

# 1 Einleitung

## 1.1 Traditionelle Antibiotika & Antibiotikaresistenz

„There may be danger, though, in underdosage. It's not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing may occasionally happen in the human body“

Sir Alexander Fleming bei seiner Nobelpreis-Rede 1945

Der Nobelpreis für Physiologie und Medizin wurde 1945 an Sir A. Fleming, E.B. Chain und Sir H.W. Florey verliehen. Sie erhielten den Preis für die Entdeckung des Penicillins, einer von dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* ausgeschiedenen Substanz, welche einen heilungsfördernden Effekt bei Infektionen aufweist. Diese Entdeckung war der Grundstein für das schnell anwachsende Gebiet der Antibiotikaforschung. Im Verlauf dieser Forschung wurde eine Vielzahl von weiteren Substanzen stichprobenartig auf ihre antibiotische Wirkung hin untersucht. Eine der untersuchten und erfolgreichsten Substanzen war das Vancomycin (1).

Wie auch das Penicillin gehört Vancomycin zu den „traditionell“ wirkenden Antibiotika. Diese Substanzklasse zeichnet sich dadurch aus, dass sie bestimmte essentielle Stoffwechselwege inhibiert, wie z.B. die Synthese der Zellwand. Weitere Ziele sind die Proteinsynthese (Erythromycin und Tetracycline stören die Ribosomenfunktion), mRNA-Synthese (Rifampicin wirkt störend auf die RNA-Polymerase ein), DNA-Replikation (Quinolone inhibieren entsprechende Enzyme) bzw. die DNA-Synthese (Sulfonamide) (2,3).

Der intensive Einsatz der traditionellen Antibiotika hat zunächst z.B. zu einer Abnahme der Todesfälle in den Industrienationen geführt, welche als Folge einer *Mycobacterium tuberculosis*-Infektion (Tuberkulose) entstanden (4). Ironischerweise ist der vermehrt-intensive Einsatz von Antibiotika der primäre Grund für deren zunehmende Wirkungslosigkeit. Überdosierungen und Antibiotikamissbrauch (z.B. die grundsätzliche Verwendung von Antibiotika als Futterzusätze) haben es Bakterien ermöglicht, widerstandsfähiger zu werden (5-7). So zeigt z.B. ein in Korea gefundene *Staphylococcus aureus*-Art 98% Resistenz gegenüber Penicillin oder *Enterococcus faecium* 70% gegenüber Ampicillin (2,8). Selbst Methicillin und Vancomycin, die erst dann zum Einsatz kommen, wenn die Standardantibiotika ineffektiv geworden sind, verlieren zunehmend an Wirkung, und so wurden steigende Zahlen an vancomycinresistenten Bakterien (z.B. *Enterococcus spp.*) von der World Health Organisation (WHO) in den letzten Jahrzehnten gemeldet (entsprechende Berichte unter <http://www.who.int/en/>).

Zusätzlich zu einem angepassteren Umgang mit den traditionellen Antibiotika ist es notwendig, nach neuen Strategien für eine effektive Infektionsbehandlung und nach neuen Antibiotika mit neuem Wirkmechanismus zu suchen (9). Vor diesem Hintergrund bieten gerade die Peptidantibiotika, welche dem angeborenen Immunsystem zuzuordnen sind, vielversprechende Ansatzmöglichkeiten.

## 1.2 Antimikrobielle Peptide: Entdeckung & Vorkommen

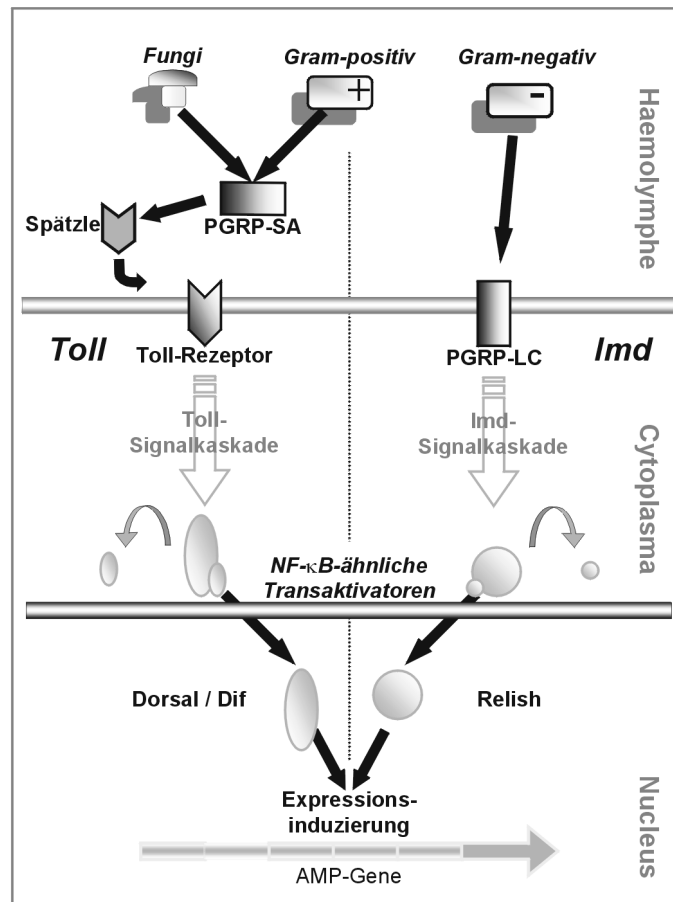
Aufgrund der weltweiten Zunahme an antibiotikaresistenten Bakterienstämmen, vor allem den Erregern der Lungenentzündung, den Pneumokokken, hat sich die Forschung auf dem Gebiet der antimikrobiellen Peptide (AMP) in den letzten Jahren stark intensiviert. Die Anfänge liegen jedoch in den 80er Jahren, als der schwedische Forscher Hans Boman und seine Kollegen der Universität von

