eine Resistenz zu erreichen. Es stellt sich daher die Frage, warum Bakterien im Unterschied zu höheren Organismen anionische Lipide in großen Mengen in ihrer Membran besitzen, obwohl es sie auf so primitive Weise verwundbar macht. Die Ursache könnte in der besonderen Funktion der bakteriellen Membran als Erzeugungsort der elektrochemischen Gradienten für die ATP-Synthese begründet sein. Alle Membranen, an denen solche Protonengradienten erzeugt werden, also auch Mitochondrien- und Chloroplastenmembranen, sind reich an anionischen Lipiden. Offenbar spielen sie eine besondere Rolle in der Organisation des Protonengradienten [83]. Um eine Veränderung der Membranzusammensetzung zu ermöglichen, müsste also neben der Lipidzusammensetzung der Membran die bakterielle ATP-Erzeugung grundlegend verändert werden. Dies schränkt die Möglichkeit der Resistenzentwicklung ein. Diese Tatsache ist eine günstige Ausgangslage, will man antimikrobielle Peptide oder Verbindungen mit ähnlicher Funktion als Antibiotika therapeutisch einsetzen.

1.5. Arginin- und tryptophanreiche antimikrobielle Peptide

1.5.1. Interaktionen von Tryptophan und Arginin mit Membranen

Um zu verstehen, wie antimikrobielle Peptide mit Membranen interagieren, ist es von Nutzen, eine Vorstellung darüber zu besitzen, welche Prinzipien Wechselwirkungen von Proteinen mit Membranen zugrunde liegen. Eine besondere Bedeutung kommt der Lipid-Wasser-Grenzfläche zu, die eine chemisch komplexe Umgebung darstellt. Über die Grenzregion erstreckt sich ein Polaritätsgradient, von apolar in der Nähe der Lipid-Acylketten bis zu starker Polarität in der wässrigen Phase [84]. Mit den Lipidkopfguppen existiert eine Vielzahl von Partnern für nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen. Betrachtet man die Strukturen von Membranproteinen, so sind in diesen Regionen besonders häufig die aromatische Aminosäure Tryptophan aber auch die kationischen Aminosäuren Arginin und Lysin zu finden [84]. Auch biophysikalische Untersuchungen kommen zu dem Ergebnis, dass Tryptophan und Arginin, aber auch Tyrosin und Lysin, eine Affinität zu Membrangrenzflächen haben [85, 86] und daher von struktureller Bedeutung für Membranproteine sind [87].

Die Tryptophanseitenkette stellt mit ihrem Indol eine ideale Struktur zur Interaktion mit der Grenzfläche dar, da die Benzokomponente hydrophob ist, während die Pyrrolkomponente der Struktur ein schwaches Dipolmoment verleiht und Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht [84]. Ebenfalls eine amphipathische Struktur stellen die Seitenketten der kationischen Aminosäure Arginin dar, die aus einer hydrophoben Alkylkette und einer geladenen Gruppe mit Wasserstoffdonoren bestehen [84].

1.5.2. Vorkommen in natürlichen antimikrobiellen Peptiden

Es ist zu erwarten, dass die Aminosäuren Tryptophan und Arginin aufgrund ihrer Präferenz für die Membrangrenzfläche häufig in antimikrobiellen Peptiden auftreten. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über solche arginin- und tryptophanreichen Peptide. Hervorzuheben ist das Lactoferricin B, ein antimikrobielles Peptid, das durch den gastrischen Pepsinverdau aus dem bovinen Lactoferrin entsteht [88]. Es wurde gezeigt, dass das N-terminale Dekapeptid-Fragment allein bereits über eine antimikrobielle Wirkung verfügt [89]. Basierend auf

