

4. Diskussion

Mit den tryptophan- und argininreichen antimikrobiellen Peptiden wurden relativ kleine antimikrobielle Peptide entwickelt, die für eine Weiterentwicklung zu antibiotischen Wirkstoffen besonders geeignet scheinen. Es wurden zahlreiche dieser Peptide in kombinatorischen Bibliotheken synthetisiert und der Einfluss einzelner Aminosäuren sowie der Sequenz auf die Aktivität analysiert [94, 95, 99].

Eine strukturelle Charakterisierung dieser Peptide ist die Voraussetzung, um die Zusammenhänge zwischen räumlicher Struktur der Peptide und ihrer biologischen Wirkung zu erkennen. Eine Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Peptiden und ihren angenommenen Zielstrukturen, den Membranen, ermöglicht es außerdem, wichtige funktionelle Gruppen zu identifizieren. Diese Erkenntnisse sind wichtige Grundlagen, will man diese Peptide zu Wirkstoffen weiterentwickeln.

Als Modellpeptid diente hier das Peptid c-RW mit der Sequenz cyclo(RRWWRF) [99]. Es erwies sich für Untersuchungen zu Struktur und Funktion als besonders geeignet, da es biologisch und biophysikalisch gut charakterisiert war. Es existierten auch Bibliotheken verwandter Peptide, die darauf fokussiert waren, den Zusammenhang zwischen Sequenz und Aktivität dieses Peptides aufzuklären und die vergleichende Untersuchungen hinsichtlich Struktur und Funktion erlaubten [99-101].

4.1. Strukturuntersuchungen an c-RW und analogen Peptiden

Bereits die ersten NMR-Spektren zeigten, dass c-RW eine definierte Struktur aufwies. Im mizellgebundenen Zustand wurde eine breite Verteilung der ^1H -Resonanzen beobachtet, was oft ein Zeichen für die Ausbildung einer definierten Struktur ist. Auch das Vorhandensein zahlreicher NOEs, besonders zwischen den Seitenketten, bestätigte die Annahme, dass c-RW eine definierte Raumstruktur annimmt. Im Gegensatz dazu zeigte sich das Peptid in wässriger Lösung weniger gut strukturiert. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten CD-Spektroskopie-Untersuchungen von Dathe *et al.* [99]. Dabei fand man, dass sich die CD-Spektren der Peptide gebunden an SDS-Mizellen und POPC-Vesikel kaum unterschieden, diese aber über eine geordnetere Struktur verfügten als c-RW in wässriger Lösung. Die Tatsache, dass die aktive Konformation erst durch Membranbindung induziert wurde, zeigte, dass es sich hierbei nicht um eine triviale Konformation handelte, welche allein durch theoretische Methoden zu bestimmen wäre. Eine experimentelle Strukturaufklärung war somit unumgänglich.

Durchaus zu erwarten war, dass das Rückgrat eines zyklischen Hexapeptides zwei β -Schleifen ausbildet. Dies wurde sowohl in wässriger Lösung als auch im mizellgebundenen Zustand tatsächlich beobachtet. Die Position der Schleifen innerhalb der Sequenz unterschied sich jedoch. Das hatte eine unterschiedliche Ausrichtung der Seitenketten zur Folge. Während in wässriger Lösung kaum NOEs auftraten, die eine detaillierte Beschreibung der Konformation erlaubt hätten, waren diese strukturgebenden NOEs im mizellgebundenen Zustand in ausreichender Zahl vorhanden und ermöglichten eine genauere Analyse der Struktur. Es zeigte sich, dass die aromatischen Seitenketten auf einer Seite des Moleküls gruppiert waren, während die andere Seite durch das Rückgrat und die Argininseitenketten gebildet wurde. Daraus resultierte eine amphipathische

Struktur, deren hydrophobe Seite durch die Aromaten gebildet wurde. Das Vorhandensein einer solchen amphipathischen Struktur, zumindest im membrangebundenen Zustand, ist ein Merkmal vieler antimikrobieller Peptide [41].

Die bestimmte NMR-Struktur erwies sich in der Moleküldynamiksimulation an der Grenzfläche einer Lipiddoppelschicht über den sehr langen Simulationszeitraum von 100 ns als stabil unabhängig von der Verwendung der Abstandsgrenzen. Das zeigte, dass die NMR-Struktur nicht nur gebunden an Mizellen, die eine gekrümmte Oberfläche besitzen, sondern auch gebunden an Lipiddoppelschichten Gültigkeit besitzt. Dafür sprechen auch die bereits erwähnten CD-Spektroskopie-Studien an SDS-gebundenem und POPC-gebundenem c-RW [99]. Diese beiden Spektren weisen kaum Unterschiede auf und sprechen für eine ähnliche Konformation beider gebundener Zustände.