Peptidbezeichnung	Herkunft	Vorkommen	Literatur
<b>Invertebraten</b>			
Tachyplesin	Tachyplesus tridentatus / Pfeilschwanzkrebs	Hämolymphe	(10)
Myticin	Mytilus galloprovincialis / Muschel	Hämozyte	(11)
Defensin	Phormia terranova / Fliege	Fettkörper	(12)
<b>Vertebraten</b>			
Tachykinin	Agalychnis callidryas / Frosch	Haut	(13)
TAP	Artiodactyla (Bos) / Rind	Luftröhre	(14)
Defensin	Homo sapiens / Mensch	Tränenflüssigkeit	(15)
Lactoferricin	Artiodactyla (Bos) / Rind	Milch	(16)
PBD-1	Artiodactyla (Sus) / Schwein	Zunge	(17)
hBD1/2	Homo sapiens / Mensch	Lunge	(18)
Buforin I/II	Bufo bufo garagrizans / Kröte	Magenschleimhaut	(19)
Bin1b	Rodentia (Rattus) / Ratte	Epididymis	(20)
RK-1	Lagomorpha / Hase	Niere	(21)
Lactoferrin	Homo sapiens / Mensch	Leukozyte	(22)
Piscidin	Morone saxatilis x M. chrysops / Fisch	Mastzelle	(23)
Defensin-6	Homo sapiens / Mensch	Paneth-Zelle	(24)
MCP-1/2	Lagomorpha / Hase	Makrophage	(25)
NP-1	Lagomorpha / Hase	Neutrophil	(26)

**Tabelle 1 / Antimikrobielle Peptide im Tierreich** Überblick über das vielfältige Vorkommen von AMP in den unterschiedlichen Spezies und auch Zellen bzw. Geweben.

Stockholm sich mit der Immunabwehr bei der Puppe von *Hyalophora cecropia* befassten. Insekten, welche keine Lymphocyten oder Immunglobuline besitzen, sollten demnach ein sich von den Vertebraten unterscheidendes Immunsystem aufweisen. Boman und Steiner konnten eine effektive humorale Immunantwort bei Puppen von *H. cecropia* nach einer Infektion mit Bakterien aufzeigen (27). Als wichtiger Bestandteil dieser Immunantwort konnten verschiedene antimikrobielle Peptide isoliert und später charakterisiert werden (28). Neben dem bekannten Lysozym konnten aus der

Hämolymphe der Puppen sieben verschiedene sog. „Cecropine“ isoliert werden (29). Die Cecropine, 35-39 Aminosäurereste groß, zeigten gegenüber Penicillin-resistenten Staphylococcus-Bakterien eine vergleichbare hohe Aktivität wie Melittin (30). Im Gegensatz zu dem Melittin, welches ein Bestandteil des Bienentoxins ist, das auch Zellen höherer Organismen zerstört, wiesen die Cecropine nur Aktivitäten gegen Bakterien auf. In den darauffolgenden Jahren konnten die Arbeitsgruppe von Boman und einige andere zeigen, dass AMP sehr weit in der Natur verbreitet sind und sowohl bei Flora als auch Fauna zu finden sind (eine Zusammenfassung geben folgende Übersichtsartikel (31-35)). Die AMP können bei Invertebraten und Vertebraten als die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene betrachtet werden und sind entsprechend verstärkt in Epithelgeweben vorzufinden (36). Viele der AMP, welche sich im Körperinneren nachweisen ließen, sind nicht freier Bestandteil des Blutes oder der Lymphe, sondern werden in spezialisierten Zellen gelagert (Tabelle 1). Die AMP werden zu jeder Zeit, z.T. auch in bakteriziden Konzentrationen, produziert (37). Die Expression der AMP kann jedoch durch Entzündungssignale wie die Interleukine gesteigert werden (31,38). Die jüngsten Forschungen zeigen, dass die AMP-Expression durch verschiedene Signalpfade, wie den „Immunschwäche“- (Immune deficiency, Imd), den Toll- und den Toll-ähnlichen Rezeptor- (Toll-like receptors, TLRs) Pfad, reguliert werden. In Säugern bestimmt das angeborene Immunsystem eine erste schnelle Antwort auf eine Infektion und aktiviert gleichzeitig das adaptive Immunsystem (37). Insekten teilen Merkmale dieser angeborenen Immunabwehr. In beiden Gruppen können Pathogene anhand von Interaktionen sog. Muster-Erkennungsrezeptoren (Pattern recognition receptors, PRRs) mit stereotypischen mikrobiellen Strukturen erkannt werden (39). Allerdings, ungleich den TLRs, welche selbst PRRs repräsentieren, interagiert Toll nicht direkt mit mikrobiellen Komponenten (40). Beispiele für mikrobielle Muster sind  $\beta$ -1,3-Glucan der Pilze, Peptidoglycan und Lipopolysaccharide (LPS) der Bakterien und Phosphoglycan der Parasiten. Viele PRRs konnten bei Invertebraten und Vertebraten identifiziert werden (41). Bei den Mammalia zeigte sich, dass die verschiedenen TLRs unterschiedlich auf mikrobielle Komponenten reagierten. So erkennt, im Gegensatz zu TLR4, TLR2 Gram-positive Bakterien. TLR4 hingegen ist offensichtlich selektiv für LPS (42). Eine Differenzierung zeigt sich auch bei den Insecta. Hier wird der Toll-Pfad hauptsächlich durch Gram-positive Bakterien und Fungi aktiviert. Der Imd-Pfad, welcher größtenteils durch Gram-negative Bakterien aktiviert wird, kontrolliert ebenfalls die Regulation der AMP-Expression (43) (Abbildung 1).