Name	Sequenz	Lit.
argininreiche Peptide		
Polyphemusin-1	RRWC ₁ FRVC ₂ YRGFC ₂ YRKC ₁ R-NH ₂	[91]
Tachyplesin-1	RWC ₁ FRVC ₂ YRGIC ₂ YRKC ₁ R-NH ₂	[17]
Androctonin	RSVC ₁ RQIKIC ₂ RRRGGC ₂ YYKC ₁ TNRPY	[18]
Protegrin-1	RGGRLC ₁ YC ₂ RRRFC ₂ VC ₁ VGR-NH ₂	[26]
MBP-1	RSGRGECRRQCLRRHEGQPWETQECMRRCRRRG	[28]
tryptophanreiche Peptide		
Indolicidin	ILPWKWPWWPWR-NH ₂	[22]
Puroindoline-A-Fragment	FPVTWRWWKWWKG	[92]
arginin- und tryptophanreiche Peptide		
Tritrpticin	VRRFPWWWPFLRR	[93]
Lactoferricin-B-Fragment	RRWQWR	[90]
synthetische Peptide aus kombinatorischen Bibliotheken		
-	Ac-RRWWRF-NH ₂ ; Ac-RRWWCR-NH ₂	[94]
-	RWRWRW-NH ₂ ; RRRWWW-NH ₂	[95]

Tabelle 2: Arginin- und tryptophanreiche antimikrobielle Peptide. Ein -NH₂ am Ende der Sequenz zeigt eine C-terminale Amidierung an. Bei den synthetischen Peptiden steht ein Ac- am Beginn der Sequenz für eine N-terminale Acetylierung.

dieser Erkenntnis wurde versucht, das Peptid weiter zu verkürzen und es zeigte sich, dass das Fragment RRWQWR für die Aktivität verantwortlich ist [90]. Da diese besonders kurze Sequenz ein guter Ausgangspunkt für die Entwicklung antimikrobieller Wirkstoffe ist, stand es im Fokus weiterer Studien (siehe Kapitel 1.5.3).

1.5.3. Synthetische Bibliotheken tryptophan- und argininreicher Peptide

Die Entwicklung der kombinatorischen Chemie hat es ermöglicht, mit relativ geringem Aufwand riesige synthetische Bibliotheken von Peptiden oder anderen organischen Verbindungen herzustellen [96]. Das systematische Durchsuchen dieser Bibliotheken nach biologisch aktiven Verbindungen gilt als vielversprechender Ansatz, um zu neuen Leitstrukturen bei der Entwicklung neuer Medikamente zu gelangen.

Durch den Einsatz solcher synthetischer Peptidbibliotheken wurden, unabhängig von der Entdeckung der natürlich vorkommenden tryptophan- und argininreichen Peptide, sehr kurze Peptide mit antimikrobieller Aktivität entdeckt [97]. Es handelte sich dabei überwiegend um Hexapeptide mit acetyliertem N-Terminus und amidiertem C-Terminus, die sich durch ihren hohen Gehalt an Tryptophan und Arginin auszeichneten. Unter den aktivsten Peptiden befand sich unter anderem eines mit der Sequenz Ac-RRWWRF-NH₂ [94], auf das später noch genauer eingegangen wird. Die minimalen inhibitorischen Konzentrationen (MIC) bewegten sich im unteren mikromolaren Bereich und es wird angenommen, dass sie wie die meisten antimikrobiellen Peptide die Funktion der bakteriellen Membran stören [98].

Basierend auf der Lactoferricin-B-Sequenz wurden ebenfalls kombinatorische Bibliotheken erzeugt [95]. Hier wurde schrittweise versucht, die Kernsequenz zu verkürzen und durch Veränderung der Sequenzabfolge die Aktivität zu optimieren. Es zeigte sich, dass die Tryptophane und Arginine dieser Peptide von großer Bedeutung waren. Es konnte jedoch kein Sequenzmuster festgestellt

werden, das für die Aktivität essentiell wäre. Die minimalen inhibitorischen Konzentrationen lagen ebenfalls im unteren mikromolaren Bereich.