Die Stabilität der Peptidkonformation während der Simulation sprach aber auch für die Qualität der Membransimulation selbst. Besonders in den Simulationen ohne Abstandsgrenzen war die Umgebung der Membrangrenzschicht der wichtigste strukturstabilisierende Faktor für das Peptid. Deshalb war eine gleichbleibende Peptidstruktur auch ein Indikator für eine naturnahe Wiedergabe der Peptidumgebung und damit für die Güte der Simulation.

4.1.1. Lokalisation und Orientierung des c-RW in der Membran

Erste Schlüsse über die Lokalisation und die Orientierung des Peptides innerhalb der Membran beziehungsweise der Mizelle konnten schon aus der amphipathischen Struktur gezogen werden. Der hydrophobe Teil, bestehend aus den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren, sollte den hydrophoben Kern der Membran bevorzugen, während der hydrophile Teil den Kontakt mit der polaren Phase suchen sollte.

Diese Vermutung wurde durch die NMR-Daten bestätigt. Es wurde der Einfluss einer sehr gut in Wasser löslichen paramagnetischen Verbindung auf die longitudinalen Relaxationszeiten unterschiedlicher Peptidprotonen untersucht und gefunden, dass die hydrophile Seite des Peptides Kontakt zur wässrigen

Phase hatte und die Aromatenseite zum Kern der Mizelle hin orientiert war. Auch NOEs zwischen den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren und den Protonen der Lipidketten wiesen auf einen Kontakt der hydrophoben Seite des Peptides mit dem Inneren der Mizelle hin. DPC-gebundenes Peptid unterschied sich von SDS-gebundenem Peptid dadurch, dass hier die Aminosäuren R1 und R2 dem Relaxationsmittel stärker ausgesetzt waren.

Auch diese experimentellen Befunde spiegelten sich in der Moleküldynamiksimulation wieder. Hier war ebenfalls die hydrophile Seite der wässrigen Phase zugewandt, während die Aromaten zum Kern der Membran orientiert waren. Die aromatischen Aminosäuren befanden sich etwa 1 bis 1,5 nm von der Membranzentralebene entfernt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Versuche, bei denen die Fluoreszenz der Tryptophane des membrangebundenen Peptides durch Nitroxid-markierte Lipide gequenchet wurde und auf diese Weise eine Entfernung der Tryptophane von der Membranzentralebene von 0,9 nm bzw. 1,5 nm festgestellt wurde [99]. Auch aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass Indole innerhalb von Membranen ihr Minimum der freien Enthalpie bei ähnlicher Insertionstiefe erreichen [150]. In der 12/128-Simulation zeigte sich, dass die Arginine sich weniger tief in der Membran aufhielten als in der 2/128-Simulation. Dieses Verhalten ist begleitet von der Neigung der Argininseitenketten, vermehrt Wasserstoffbrückenbindungen zum Wasser einzugehen. Es scheint, dass die große Zahl der Guanidinogruppen in der Grenzflächenregion ihre Wasserstoffbrücken nicht mehr allein zu Lipidkopfgruppen herstellen, sondern vermehrt auch an Wasser binden und somit die wässrige Phase suchen und dadurch die Argininseitenketten länger ausgestreckt „schnorcheln“ [84].

4.1.2. Verwandte Peptide - Beziehung zwischen Struktur und Aktivität

Die untersuchten Peptide c-RY und c-RNal unterschieden sich von c-RW durch eine Substitution der Tryptophane durch Tyrosine bzw. Naphtylalanine. Bei c-KW waren die Arginine gegen Lysine ausgetauscht. Diese Peptide zeigten

im mizellgebundenen Zustand eine ähnliche Konformation wie c-RW mit der Positionierung der β -Schleifen an denselben Stellen sowie ähnlicher Orientierung der Seitenketten und einer ausgeprägten amphipathischen Struktur. Die Peptide c-RW2 und c-RW3, bei denen die aromatischen Aminosäuren in der Sequenz direkt aufeinander folgten, wiesen eine abweichende Struktur auf. Die Positionen der β -Schleifen waren in der Sequenz verschoben. Auch die Orientierung der Seitenketten war verändert, so dass die Gruppierung der aromatischen Seitenketten weniger deutlich ausfiel. Dennoch resultierte jeweils eine amphipathische Struktur.

Da die Strukturen von c-RY, c-RNal und c-KW mit der des c-RW vergleichbar waren, ist der Grund für die unterschiedliche Aktivität nicht in einer veränderten Konformation, sondern einzig und allein in der Art der Seitenketten zu suchen. Das Peptid c-RY verfügte über eine deutlich geringere antimikrobielle Aktivität als c-RW, c-RNal unterschied sich jedoch kaum in der minimalen inhibitorischen Konzentration von c-RW. Daraus folgt, dass die Tryptophanseitenketten für die Aktivität von Bedeutung sind. Sie können zwar durch größere aromatische Reste ersetzt werden, ein Ersetzen der Tryptophane durch die kleineren Tyrosine führt aber zum Aktivitätsverlust. Da die Naphtylalanine keine Möglichkeit haben, spezifische gerichtete Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder starke elektrostatische Wechselwirkungen einzugehen, ist ihr Einfluss auf die Aktivität durch hydrophobe Wechselwirkungen begründet. Es muss also ein gewisses Maß an Hydrophobizität erreicht werden um eine Aktivität zu erzielen. Auch andere Studien zeigten, dass die Hydrophobizität der entscheidende Parameter ist [157, 158].