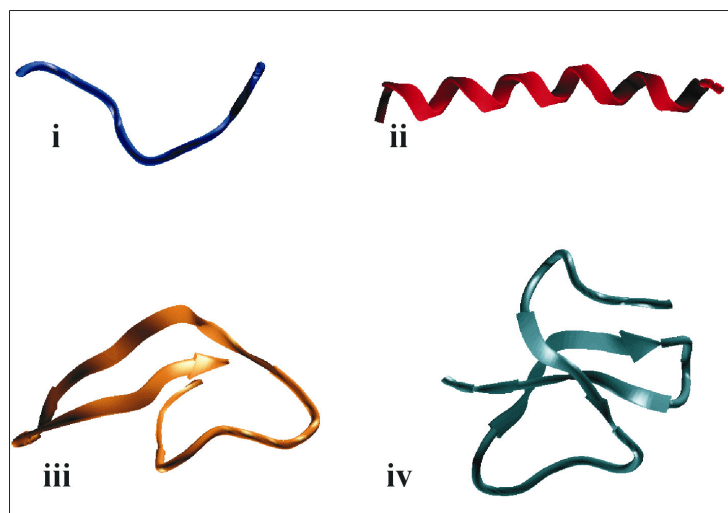
**Abbildung 1 / Toll- & Imd-Pfade zur Regulation der angeborenen Immunantwort** Der Toll- und der Imd-Pfad dienen zur Regulation der antimikrobiellen Immunantwort in *Drosophila*. AMP-Gene werden von den NF- $\kappa$ B-ähnlichen Proteinen Dorsal und Dif bzw. Relish in ihrer Expression reguliert und bilden somit das Ende zweier distinkter Signalkaskaden: der Toll-Pfad, welcher prinzipiell durch Pilze und Gram-positive Bakterien aktiviert wird und der „Immune deficiency“ (Imd)-Pfad, der größtenteils durch Gram-negative Bakterien aktiviert wird. PGRP-SA (Peptidoglycan recognition proteins, PGRPs) zirkulieren frei umher und sind notwendig für die Toll-Aktivierung als Reaktion auf Gram-positive Bakterien. PGRP-LC ist ein mutmaßlicher Rezeptor zur Erkennung bakterieller Muster und ist erforderlich für die Aktivierung des Imd-Pfades. In Säugern wird die Signaltransduktion durch Toll-ähnliche Rezeptoren (Toll-like receptors, TLRs) aktiviert (Details im Text).

Wie erwähnt wurde, unterliegt die Expression der AMP der Kontrolle von Signalkaskaden. Viele der bisher bekannten und entsprechend untersuchten AMP werden als größere Präkursorsequenzen, welche eine oder mehrere Kopien des aktiven AMP-Segmentes enthalten, exprimiert und durch proteolytisches Prozessieren freigesetzt (44-46). Zusätzlich zu der Fähigkeit, mit Membranen auf biophysikalischer Basis zu interagieren (s.u., 1.3 Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide), weisen möglicherweise AMP verschiedene Funktionen auf, die direkt mit einer Immunreaktion in Verbindung stehen. So wurde z.B. beschrieben, dass AMP die Chemoattraktion von Monozyten stimulieren (37,47).

### 1.3 Klassifizierung der antimikrobiellen Peptide

Wie weiter oben schon beschrieben wurde, sind AMP weit verbreitet und konnten aus Organismen des Tier- und Pflanzenreiches isoliert werden. Aufgrund der hohen strukturellen Diversität der Moleküle ist es schwer, sie in allgemein anerkannten Gruppen zu kategorisieren. Dennoch kann man sie zur besseren Übersicht nach Größe, räumlicher Struktur und vorherrschender Aminosäurestruktur gruppieren (Abbildung 2). Auf dieser Basis lassen sich folgende vier Hauptgruppen unterscheiden (31,48,49):

- Gruppe 1: lineare Peptide mit einer  $\alpha$ -helikalen Struktur (z.B. Cecropin (Insecta), Magainin (Amphibia))
- Gruppe 2:  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, welche mit Disulfidbindungen stabilisiert werden (z.B. Tachyplesin (Xiphosura), Defensin (Vertebrata))
- Gruppe 3: Peptide mit einer oder mehreren vorherrschenden Aminosäuren (z.B. PR-39 (Artiodactyla), Drosocin (Insecta))
- Gruppe 4: Peptide mit Schleifenstrukturen (z.B. Ranalexin (Amphibia), Bactanecin (Artiodactyla))



**Abbildung 2 / Beispiele von Strukturen für die vier Klassen von antimikrobiellen Peptiden** Modelle von antimikrobiellen Peptidmolekülen der verschiedenen Strukturklassen aus der Proteindatenbank (Protein data bank, <http://www.rcsb.org/pdb/index.html>): i) Gestreckt-spiralförmige Struktur des Indolicidins vom Rind (PDB-Nummer 1G89). ii)  $\alpha$ -helikale Struktur des Magainins (PDB-Nummer 2MAG). iii) Cysteinbindungsstabilisierte  $\beta$ -Schleifen des humanen Defensins (PDB-Nummer 1DFN). iv) Dreisträngige  $\beta$ -Faltblattstruktur des humanen  $\beta$ -Defensin 2 (PDB-Nummer 1FQQ), welche zusätzlich ein  $\alpha$ -helikales Segment am N-terminus trägt (Software: SYBYL<sup>®</sup> 6.9 Tripos Inc., USA). (Abbildung mit freundlicher Unterstützung von Gunnar Kleinau, FMP, Abt. NMR-unterstützte Strukturforchung)

Obwohl anionische und kationische AMP bekannt sind, ist die Zahl der AMP, welche bei neutralem pH-Wert eine positive Ladung tragen, wesentlich größer (32). Aufgrund der Häufigkeit der