1.5.4. Die cyclo(RRWWRWF)-Sequenz

In den Arbeiten von Dathe *et al.* wurde das antimikrobiell aktive RRWWRWF-Motiv, das durch kombinatorische Bibliotheken entdeckt wurde, durch eine Peptidbindung zwischen N- und C-Terminus zyklisiert [99] (Abbildung 6a). Es zeigte sich, dass diese Zyklisierung zu einer deutlichen Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität führt (Tabelle 3). Die minimale inhibitorische Konzentration gegen *Escherichia coli*, als Vertreter der Gramnegativen, und *Bacillus subtilis*, als Vertreter der Grampositiven, sank auf ein Zehntel im Vergleich zur linearen Sequenz. Die Zyklisierung des Rückgrates bewirkte aber auch eine Zunahme der Lyse humaner Erythrozyten, was als Maß für die Zytotoxizität antimikrobieller Peptide gilt. Da die MIC auf ein Zehntel sank, sich die Erythrozytenlyse aber nur verdreifachte, wird durch die Zyklisierung nicht nur die antimikrobielle Aktivität, sondern auch die Selektivität für bakterielle Membranen verbessert.

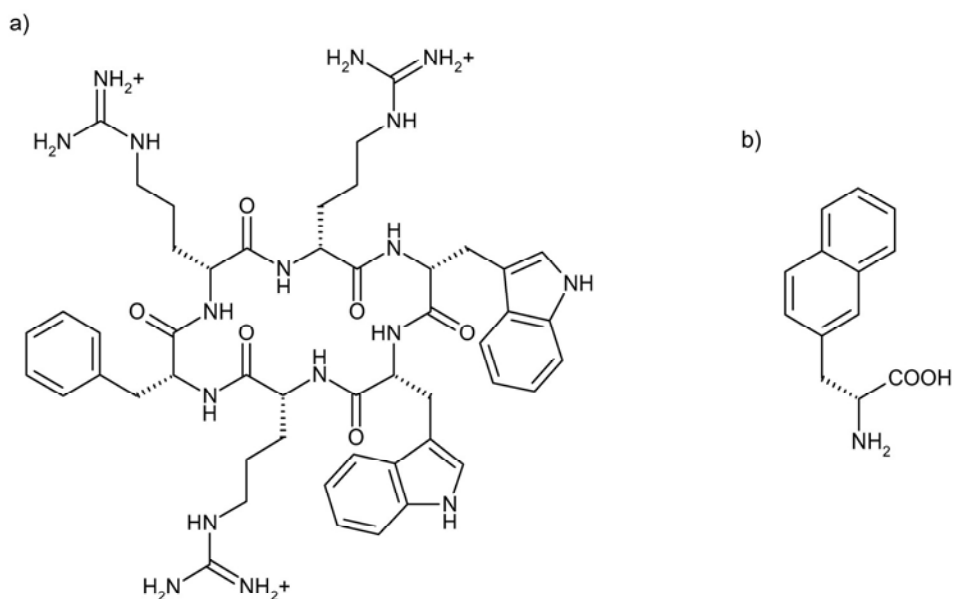


Abbildung 6: Strukturformel des a) cyclo(RRWWRWF) und b) L-β-(2-Naphtyl)-alanin.

EINLEITUNG

Name	Sequenz	MIC E. coli [μM]	MIC B. subtilis [μM]	Erythrozytenlyse bei 100 μM [%]
lineare R-/W-Peptide				
RW	Ac-RRWWRF-NH ₂	>100	25,0	7,3
RW2	Ac-RRWWFR-NH ₂	125	31,3	7,6
RW3	Ac-RRWFWR-NH ₂	125	31,3	6,1
RW4	Ac-RWRFWR-NH ₂	125	31,3	4,4
RW5	Ac-FRWWRN-NH ₂	>125	15,6	6,3
zyklische R-/W-Peptide				
c-RW	cyclo(RRWWRF)	6,3	3,1	24,4
c-RW2	cyclo(RRWWFR)	3,9	3,9	28,1
c-RW3	cyclo(RRWFWR)	2,0	3,9	18,5
c-RW4	cyclo(RWRFWR)	7,8	3,9	22,8
c-RW5	cyclo(FRWWRN)	15,6	3,9	13,9
zyklische R-/W-Peptide mit D-Aminosäuren				
c-RWd1	cyclo(rRWWRF)	15,6	3,9	18,9
c-RWd2	cyclo(RrWWRF)	15,6	3,9	10,8
c-RWd3	cyclo(RRwWRF)	15,6	7,8	10,1
c-RWd4	cyclo(RRWwRF)	7,8	3,9	13,6
c-RWd5	cyclo(RRWWrF)	7,8	7,8	8,9
c-RWd6	cyclo(RRWWRF)	15,6	3,9	10,6
substituierte zyklische Peptide				
c-KW	cyclo(KKWWKF)	25,0	25,0	10
c-RY	cyclo(RRYRFR)	>100	>100	3
c-RNal	cyclo(RRNalNalRF)	12,5	1,5	34