Um diese Tatsache mittels der NMR-Strukturen quantitativ zu beschreiben, wurden die Anteile hydrophober und hydrophiler Oberflächenregionen berechnet. Dabei zeigte sich, dass c-RY zu beinahe 50 % aus stark hydrophilen Bereichen bestand, während c-RW deutlich weniger stark hydrophile Bereiche aufwies. Überwiegend hydrophobe Bereiche traten bei c-RNal auf. Da keine wesentlich erhöhte Aktivität aus dem Vorhandensein größerer hydrophober Bereiche resultierte, ist anzunehmen, dass das Vorhandensein der beiden

Tryptophane ausreichte, um dem Molekül die nötigen lipophilen Eigenschaften zu verleihen. Dass ein Mindestmass an voluminösen lipophilen Gruppen vorhanden sein muss, um eine antimikrobielle Aktivität zu erreichen, geht auch aus anderen Studien hervor [95, 157, 158]. Dieses Mindestmaß konnte in diesen Studien unter anderem durch drei Tryptophane erreicht werden.

Die Peptide c-RW2 und c-RW3 zeigten trotz unterschiedlicher Struktur eine ähnliche Verteilung hydrophober und hydrophiler Bereiche wie c-RW. Ihre Aktivität unterschied sich ebenfalls kaum. Dies demonstriert deutlich, dass der eigentlichen Konformation des Peptides, besonders der Anordnung der Seitenketten, wenig Bedeutung zukommt. Ihr Einfluss ist auf jeden Fall geringer als die Balance zwischen hydrophilen und hydrophoben Bereichen, wie der Vergleich zwischen c-RY und c-RW zeigt. In beiden Fällen wurde aber eine amphipathische Struktur festgestellt, ihr könnte also ebenfalls eine Bedeutung zukommen. Allerdings fehlt für diese Annahme der Beweis, dass eine Konformation, die nicht amphipatisch ist, zu einer Inaktivität der Verbindung führt.

Bei c-KW, dem Lysinderivat des c-RW, kann die geringere Aktivität nicht durch eine Veränderung des Profils der Hydrophobizität erklärt werden, da dieses ähnliche lipophile Eigenschaften wie c-RW aufweist. Die Abweichung in der Aktivität muss durch unterschiedliche Eigenschaften der Arginin- und Lysinseitenketten erklärt werden. Beide weisen eine positive Ladung auf, die Zahl der polaren Wasserstoffatome, die für eine Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Verfügung stehen, ist aber unterschiedlich. Ebenso ist die Ausrichtung der Wasserstoffatome der tetrahedralen Aminogruppe anders als in der planaren Guanidinofunktion, so dass die veränderte Geometrie des Wasserstoffbrückensystems ebenfalls entscheidend sein könnte. Dass die Guanidinofunktionen wichtige Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrücken zu den Lipidkopfgruppen eingehen und dadurch Einfluss auf Lipideigenschaften nehmen, zeigte die Moleküldynamiksimulation (Kapitel 4.2.3). Auch andere Studien kamen zu dem Schluss, dass die Guanidinofunktionen funktionell wichtige Bestandteile darstellen [95]. In diesen Studien von Strom *et al.* zeigte sich, dass für eine optimale Aktivität mindestens drei Guanidine vorhanden sein sollten.

4.2. Interaktion der Peptide mit Membranen

Da es aufgrund der wenig geordneten Struktur von Lipidmembranen generell problematisch ist, detaillierte Strukturinformationen über diese Systeme zu erlangen, ist nur wenig über die Wechselwirkung kleiner tryptophan- und argininreicher Peptide mit diesen Systemen bekannt. Die Moleküldynamiksimulation bot hier ein geeignetes Mittel, in diese Wechselwirkungen Einsicht zu bekommen.

Es wurde hierfür ein einfaches DPPC-System gewählt, weil es experimentell gut charakterisiert war und daher die Ergebnisse der Simulation mit diesen umfangreichen experimentellen Daten verglichen werden konnten. Somit konnte auf die Qualität der Simulation geschlossen werden. Diese DPPC-Membran war zwar keine korrekte Nachbildung der Zielstruktur, der bakteriellen Zytoplasmamembran, sie erlaubte aber dennoch Rückschlüsse auf allgemeine Einflüsse, die c-RW oder verwandte Peptide auf Membranen haben. Eine Simulation einer exakten Nachbildung einer natürlichen, bakteriellen Membran würde schon durch einen Mangel an wichtigen experimentellen biophysikalischen Daten, die einen Vergleich mit der Simulation erlaubten, erschwert. Aber auch bei der Simulation würden sich methodische Probleme ergeben, wie zum Beispiel das Erzeugen von Membranpotentialen und Protonengradienten über die Membran. Eine Simulation eines einfachen Systems war daher sinnvoller.