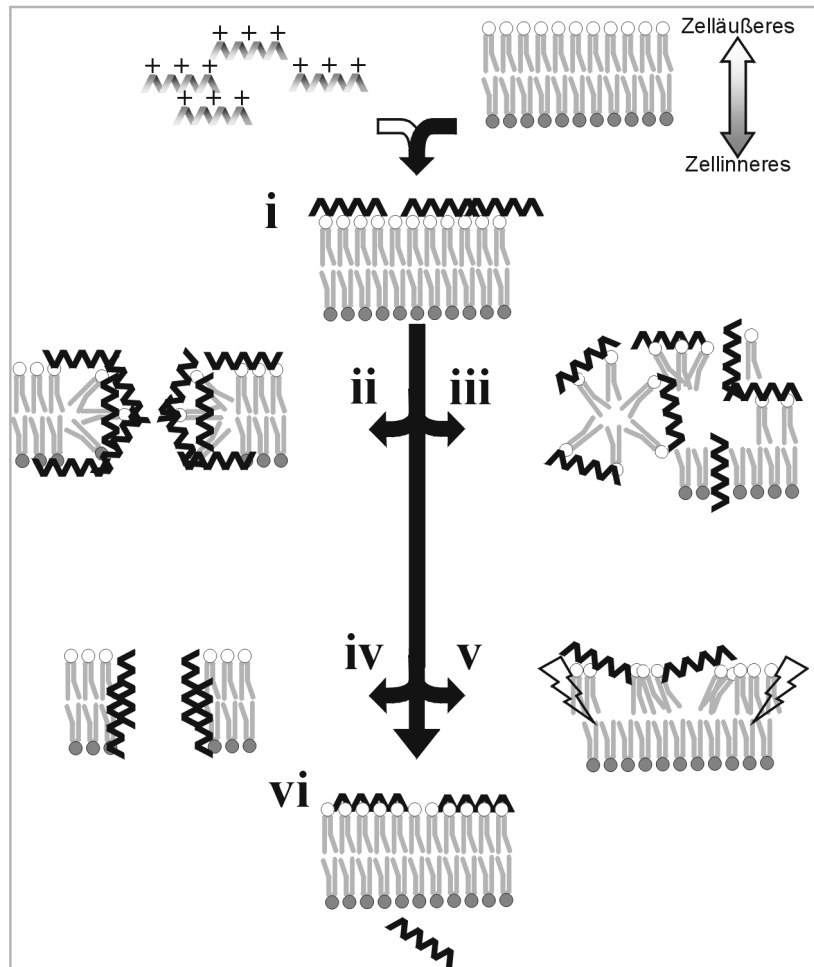
Aminosäuren Arginin und Lysin in den Peptidsequenzen haben die kationischen AMP mindestens eine Valenz <sup>1</sup> von +2, weiter verbreitet ist aber +4 bis +6. Diese kationischen AMP zeigen eine räumliche Anordnung, durch die sie sowohl eine hydrophobe Domäne, bestehend aus nicht-polaren Aminosäureresten, als auch eine hydrophile Domäne, bestehend aus polaren und positiv geladenen Aminosäureresten, aufweisen – die Moleküle sind somit amphipatisch. Aufgrund dieser physikalisch-chemischen Charakteristika haben AMP die Tendenz, sich auf negativ geladenen mikrobiellen Oberflächen und Membranen zu akkumulieren. Im folgendem Abschnitt wird der Wirkmechanismus der AMP näher erläutert.

#### 1.4 Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide

Die Mehrzahl der erforschten AMP funktionieren anders als die konventionellen Antibiotika, welche im allgemeinen ein essentielles Enzym eines Mikroorganismus blockieren. Da die Wirkung auf einem biophysikalischen Prinzip (Wechselwirkung eines amphipatischen Moleküls mit der anisotropen Membranschicht) beruht, sind die AMP gegen ein breites Spektrum von Bakterien aktiv. Ein wichtiger Unterschied zwischen der äußeren Oberfläche von Bakterien und normalen Säugerzellen ist die Ladung. Die äußere Oberfläche Gram-negativer Bakterien wird durch LPS-Moleküle bestimmt (50-53), die der Gram-positiven durch Teichonsäuren (TS) (54). In beiden Fällen resultiert das Vorhandensein von LPS und TS in einer negativen Ladung der äußeren Oberflächen. Dadurch ist eine initiale Bindung der positiv geladenen AMP an die Außenseite der Bakterienmembran erleichtert. Im Vergleich dazu ist die Außenseite eines Erythrozyten als Repräsentant einer Säugerzelle durch das Vorhandensein zwitterionischer Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine und Sphingomyeline neutral (55,56). Zusätzlich zu diesen Phospholipiden ist auch Cholesterin in die Lipiddoppelschicht eingelagert (55,56). Das Vorhandensein von Cholesterin in der Lipiddoppelschicht kann eine peptidinduzierte Lyse mindern, da aus der Einlagerung des Cholesterins eine höhere Packungsdichte der Membran resultiert (57,58). Studien haben gezeigt, dass AMP eine geringe Affinität zu zwitterionischen Molekülen haben (59,60). Diese geringe Affinität mag einer der Gründe sein, warum die Hämolyse durch die kationischen AMP so gering ist. Für AMP der ersten Gruppe (linear und  $\alpha$ -helikal) ist ein Modell für transmembrane Kanäle bzw. Poren (engl. „barrel-stave“) vorgeschlagen worden (61-64). Das in diesem Zusammenhang am besten untersuchte  $\alpha$ -helikale

<sup>1</sup> Die Ladung eines Moleküls definiert sich aus der Valenz bzw. Ladungszahl  $z$  und der Elementarladung  $e$  ( $1.60219 \cdot 10^{-19}$  A·s):  $\text{Ladung} = z \cdot e$ . In Übereinstimmung mit den Publikationen zum Thema antimikrobielle Peptide wird aber nur allgemein von „Ladung“ gesprochen.