Tabelle 3: Biologische Aktivität arginin- und tryptophanreicher Hexapeptide. Nal - L- β -(2-Naphtyl)-alanin.

Es wurde weiterhin eine Reihe analoger linearer und zyklischer Peptide synthetisiert, um zu verstehen, welche Voraussetzungen hinsichtlich der Primärstruktur und der funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten gegeben sein müssen, um ein aktives Peptid zu erhalten. Es zeigte sich dabei, dass die Positionen einzelner Aminosäuren in der Sequenz anscheinend

willkürlich verschoben werden können, ohne die biologischen Aktivitäten in nennenswerter Weise zu beeinflussen [100, 101]. Ebenso ist es möglich, an beliebiger Position die L-Aminosäuren durch D-Aminosäuren zu ersetzen, ohne die Aktivität zu zerstören [100, 101].

Von Bedeutung ist jedoch die Art der Seitenketten [99]. Ein Ersetzen der drei Arginine durch Lysine führt zu einer deutlichen Verringerung der antimikrobiellen Aktivität sowie der Erythrozytenlyse. Noch deutlicher wirkt sich die Substitution der beiden Tryptophane durch Tyrosine aus. Das resultierende Peptid war ohne jede nennenswerte antimikrobielle Aktivität und auch die Zytotoxizität in Form der Erythrozytenlyse ging stark zurück. Das Analogon, in dem die Tryptophane durch L- β -(2-Naphtyl)-alanin (Abbildung 6b) ersetzt waren, wies nur geringe Veränderungen der MIC auf. Es konnte aber eine leichte Erhöhung der Erythrozytenlyse für dieses Peptid festgestellt werden.

Um zu prüfen, ob auch diese zyklischen Peptide ihre Wirkung durch eine Permeabilisierung der bakteriellen Membran erreichen, wurde untersucht, ob die Peptide in der Lage sind, Membranvesikel zu zerstören [99]. Es zeigte sich dabei, dass sowohl lineare als auch zyklische Peptide Membranvesikel permeabilisierten, so dass der Farbstoff Calcein freigesetzt wurde. Die Konzentrationen, in denen die Peptide dafür eingesetzt werden mussten, entsprachen den Bereichen, in denen auch eine Hemmung des Bakterienwachstums auftrat.

Diese zyklischen Peptide gehören somit zu den kleinsten bekannten antimikrobiellen Peptiden und weisen im Vergleich mit anderen Vertretern eine hohe Aktivität auf. Um ausgehend von diesen Peptiden zu neuen Verbindungen mit antibiotischer Wirkung zu gelangen ist eine detaillierte Kenntnis der Wirkungsweise dieser Peptide von großem Vorteil. Informationen über die räumliche Struktur eines Peptides oder Proteins in seinem aktiven Zustand lassen in der Regel Rückschlüsse auf das Funktionsprinzip zu, somit ist es erforderlich, diese Peptide strukturell zu charakterisieren, besonders im membrangebundenen Zustand.

1.6. Geeignete Methoden zur Strukturuntersuchung an antimikrobiellen Peptiden

Wie bereits erläutert wurde, gilt die bakterielle Plasmamembran als der Interaktionsort, an dem die antimikrobiellen Peptide ihre toxische Wirkung entfalten. Um genauere Einblicke in deren Funktion zu erhalten, ist es sinnvoll, Strukturinformationen besonders im membrangebundenen Zustand und mit hoher Auflösung zu gewinnen. Im Folgenden wird erklärt, welche Methoden in diesem konkreten Fall besonders geeignet sind, die gewünschten Strukturdaten mit atomarer Auflösung zu liefern.