Die initiale Peptidstruktur sowie die Lokalisation des Peptides innerhalb der Membran basierte auf den NMR-Daten. Dass sich im Verlauf der Simulation sowohl die Struktur als auch die Lokalisation des Peptides als stabil erwiesen, demonstrierte die naturnahe Wiedergabe der Eigenschaften einer Membrangrenzschicht durch die Simulation. Typische experimentell zugängliche Merkmale von DPPC-Membranen, wie die Lipidquerschnittsfläche und der Deuteriumordnungsparameter, stimmten gut mit den beobachteten Werten überein und sprachen ebenfalls für eine naturnahe Simulation.

4.2.1. Folgen der Insertion in die Membran

Die Peptide in der 2/128- und der 12/128-Simulation hielten sich ausschließlich an der Membran-Wasser-Grenzfläche und in der angrenzenden Region der geordneten Lipidketten auf. Durch ihre Orientierung parallel zur Membran nahmen sie eine relativ große Oberfläche ein, allerdings nur an der Oberfläche der Membran. Daraus resultierte eine Verdrängung der Lipide in dieser Region und somit die Bildung einer Kavität in der Membran. Die durchschnittliche Form dieser Kavität ist in Abbildung 37 gezeigt. Sie erstreckte sich etwa bis auf Höhe des C₈ der Acylketten. Dies äußerte sich auch in den Deuteriumordnungsparametern, welche bis in diese Region deutlich von denen der 0/128-Simulation abwichen, in tieferen Regionen war diese Zunahme der Ordnung weniger stark ausgeprägt. Die Bildung der genannten Kavität bewirkte, dass den Acylketten in den Regionen nahe der Grenzfläche weniger Raum zur Verfügung stand und sie dadurch komprimiert, dichter gepackt und dadurch auch gestreckt wurden, was die lokale Zunahme des Deuteriumordnungsparameters erklärte.

Die resultierende Kompression der Lipide in diesem Bereich verändert das Kräftegleichgewicht innerhalb der Membran, da in den tieferen Regionen diese Kompression ausbleibt. Das Resultat ist eine Spannung, die eine positive Krümmung der Membran begünstigt und somit destabilisierend auf die Membran wirkt. Das Auftreten einer solchen Spannung wurde bereits für andere Peptide vorgeschlagen und wird als Triebkraft für eine Porenbildung diskutiert [159].

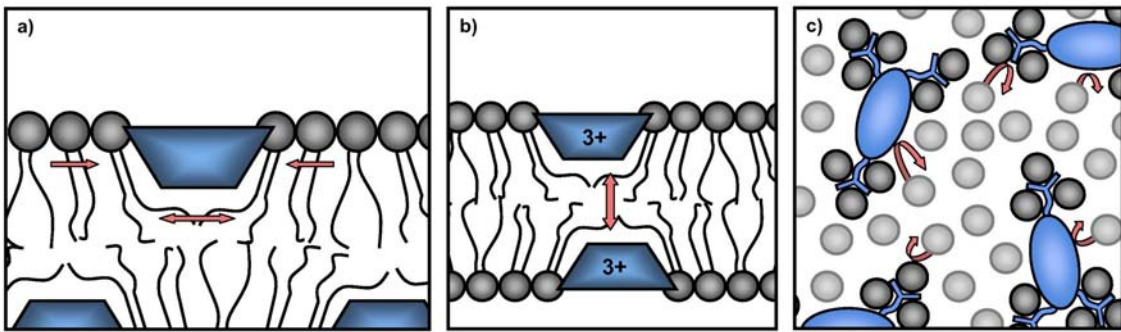


Abbildung 37: Effekte der Peptide auf die Membran. a) Durch die Insertion der Peptide (blau) kommt es zu einer Kompression und Streckung der oberen Regionen der Acylketten, während tiefere Regionen weniger komprimiert werden. b) Die elektrostatischen Wechselwirkungen werden durch die kationischen Peptide ebenfalls gestört. In der Simulation resultierte eine Abstoßung der gegenüberliegenden Grenzflächen (roter Pfeil) und damit die Streckung der Lipide. c) Sicht auf die Membranoberfläche. Die Komplexbildung der Peptide und Lipide reduziert die Mobilität der gebundenen Lipide (dunkelgrau), aber auch ungebundene Lipide (hellgrau) werden in ihrer Diffusion eingeschränkt.

Eine Insertion der Peptide in die Membran reduziert außerdem die Kontakte zwischen den Lipiden und damit die Kräfte, welche die Kopfgruppen in einer Ebene halten. Es ist daher möglich, dass einzelne Lipide weiter aus der Membran herausragen. Dies äußerte sich in der Simulation als eine breitere Verteilung der Phosphocholin- und der Glyceringruppen im 12/128-System.