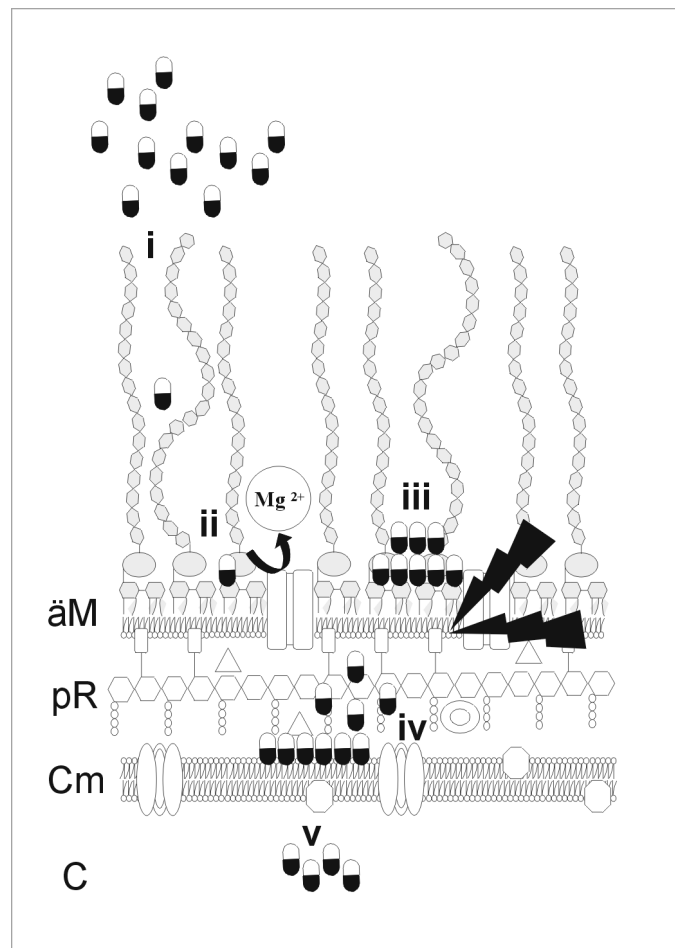
Peptid ist das Alamethicin (65,66). Das vom Pilz *Trichoderma viride* stammende Alamethicin ist 20 Aminosäuren groß und besteht zum Großteil aus hydrophoben Aminosäuren (67). Im Gegensatz zu



**Abbildung 3 / Ergänzt Shai-Matsuzaki-Huang-Modell zum Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide** Dargestellt ist ein  $\alpha$ -helikales Peptid. Bei dem Modell des „Carpet“-Mechanismus binden die amphipathischen  $\alpha$ -helikalen AMP als initialer Schritt an die Membranoberfläche und bedecken diese – wie ein Teppich – flächendeckend (i). Hierbei binden die AMP an die Kopfgruppen und setzen sich zunächst nicht in den Kernbereich der Lipiddoppelschicht. Wird eine Schwellenwertkonzentration der Peptidmonomere erreicht, kann sich einerseits eine toroidale Pore ausbilden (ii) und bei weiterer Konzentrationssteigerung erfolgt der lokale Kollaps (iii). Andererseits assemblieren beim „Barrel-stave“-Modell membrangebundene Peptidmonomere und es folgt die orthogonalen Einlagerungen in die Lipiddoppelschicht und Initiierung der Porenbildung (iv). Dabei orientieren sich die einzelnen AMP-Moleküle so, dass die hydrophoben Domänen mit dem Lipidkern interagieren und die hydrophilen so zueinander gerichtet sind, dass sie eine Pore bilden. Weitere Möglichkeit ist die Integration der Peptide in die Lipiddoppelschicht. Die äußere Lipidschicht expandiert relativ zur inneren Schicht und verursacht eine Spannung (gezackte Pfeile) (v). In einigen Fällen Diffusion der Peptide ins Cytoplasma und weiter zu intrazellulären Zielen (vi).

lokalen Öffnungen in der Lipiddoppelschicht durch stark geladene amphipathische Peptide sind die Alamethicin Kanäle reproduzierbar und genau definiert. Allerdings ist das „barrel-stave“-Modell nicht uneingeschränkt auf alle AMP anwendbar, da einige der Peptide zu kurz sind, um die

Lipiddoppelschicht zu durchspannen. Daher sind zusätzliche Modelle entwickelt worden, die mögliche Peptid-Lipiddoppelschicht-Interaktionen zu erklären versuchen. Zasloff hat diese Modelle als „Shai-Matsuzaki-Huang“-Modell zusammengefasst (68-71). So wird neben der transmembranen



**Abbildung 4 / Modell des „Self-promoted Uptake“** Kationische antimikrobielle Peptide interagieren mit Lipopolysacchariden (LPS) auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien und werden anschließend über die Ereignisfolge des „Self-promoted Uptake“ aufgenommen. Der erste Schritt ist die Interaktion positiv geladener Peptide mit Kationenbindungsstellen der Zelloberflächen-LPS (i). Da die Peptide eine höhere Affinität als die natürlich vorkommenden Kationen  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  haben, werden diese kompetitiv verdrängt (ii). Aufgrund des wesentlich größeren Platzbedarfs der Peptide kommt es zur Störung der äußeren Membranintegrität (iii). Verlust der Membranintegrität ermöglicht den Peptiden die Diffusion in den periplasmatischen Raum und zur Cytoplasmamembran (iv). Als Folge dieser Interaktion wird entweder die Integrität der Cytoplasmamembran gestört oder Peptide diffundieren an Ziele im Cytoplasma (v) (siehe dazu auch das Shai-Matsuzaki-Huang-Modell Abbildung 3). äM, äußere Membran; pR, periplasmatischer Raum; Cm, Cytoplasmamembran; C, Cytoplasma.