1.6.1. NMR-Spektroskopie

Generell existieren mit der Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR) und der Röntgenkristallographie zwei Verfahren, die eine Strukturaufklärung von Proteinen und Peptiden mit atomarer Auflösung erlauben. Für die Untersuchung der Strukturen kleinerer Peptide wird aber der NMR-Spektroskopie oft der Vorzug gegeben. Einer der Vorteile ist hierbei, dass auf den oft langwierigen Prozess einer Kristallzucht verzichtet werden kann, die für die Röntgenkristallographie unerlässlich ist. Das ist von besonderer Bedeutung, wenn man membrangebundene Peptide untersuchen will, da die Kristallisation von Protein- bzw. Peptid-Membran-Systemen sich äußerst schwierig gestaltet.

Peptide im Komplex mit Lipiden können auf unterschiedliche Arten durch NMR-Spektroskopie untersucht werden. Dabei bestimmen die Relaxationszeit des Komplexes, die unter anderem vom Molekulargewicht abhängt, welche NMR-Techniken einzusetzen sind. Durch mizellbildende Detergenzien kann eine Lipid-Wasser-Grenzfläche nachgebildet werden. Ein Komplex aus solchen Mizellen und Peptiden ist mit den Methoden der Lösungs-NMR zugänglich (Abbildung 7). Dieses Verfahren wurde bereits mehrfach angewendet, um

Raumstrukturen membranassoziierter Peptide zu bestimmen [102-104], und hat sich auch bereits bei der Untersuchung antimikrobieller Peptide bewährt [47, 105-109].

An Lipiddoppelschichten gebundene Peptide sind durch die Methoden der Lösungs-NMR aufgrund der Größe der Systeme jedoch nicht zugänglich. Hier müssen spezielle Verfahren der Festkörper-NMR angewendet werden. Zum einen existiert die Möglichkeit, durch magic-angle-spinning-NMR (MAS-NMR) membrangebundene Peptide strukturell zu charakterisieren [110-113]. Trotz vielversprechender Entwicklungen auf diesem Gebiet [114, 115] sind die Aussichten, zu hochaufgelösten Strukturen zu gelangen, im Vergleich mit der Lösungs-NMR an mizellgebundenen Peptiden derzeit relativ gering.

Eine weitere Möglichkeit, mittels Festkörper-NMR zu strukturellen Informationen zu gelangen, besteht darin, die Lipiddoppelschichten parallel auszurichten und somit eine einheitliche Orientierung im Magnetfeld zu schaffen. Diese Methode ist geeignet, die Orientierung eines Moleküls oder einzelner Gruppen zu bestimmen, aber nicht um eine detaillierte Raumstruktur zu erhalten [116, 117].

Aus diesen Gründen eignet sich hier besonders die Lösungs-NMR in Verbindung mit Detergenzmizellen, um die aktive Konformation der besprochenen antimikrobiellen Peptide zu untersuchen. Ein sehr häufig eingesetztes Detergenz ist das Dodecylphosphocholin (DPC), dargestellt in Abbildung 8. Die Phosphocholin-Kopfgruppe ist zwitterionisch, was zu einer ungeladenen Mizelloberfläche führt. Da die Zielmembran antimikrobieller Peptide einen hohen Gehalt an anionischen Lipiden hat, ist es ebenfalls interessant, ein anionisches Detergenz einzusetzen. Ein solches ist das Natriumdodecylsulfat (SDS).