4.2.2. Kationen an der Membran-Wasser-Grenzfläche

Elektrostatische Wechselwirkungen spielen für die Membranstabilität besonders an der Membran-Wasser-Grenzfläche eine große Rolle. Es ist daher zu erwarten, dass das Einbringen kationischer Ladungen in diese Region die Membraneigenschaften beeinflussen kann. Solche Effekte wurden bereits in Membransimulationen mit Natriumionen beschrieben [160]. Dabei zeigte sich, dass die Ionen überwiegend an der Membran-Wasser-Grenzfläche lokalisiert waren [160]. Dies war begleitet von einer Zunahme des Deuteriumordnungsparameters, einer Abnahme der Lipidquerschnittsfläche und einer geringen Zunahme der Membrandicke. Diese Beobachtungen wurden durch elektro-

statische Wechselwirkungen erklärt. Die Natriumionen, die sich in den beiden Membran-Wasser-Grenzflächen befanden, waren nur durch den hydrophoben Kern mit einer geringen Dielektrizitätskonstante getrennt. Sie waren somit nur unzureichend gegeneinander abgeschirmt und stießen einander ab. Infolgedessen entfernten sich die Membran-Wasser-Grenzflächen voneinander und die Acylketten wurden gestreckt. Dadurch nahmen die Lipide eine geringere Fläche im Querschnitt ein und die Acylketten wiesen eine höhere Ordnung auf.

Auch bei den hier durchgeführten Peptid-Membran-Simulationen wurden diese Effekte beobachtet. Es kam in der 2/128- und der 12/128-Simulation zu einer Zunahme des Deuteriumordnungsparameters, die Querschnittsfläche der Lipide war reduziert und die Membrandicke nahm geringfügig zu. Diese Beobachtungen können wie in den Arbeiten von Böckmann *et al.* [161] dadurch erklärt werden, dass die an der Membran-Wasser-Grenzfläche lokalisierten Kationen, in dem vorliegenden Fall die Guanidinogruppen, nur unzureichend voreinander abgeschirmt sind und sich daher abstoßen. Es zeigt sich dadurch, wie sensibel Membranen auf Veränderungen der elektrostatischen Wechselwirkungen reagieren. Es ist jedoch schwierig, ausgehend von den Simulationen, zu schließen, welche Auswirkungen diese Veränderungen auf eine bakterielle Zytoplasmamembran hätten, da sich diese Systeme in den elektrostatischen Eigenschaften durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Membran, die Anwesenheit verschiedener Ionen und das Vorhandensein von Membranpotentialen und chemischen Gradienten unterscheiden. Unter natürlichen Bedingungen ist außerdem davon auszugehen, dass die Peptide nur auf einer Seite der Membran, der Zellaußenseite, auftreten. Inwiefern die Veränderung der elektrostatischen Wechselwirkung in der Grenzschicht nur auf einer Seite die Membraneigenschaften beeinträchtigen, ist ebenfalls nicht aus den Simulationen zu schließen.

4.2.3. Wasserstoffbrücken und Peptid-Lipid-Komplexe

Die Bedeutung der Arginine für die Aktivität ging bereits aus den vergleichenden Strukturuntersuchungen hervor. In den Simulationen zeigte sich, dass ein Großteil der vom Peptid gebildeten Wasserstoffbrücken von den Argininen ausgehen. Als Akzeptoren fungieren überwiegend die Sauerstoffatome der Phosphatgruppen und der Glycerinacyl ester. Es zeigte sich, dass sich die Geometrie der Guanidinogruppe eignet, zwei Wasserstoffbrücken zu demselben Lipid auszubilden und damit die Stabilität des Komplexes zu erhöhen. Das führte dazu, dass bis zu drei Lipide pro Guanidin gebunden wurden. Es resultierte ein Komplex aus einem Peptid und acht Lipiden. Solche Peptid-Lipid-Komplexe wurden bereits postuliert und werden im Zusammenhang mit der Porenbildung nach dem toroidalen Modell diskutiert [159]. Man nimmt an, dass diese Peptid-Lipid-Komplexe das Innere der Pore auskleiden.

Die Bildung der Peptid-Lipid-Komplexe hat auch einen Einfluss auf die Beweglichkeit der Lipide. Es war eine deutliche Abnahme des lateralen Diffusionskoeffizienten für die Lipide bereits in der 2/128-Simulation zu beobachten, die in dem 12/128-System noch deutlicher ausgeprägt war. Die Ursache war zum einen die reduzierte Beweglichkeit der gebundenen Lipide. Aber auch die Beweglichkeit ungebundener Lipide wurde durch ein Archipel aus langsam diffundierenden Komplexen eingeschränkt, da sie große Hindernisse darstellten, die nicht leicht umgangen werden konnten [161, 162].