Porenbildung via „barrel-stave“-Mechanismus zusätzlich eine Membranersetzungsmechanismus via „carpet“-Mechanismus postuliert (72) (Abbildung 3). Wird eine Schwellenwertkonzentration erreicht, kann die

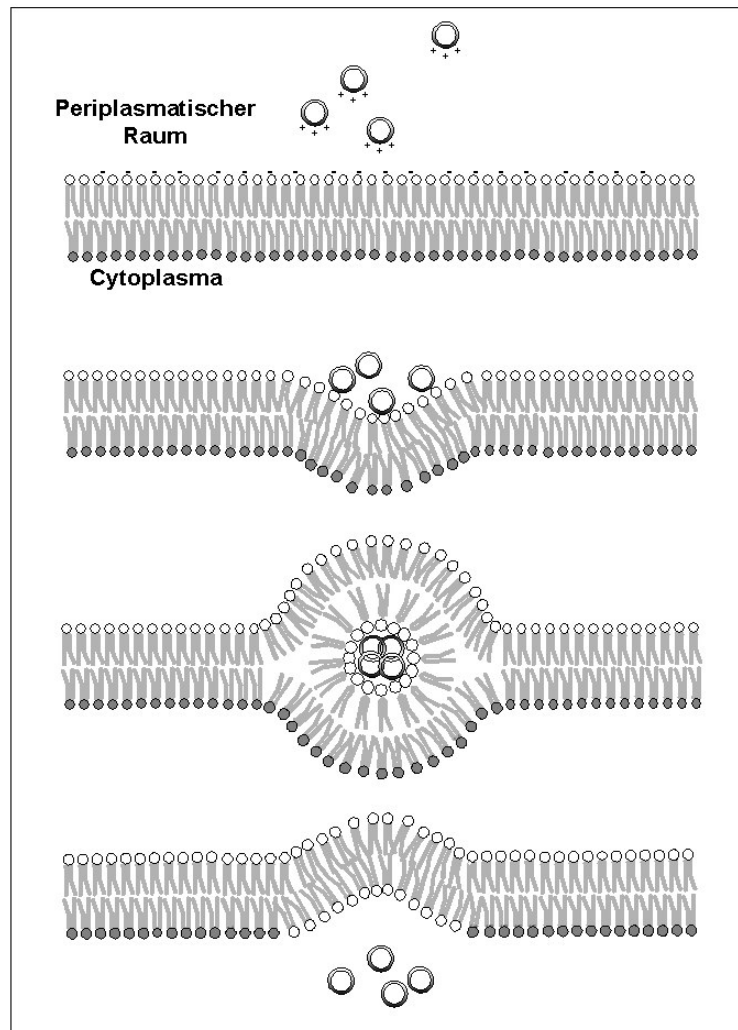


Membranintegrität nicht aufrecht erhalten werden. Als Folge dessen kollabiert die gesamte Membran und es können sich Mizellen ausbilden (iii, Abbildung 3). Vor dem totalen Kollaps der Membran können sich auch instabile Poren, sog. toroidale Löcher („Wurmlöcher“) bilden, welche niedermolekularen Molekülen die Passage über die Lipiddoppelschicht ermöglichen (71,73) (ii, Abbildung 3).

Neben den beschriebenen Modellen gibt es für Gram-negative Bakterien noch die Hypothese des sog. „self-promoted uptake“ (SPU), bei welchem eine initiale Bindung der kationischen AMP an die anionischen Domänen des LPS (Chemische Struktur siehe Anhang / Abbildung III) postuliert wird (74,75). Dieser Hypothese zufolge interagieren die kationischen AMP mit der negativ geladenen äußeren Oberfläche Gram-negativer Bakterien und deren divalent-kationischen Bindungsstellen für  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ , welche normalerweise die Oberflächenladung neutralisieren (Abbildung 4) (74,76-78). Die kationischen AMP stören die Membranarchitektur entweder durch starke Bindung an die LPS oder durch die Neutralisierung einer größeren Membranoberfläche (50,77,79). Es wird angenommen, dass sie sich dann in die Lipiddoppelschicht einlagern und über die Lipiddoppelschicht translozieren (37). In diesem Zusammenhang seien die Studien an den sog. zellpenetrierenden Peptiden (Cell- penetrating peptide, CPP) erwähnt, die gezeigt haben, dass eine Translokation der Peptide über die Lipiddoppelschicht angeblich ohne Endocytosemechanismen möglich ist (80,81). Es ist interessant festzustellen, dass z.B. für die Homöodomäne Antennapedia (AntpHD43-58) oder Tat, Peptide welche der Substanzklasse der zellpenetrierenden Peptide zugeordnet werden, sehr kontroverse Aussagen über deren Translokationsmechanismus getroffen werden (82-84). Für die R-reichen CPP wurde ein Eintritt in die Zelle in Gegenwart von Endocytoseinhibitoren beschrieben (84). Ergänzend sind rezeptorunabhängige endocytotische Translokationen (adsorptive Endocytose) des HIV-1 Tat von Mann *et al.* beschrieben worden (85). Im Gegensatz dazu berichten Astriab-Fisher *et al.* von einer Aufnahme der Tat- und Antennapediapeptide ins Cytoplasma durch einen konventionellen endocytotischen Pfad (86).

Nichtsdestotrotz besteht aber darin Übereinstimmung, dass der initiale Schritt zur Translokation / Zellpermeabilisierung die Assoziation der kationischen Domänen der AMP / CPP an die negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide der Cytoplasmamembran ist. Wie jedoch die kationischen Peptide im Falle einer Translokation die Cytoplasmamembran überwinden, ohne sie zu permeabilisieren, konnte bisher nicht im Detail geklärt werden. Ein sehr populäres Modell ist das der invertierten Mizelle (87). Dieses wurde erstmals von Derossi *et al.* (83) vorgeschlagen und postuliert das Ausbilden einer Mizelle um kationische Peptide, welche beim lokalen Kollaps der Mizellen ins

Cytoplasma freigegeben werden können (Abbildung 5). Wu *et al.* (88) favorisieren für Peptide, welche die Lipiddoppelschicht nicht durchspannen können, das von Matsuzaki *et al.* vorgeschlagene Modell, in dem antimikrobielle  $\alpha$ -helikale Peptide eine PG-basierte Lipiddoppelschicht permeabilisieren, indem sie eine Peptid-Lipid-Pore formen. Nach der Porenbildung „flippen“ einige der Peptide ins Innere, wobei sie Lipide mit sich ziehen (89,90).