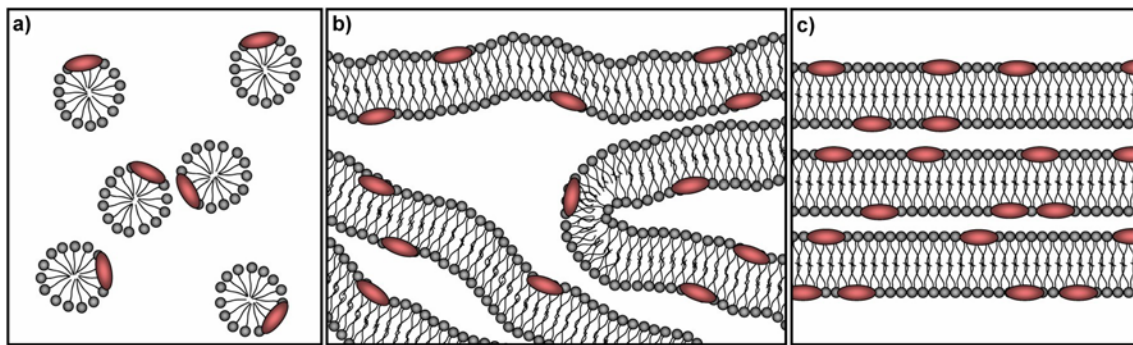


Abbildung 7: Für Strukturuntersuchungen mittels NMR-Spektroskopie geeignete Lipidsysteme. a) Mizellgebundene Peptide können durch Lösungs-NMR untersucht werden. b) Peptide an ungeordneten Lipiddoppelschichten können mittels Festkörper-magic-angle-spinning-NMR (MAS-NMR) untersucht werden. c) Orientierte Lipiddoppelschichten, zum Beispiel zwischen Glasplatten, sind ebenfalls durch Methoden der Festkörper-NMR zugänglich.

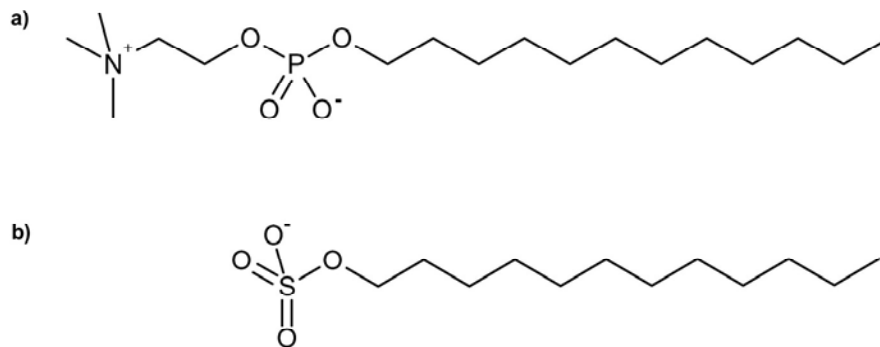


Abbildung 8: Mizellbildende Detergenzien. a) Dodecylphosphocholin (DPC) bildet als zwitterionisches Detergenz neutrale Mizellen. b) Dodecylsulfat (SDS) bildet anionische Mizellen.

1.6.2. Moleküldynamiksimulation

Am Ende der NMR-Strukturbestimmung steht ein sogenanntes „simulated annealing“, eine Moleküldynamikrechnung auf der Basis der NMR-Strukturinformationen. Durch diese Rechnung wird die Raumstruktur bestimmt, allerdings findet sie unter Vakuumbedingungen statt. Ist zu erwarten, dass die Umgebung des zu untersuchenden Moleküls einen erheblichen Einfluss auf dessen Konformation hat, ist es angebracht, das Ergebnis der Strukturrechnung mit Blick auf dieses Problem zu überprüfen. In der Regel wird dann eine weitere Moleküldynamiksimulation, ein sogenanntes Refinement, durchgeführt. Aller-

dings geschieht das nicht unter Vakuumbedingungen, sondern es wird in einer expliziten Lösungsumgebung gerechnet.