Die reduzierte Beweglichkeit der Lipide ähnelt einem Einfrieren der Membran, was physiologisch wichtige Membranprozesse stören kann. Dass die Störung solcher Prozesse zu einer antimikrobiellen Wirkung führt, wird seit längerem für die Gruppe der Biguanide angenommen [163, 164]. Diese Verbindungen werden seit geraumer Zeit zum Beispiel in Form von Chlorhexidin (Abbildung 38) als Desinfektionsmittel eingesetzt. Sie verfügen über Biguanidgruppen als funktionell wichtige Einheiten, die den Guanidinen dahingehend verwandt sind, dass sie über eine positive Ladung verfügen und zahlreiche

Wasserstoffbrücken-Donoren in einer planaren Geometrie besitzen. Man nimmt an, dass diese Biguanide ebenfalls Komplexe mit Lipiden ausbilden und dadurch deren Beweglichkeit reduzieren. Diese Veränderung der Membraneigenschaften steht im Verdacht, wachstumshemmend zu wirken [164].

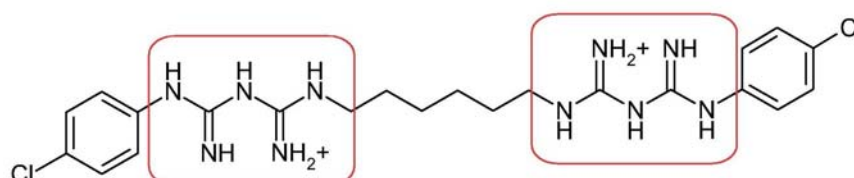


Abbildung 38: Chlorhexidin. Die beiden Biguanid-Gruppen (rot eingerahmt) bewirken die Bindung von Lipiden und sind essentiell für die Aktivität.

Die große Zahl der Guanidinogruppen, die in der 12/128-Simulation an der Grenzfläche auftraten, zeigten aber noch einen weiteren Effekt. Die Zahl der Wasserstoffbrücken, die von diesen Gruppen zum Wasser gebildet wurde, nahm im Vergleich mit der 2/128-Simulation zu. Das heißt, dass mehr Wasser assoziiert mit den Peptiden auftrat. Die Freie-Enthalpie-Barriere des Wassers zeigte eine Abnahme in ihrer Breite, was ebenfalls für eine Zunahme an Wasser in tieferen Membranregionen sprach. Diese Zunahme an Wasser in den hydrophoben Regionen der Membran wirkt destabilisierend auf die Membran, da die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Acylketten gestört werden. Diese hydrophobe Region ist aber nicht nur von struktureller Bedeutung, sie ist auch dafür verantwortlich, dass die chemischen und elektrischen Gradienten über die Membran nicht zusammenbrechen. Bereits geringe Mengen Wasser in dieser Region können sie für Protonen durchlässig machen und so ein Leck im Protonengradienten erzeugen. Eine Hemmung der bakteriellen ATP-Synthese und damit des Bakterienwachstums wäre die Folge.

4.3. Wirkungsweise des c-RW

Wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, wurden für antimikrobielle Peptide drei Mechanismen vorgeschlagen, wie eine Permeabilisierung der bakteriellen Membran erreicht werden kann. Die hier gewonnenen Erkenntnisse über die Struktur der Peptide und deren Wechselwirkungen mit Membranen lassen Schlüsse zu, wie c-RW seine antimikrobielle Wirkung erreicht.

Das barrel-stave-Modell beschreibt eine Porenbildung, bei der das Poreninnere nur durch die Peptide selbst gebildet wird [60]. Dadurch wird der hydrophobe Bereich der Membran vom Wasser abgeschirmt. Dies setzt aber voraus, dass das Peptid diesen hydrophoben Bereich vollständig durchspannen kann. Dieser Bereich hatte in der Simulation eine Dicke von mehr als 30 Å. Das c-RW-Peptid maß jedoch an der Stelle seiner größten Ausdehnung nur 25 Å, von der Spitze des R2 bis zur Spitze des R5. Der hydrophobe Bereich des Peptides, der die Abschirmung bewirken müsste, besaß eine noch geringere Ausdehnung. Eine Abschirmung des hydrophoben Kerns der Membran ist daher nicht ohne die Deformation der Membranoberfläche möglich.

Außerdem verlangt das barrel-stave-Modell, dass die Peptide in engen Kontakt treten und Oligomere bilden. Eine solche Oligomerisierung wurde weder während der NMR-spektroskopischen Studien noch bei der Moleküldynamiksimulation beobachtet. Sie ist auch nicht aus anderen Untersuchungen bekannt. Auch die Tatsache, dass die Sequenz [99] und damit auch die Struktur (siehe c-RW2 und c-RW3) stark verändert werden können, ohne die Aktivität wesentlich zu beeinflussen, lassen an einer Ausbildung eines definierten Oligomers zweifeln. Die hohe Dichte an positiven Ladungen in den Peptiden lassen eher auf eine Abstoßung als auf eine Komplexbildung schließen, zumal innerhalb der Peptide kein geeigneter Interaktionspartner, wie eine anionische Aminosäure, zur Verfügung steht. Es ist daher unwahrscheinlich,

dass eine Permeabilisierung der Membran nach dem barrel-stave-Modell durch diese tryptophan- und argininreichen Peptide auftritt.