**Abbildung 5 / Modell zur Internalisierung von Peptiden** In dem von Derossi *et al.* vorgeschlagenen Modell, assoziieren die kationischen Restgruppen der Aminosäuren mit negativ geladenen Phospholipiden und induzieren so die Formation einer invertierten Mizelle. Der hydrophile Hohlraum enthält die Peptide, die, wenn die Mizelle mit der Membran fusioniert, ins Cytoplasma freigesetzt werden können.

Obwohl einige Wissenschaftler die Lyse der Cytoplasmamembran annehmen, gibt es dennoch keinen vollständigen Beweis einer kompletten Auflösung. Im Gegenteil, Arbeiten von Patrzykat *et al.* (91) und

Hancock (37) konnten zeigen, dass selbst bei einer Peptidkonzentration, die bis zu zweiunddreißigmal höher liegt als die minimale inhibitorische Konzentration, die ein Wachstum hemmt (MIC), keine Lyse der Cytoplasmamembran festzustellen war. Es wird angenommen, dass sich an der Cytoplasmamembran auch Poren bzw. Kanäle bilden, über die die AMP ins Cytoplasma diffundieren und mit Zielstrukturen innerhalb des Cytoplasmas assoziieren (37,88,92).

Wenngleich nicht alle Details der Wirkmechanismen bisher aufgeklärt werden konnten, so ist jedoch eine Bindung der kationischen AMP mit Strukturen der mikrobiellen Membran als initialer Schritt essentiell für deren antimikrobielle Aktivität.

Trotz der vielen verschiedenen räumlichen Strukturen der kationischen AMP aus den verschiedenen Gruppen haben nahezu alle eine amphipathische Oberfläche, welche für Membranassoziiierungen gut geeignet ist. Grundsätzlich destabilisieren die membrangebundenen AMP die Lipiddoppelschicht. Wurde zunächst nach AMP und ihrem Vorkommen im allgemeinen geschaut, fokussiert sich die Forschung der letzten Jahre auf die strukturellen Parameter, welche die antimikrobielle Aktivität der Peptide modulieren. Dieses soll am Beispiel des gut untersuchten Proteins Lactoferrin näher erläutert werden. Das an die 640 Aminosäurereste große Lactoferrin ist ein Fe-bindendes Protein, welches in vielen exokrinen Sekreten von Säugern vorzufinden ist und bei einer Immunantwort auf eine Entzündung von Neutrophilen freigesetzt wird (22). Ursprünglich ist man davon ausgegangen, dass die antimikrobielle Wirkung auf die Fe-bindende Wirkung zurückzuführen ist. Bellamy *et al.* berichteten jedoch von der Existenz einer antimikrobiellen Domäne nahe des N-Terminus von Lactoferrin, die in einer Region fernab der Fe-Bindungsdomäne liegt (93). Es wurde ein einziges aktives Peptid isoliert, nachdem humanes bzw. bovines Lactoferrin mit gastrogenem Pepsin behandelt worden war. Dieses Verdauprodukt, als Lactoferricin H bzw. B bezeichnet, besitzt 18 Aminosäurereste, die einen Loop bilden, welcher durch eine Disulfidbrückenbindung (-Cys-Cys-) stabilisiert ist. Mutmaßlich verantwortlich für die antimikrobielle Aktivität des ganzen Proteins ist aber ein nur sechs Aminosäurereste umfassender Bereich RRWQWR (Lactoferricin B 20-25) innerhalb des Loops (94). Interessanterweise liegt diese Sequenz im Lactoferrin als  $\alpha$ -helikale Struktur vor, verändert aber seine Struktur nach Pepsinbehandlung und nimmt innerhalb des entstandenen Lactoferricins (17-41 Aminosäurereste) eine  $\beta$ -Faltblattstruktur an (95). Das entsprechende synthetische Hexapeptid nimmt in Gegenwart von Mizellen eine unkonventionelle gestreckte Struktur an (96). Dieses Beispiel zeigt, dass verschiedene räumliche Strukturen möglich sind, jedoch jedes individuelle Peptid die Struktur annimmt, welche für die Aktivität essentiell ist.

Obwohl Sequenzhomologien selten unter den AMP zu finden sind, lassen sich gerade in kleineren Strukturmotiven Ähnlichkeiten in der Aminosäurezusammensetzung aufzeigen. Protegrin 1 besitzt ein neun Aminosäurereste großes Stück (LCYCRRRFC), wovon sieben Aminosäurereste identisch und eines homolog zu dem Stück (ICACRRRFC) des Defensin NP-3A des Hasen sind (97). Ein weiteres Beispiel ist das Polyphemusin I und II, das aus Hämocyten des amerikanischen Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* isoliert worden ist und ebenfalls ein entsprechendes Motiv aufweist (RRWCFR) (98). Zusätzlich zu den biologischen Funden wurde von Blondelle *et al.* ein AMP (RRWWCR) einer kombinatorischen Bibliothek beschrieben, das auch sehr stark das RRWQWR-Motiv des Lactoferrins repräsentiert (99) (siehe auch Übersichtstabelle 2). Die positiv geladene Aminosäure R sowie die aromatische Aminosäure W scheinen von besonderer Bedeutung für die Interaktion von AMP mit Membranen zu sein (100). Erst vor kurzem ist von Pentapeptiden berichtet worden, welche R-/W-Reste beinhalten und antimikrobiell aktiv sind (101,102).