Da im vorliegenden Fall das Peptid in einer Lipidumgebung auftritt, sollte ein entsprechendes Refinement auch in einem adäquaten System durchgeführt werden. Da es sich bei einer Lipid-Wasser-Grenzfläche um ein chemisch komplexes System handelt, ist deren Simulation in einer Moleküldynamik sehr anspruchsvoll. Sie wird dennoch relativ häufig durchgeführt [118], da sie wertvolle Einblicke in Lipidsysteme auf atomarem Niveau liefert, die mit experimentellen Methoden aufgrund der ungeordneten Natur der physiologisch relevanten flüssig-kristallinen Phase nur indirekt oder gar nicht zugänglich sind. Es bietet sich an, experimentell gut charakterisierte Lipidsysteme zu simulieren, um sie mit diesen Daten vergleichen zu können. Solche gut dokumentierten Lipidsysteme für die Moleküldynamik sind Doppelschichten aus Phosphatidylcholin (PC), wie zum Beispiel das Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, Abbildung 9) [119]. Die Bedingungen, unter denen eine Simulation realitätsgetreu möglich ist, wurden eingehend untersucht [120]. Dieses System wurde bereits mehrfach erfolgreich für die Simulation von Proteinen und Peptiden in Membranen eingesetzt [121-126].

Ein wichtiger Aspekt, neben der Verifizierung der NMR-Struktur, ist die Möglichkeit, Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen Peptiden und Lipiden zu erhalten und zu verstehen, wie sich diese Wechselwirkungen auf generelle Membraneigenschaften auswirken. Eine sorgfältig ausgeführte Peptid-Lipid-Simulation kann auf diese Weise zum Verständnis der Wirkung der antimikrobiellen Peptide beitragen.

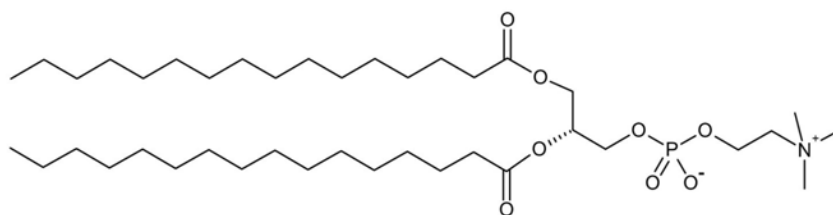


Abbildung 9: Dipalmitoylphosphatidylcholin.

1.7. Zielsetzung

Um das Wirkungsprinzip der antimikrobiellen Peptide für medizinische Anwendungen nutzbar zu machen, ist ein genaues Verständnis der Mechanismen erforderlich, die der Aktivität zugrunde liegen. Eine Kenntnis der Struktur der Peptide und der Wechselwirkung mit ihrer Zielstruktur, der Bakterienmembran, ist daher notwendig.

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Struktur und die Mechanismen der arginin- und tryptophanreichen zyklischen Peptide zu charakterisieren. Dazu sollten mittels der NMR-Spektroskopie die Konformation des Peptides $\text{cyclo}(\text{RRWWRF})$ gebunden an Mizellen sowie in wässriger Lösung bestimmt werden. Weiterhin sollten die Lokalisation und die Orientierung des Peptides im mizellgebundenen Zustand untersucht werden. Eine vergleichende strukturelle Charakterisierung weiterer Peptide, genauer der verwandten Sequenzen $\text{cyclo}(\text{KKWWKF})$, $\text{cyclo}(\text{RRYYRF})$, $\text{cyclo}(\text{RRNalNaIRF})$, $\text{cyclo}(\text{RRWWFR})$ sowie $\text{cyclo}(\text{RRWFWR})$, sollte Einblicke in die Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion gewähren.

Die aus den NMR-Strukturuntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse sollten in einer Moleküldynamiksimulation des $\text{cyclo}(\text{RRWWRF})$ -Peptides gebunden an eine Dipalmitoylphosphatidylcholin-Membran (DPPC) hinsichtlich der Konformation und Art der Insertion überprüft werden. Ein weiteres Ziel der Moleküldynamiksimulation war es, wichtige Peptid-Lipid-Wechselwirkungen zu identifizieren und deren Einflüsse auf Membraneigenschaften festzustellen.

Aus den gewonnenen Daten sollten Schlüsse hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen der Struktur und der Funktion der Peptide gezogen werden. Diese gewonnenen Erkenntnisse sollten abschließend durch den Entwurf, die Synthese und die Bestimmung der biologischen Aktivität neuer geeigneter nicht-peptidischer Verbindungen überprüft werden.