Beim toroidalen Modell wird das Poreninnere nicht allein durch die antimikrobiellen Peptide gebildet, sondern die Lipidkopfgruppen sind an der Porenbildung beteiligt [159]. Eine Voraussetzung ist die Krümmung der Membranoberfläche. Diese Krümmung muss von den Peptiden induziert werden, dazu müssen die Membrangrenzfläche und der Kern der Membran ungleichmäßig ausgedehnt werden [165]. Die Moleküldynamiksimulation zeigte, dass c-RW in der Lage ist, ein derartiges Ungleichgewicht hervorzurufen. Die Insertion in der Membran erzeugte eine Kavität nur im oberen Teil der Lipidschicht, was eine Kompression der Grenzfläche zur Folge hatte, während die tieferen Regionen nicht komprimiert wurden.

Auch die Bildung von Peptid-Lipid-Komplexen ist mit dem toroidalen Modell vereinbar. Solche Aggregate wurden bereits postuliert und werden als die Strukturen angesehen, welche die Pore auskleiden und den hydrophoben Kern der Membran vom Wasser abschirmen. Eine Porenbildung nach diesem Modell scheint somit möglich, sie kann aber mit den vorliegenden Ergebnissen nicht mit Sicherheit festgestellt werden, da eine solche Porenbildung während der Simulation nicht beobachtet wurde.

Das carpet-Modell beruht auf einer ungeordneten Anlagerung der Peptide auf einer Seite der Membran, was bei Erreichen einer Grenzkonzentration zur Destabilisierung und zum Kollaps der Membran führt [62]. Es beinhaltet keine gut definierten, strukturellen Merkmale, die zu einem Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen geeignet wären. Auch über die Triebkräfte, welche die Destabilisierung bewirken sollen, existieren keine detaillierten Angaben. Es ist somit schwierig zu entscheiden, ob c-RW nach dem carpet-Modell eine Membranpermeabilisierung erreichen kann. Prozesse, die als Destabilisierung der Membran aufgefasst werden können, sind zum Beispiel die Veränderung der Freien-Enthalpie-Barriere des Wassers oder die Verbreiterung der Grenzflächenregion.

Es sind allerdings auch alternative Wirkungsmechanismen denkbar, die nicht unter die drei besprochenen Modelle der Membranpermeabilisierung fallen. Es trat deutlich mehr Wasser im hydrophoben Bereich der Membran der 12/128-Simulation auf als in der 0/128-Simulation. Das lässt sich durch die große Zahl von Guanidinogruppen in der Grenzflächenregion begründen. Es wird angenommen, dass Wasser im hydrophoben Bereich der Membran für eine Ausbildung von Protonenlecks in Membranen, an denen ein pH-Gradient anliegt, verantwortlich ist. Wenn auch nur für einen kurzen Zeitraum eine Wasserstoffbrückenkette über mehrere Wassermoleküle die Membran durchspannt, kann es durch eine Serie konzertierter Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen zu einem Nettotransfer von Protonen über die Membran kommen [166]. Es ist dafür keine Porenbildung im eigentlichen Sinne notwendig. Ein solches Szenario könnte zum Zusammenbruch des Protonengradienten und der ATP-Synthese an der bakteriellen Membran führen.

Ebenfalls in Betracht zu ziehen ist ein Mechanismus, wie er für die Gruppe der Biguanide diskutiert wird [164]. Diese Biguanide sind in der Lage, die Lipide in der Grenzflächenregion zu binden und deren Beweglichkeit schon bei geringen Konzentrationen einzuschränken. Die reduzierte Membranfluidität beeinflusst den Metabolismus und die Osmoregulation und äußert sich in Kalium- und Protonenlecks sowie einer Hemmung der Atmung und dem Transport von Soluten [167]. Bei höheren Konzentrationen verliert die Membran ihre Integrität und es kommt zu einer Freisetzung und auch Ausfällung intrazellulärer Bestandteile [164, 168, 169]. Auch c-RW bildete Komplexe mit Lipiden, die zu einer deutlichen Reduktion der Diffusion der Lipide führte. Die jeweiligen funktionellen Gruppen, die Guanidine und die Biguanide weisen Ähnlichkeiten hinsichtlich der Ladung, der Möglichkeit, eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken auszubilden, sowie eine ähnliche planare Geometrie auf. Es ist also durchaus möglich, dass die hier untersuchten tryptophan- und argininreichen Peptide einen ähnlichen Wirkungsmechanismus besitzen.

Aufgrund der gewonnenen Daten ist also das barrel-stave-Modell für die besprochenen arginin- und tryptophanreichen Peptide auszuschließen, das

toroidale Modell und das carpet-Modell sind als Erklärung für eine antimikrobielle Wirkung denkbar. Es müssen aber zumindest für die untersuchten Peptide auch alternative Mechanismen, wie die Bildung von Protonenlecks in der bakteriellen Membran und die drastische Reduktion der Membranfluidität, als Ursache der antimikrobiellen Wirkung in Betracht gezogen werden.