Peptidname	Primärstruktur	Ursprung	Literatur
B Lactoferrin (20-25)	RRWQWR	Rind	(103)
Polyphemusin I	RRWCFR	Pfeilschwanzkrebs	(98)
Tachyplesin I	KWCFR	Pfeilschwanzkrebs	(104)
Protegrin	YCRRRF	Schweineneutrophil	(105)
Defensin	ACRRRF	Hasen neutrophil / Epithelgewebe	(49)
Synthetisch	RRWWCR	Kombinatorische Chemiebibliothek	(99)

Tabelle 2 / Antimikrobielle Peptidmotive: Ein-Buchstaben-Code der Sequenzen & Vorkommen

Für die antimikrobielle Aktivität weniger entscheidend sind die Disulfidbrückenbindung durch die beiden Cysteine und die daraus resultierende Loopstruktur des Lactoferricin B (93). Dieser Befund steht im Kontrast zu anderen Untersuchungen, die zeigen, dass die Ausbildung einer cyclischen Struktur essentiell für die antimikrobielle Aktivität einiger AMP ist (97,106-108). Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass die Aktivität eines AMP deutlich von seiner Aminosäurezusammensetzung und der räumlichen Struktur bestimmt werden kann.

### 1.5 Frage- & Zielstellung der Arbeit

Es gibt gegenwärtig nur wenige Arbeiten, die sich mit dem Einfluß von Aminosäurekomposition, Aminosäuresequenzvariationen und konformationellen Einschränkungen auf die Aktivität der kürzeren (< 10 AS) AMP befassen. Da selbst der Ersatz der positiv geladenen Aminosäure Arginin mit der positiv geladenen Aminosäure Lysin bzw. der aromatischen Aminosäure Phenylalanin mit der ebenfalls aromatischen Aminosäure Tyrosin AMP mit geringerer Aktivität produziert (101,109), standen R-/W-reiche Peptide im Fokus unseres Interesses. Es ist dabei von besonderer Bedeutung, dass diese Peptide möglichst kurz in ihrer AS-Sequenz sind, da es bestrebenswert ist, sowohl die Kosten als auch das Risiko einer immunogenen Antwort der antimikrobiellen Peptide bei einer klinischen Anwendung möglichst gering zu halten (102). Zusätzlich haben speziell cyclische Peptide die beiden Vorteile, dass sie eine gesteigerte Resistenz gegenüber einem Abbau durch Proteasen haben und eine verbesserte thermodynamische Stabilität zeigen (110). Diese Vorteile können die Aktivität von Peptiden und Proteinen *in vivo* steigern.

		Peptide nur mit L-AS		Peptide mit D-AS			
		Phenylalanin enthaltend		Naphtylalanin enthaltend***			
		Name	Sequenz	Name	Sequenz	Name	Sequenz
linear*	<b>RW</b>		RRWWRF	<b>RNaI</b>	FR <u>NaI</u> NaI RR		
	<b>RW2</b>		RRWWFR	<b>RNaI1</b>	R <u>NaI</u> NaI RF		
	<b>RW3</b>		RRWFWR	<b>RNaI2</b>	FRR <u>NaI</u> NaI R		
	<b>RW4</b>		RWRFWR	<b>RNaI3</b>	RFRR <u>NaI</u> NaI		
	<b>RW5</b>		FRWWRR				
cyclisch**	<b>cRW</b>	c(RRWWRF)		<b>cRNaI</b>	c(FRNANARR)	<b>cRWd1</b>	c(rRWWRf)
	<b>cRW2</b>	c(RRWWFR)				<b>cRWd2</b>	c(RRWwRF)
	<b>cRW3</b>	c(RRWFWR)				<b>cRWd3</b>	c(RRwWRF)
	<b>cRW4</b>	c(RWRFWR)				<b>cRWd4</b>	c(RRWwRF)
	<b>cRW5</b>	c(FRWWRR)				<b>cRWd5</b>	c(RRWwRF)
							<b>cRWd6</b>

\* N-terminus ist acetyliert und C-terminus ist amidiert \*\* Cyclisierung ist homodet

\*\*\* Naphtylalanin, NaI

Tabelle 3 / Übersicht der Hexapeptidbibliothek Übersicht der Peptide und deren Aminosäuresequenzen, die mittels Festphasensynthese produziert worden sind.

Ziel der Untersuchungen war es, die Kenntnisse über die biologischen Aktivitäten (MIC) als auch die Bestimmung der erforderlichen strukturellen Eigenschaften antimikrobiell wirkender Hexapeptide zu erweitern. Hierzu wurde eine Peptidbibliothek synthetisiert, deren Leitsequenz (Ac-RRWWRF-NH<sub>2</sub>) abgeleitet ist von den o.g. Sequenzen. Die Bibliothek (Tabelle 3) basiert auf der Hypothese, dass die biologische Aktivität kleiner R/W-reicher AMP zusammenhängt mit dem Gruppieren von positiv geladenen und aromatischen Aminosäureresten, das durch eine geeignete Komposition der Aminosäuren und konformationelle Einschränkungen favorisiert werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung verschiedener methodischer Strategien:

- eine Hexapeptidbibliothek synthetisiert;
- die biologischen Aktivitäten (wachstumshemmende Wirkung und Hämolyse) untersucht;
- konformationelle Eigenschaften in Gegenwart von Mizellen bzw. Liposomen bestimmt;
- Parameter zur Charakterisierung der Hydrophobizität der AMP bestimmt;
- Permeabilisierungsaktivitäten auf artifizielle Modellmembranen, welche die Lipiddoppelschicht Gram-positiver, -negativer und Säugerzellen repräsentieren, betrachtet;
- Bindungen an LPS-Strukturen untersucht;
- *in vivo* die Permeabilisierungsaktivität gemessen.

Die Ergebnisse und Methoden werden nachfolgend dargestellt bzw. beschrieben und anschließend vor dem Hintergrund jüngster Forschungserkenntnisse diskutiert.