4.4. Entwicklung nicht-peptidischer Analoga

Es wurde bereits diskutiert, dass für die optimale Aktivität der Peptide im wesentlichen die Erfüllung von drei Kriterien notwendig ist (siehe Kapitel 4.1.2):

1. Es müssen drei Guanidinogruppen vorhanden sein.
2. Es muss eine ausreichende Anzahl voluminöser, lipophiler Gruppen, zum Beispiel drei Indole, vorhanden sein.
3. Es scheint, dass die Ausbildung einer amphipathischen Struktur für eine antimikrobielle Aktivität erforderlich ist, die exakte Anordnung der Guanidine und voluminösen, lipophilen Gruppen aber von untergeordneter Bedeutung ist.

Um zu überprüfen, ob diese Feststellungen zutreffend sind, wurden nicht-peptidische Verbindungen synthetisiert und untersucht, die diesen Kriterien entsprachen.

Beim Entwurf der Verbindungen wurde darauf geachtet, dass sie sich effizient, mit möglichst einfacher Chemie und in wenigen Stufen aus erhältlichen Verbindungen darstellen lassen. Dazu wurden die Untereinheiten durch die Knüpfung von Amidbindungen bzw. Peptidbindungen aneinander gekuppelt, da mit der Peptidsynthese die methodischen Grundlagen hierfür gut etabliert sind [170]. Als Grundgerüst diente Trimesinsäure, an welche die Indole in Form von Tryptophan gekuppelt wurden. Dadurch werden die Indole räumlich dicht beieinander gehalten und die Ausbildung einer amphipathischen Struktur erleichtert. Die Einführung der Guanidine erfolgte mittels 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin an Aminen an unterschiedlich langen Linkern. Diese Linker wurden

flexibel gestaltet, damit sich die Guanidine relativ uneingeschränkt bewegen können und eine amphipathische Struktur ausgebildet werden kann.

Es zeigte sich, dass das Analogon CAB4 minimale inhibitorische Konzentrationen gegen *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* aufwies, die denen des c-RW entsprachen. CAB3, das entsprechende Triamin, kann in seiner Aktivität mit c-KW verglichen werden. Daraus folgt, dass die geforderten Kriterien anscheinend ausreichend sind, um zu einer aktiven Verbindung zu gelangen. Die Tatsache, dass Tryptophanyl-*N*-1,5-diaminopentan (Verbindung 14) sowie Trimesinsäure (16) keine antimikrobielle Wirkung zeigten, demonstriert, dass die funktionellen Gruppen aneinander gekoppelt werden müssen und die einzelnen Bestandteile nicht per se antimikrobiell sind. Da sie, wie durch die anschließenden NMR-Studien gezeigt, in ähnlicher Weise an Mizellen binden und weil sie bei ähnlichen Konzentrationen ihre Aktivität entfalten, kann angenommen werden, dass ihnen eine ähnliche Wirkungsweise wie den untersuchten Peptiden zugrunde liegt.

Ein Blick auf CAB2 und CAB1 zeigt jedoch, dass diese Verbindungen nur gegen Grampositive in ähnlichen Konzentrationen wie die Peptide wirksam sind, während sie gegen *E. coli* keine nennenswerte Wirkung zeigen. Eine mögliche Erklärung, wie eine solche selektive Wirkung hervorgerufen werden kann, ist die Störung des self-promoted uptake für CAB1 und CAB2. Der self-promoted uptake erlaubt es den antimikrobiellen Verbindungen, die äußere Membran der Gramnegativen zu überwinden (Kapitel 1.4.2). Ist das nicht möglich, können diese Verbindungen ihre eigentliche Zielstruktur, die Zytoplasmamembran, nicht erreichen und bleiben wirkungslos. Grampositive besitzen keine äußere Membran und sind somit ungeschützt. Es ist aber auch möglich, dass *E. coli* die Resistenz auf eine andere Weise erreicht. Das Periplasma könnte Enzyme enthalten, die einen selektiven Abbau von CAB1 und CAB2 bewirken. Es ist jedoch festzuhalten, dass die Aktivitätskriterien prinzipiell richtig sind. Die Abhängigkeit von der Länge des Linkers für die Guanidinofunktion ist als zusätzliches Kriterium anzusehen.

Die Synthese der nicht-peptidischen Analoga hat gezeigt, dass es möglich ist, indol- und guanidinreiche antimikrobielle Verbindungen zu erzeugen, die nicht über das Grundgerüst eines zyklischen Peptides verfügen. Da man das Grundgerüst offensichtlich frei wählen kann, ist eine Vielzahl von Substanzen denkbar, die über drei Indole oder andere geeignete Aromaten und drei Guanidine verfügen und die somit als Kandidaten für antimikrobielle Verbindungen diskutiert werden können. Es stellt sich daher die Frage, welche Aussicht besteht, dass diese Verbindungen zu neuen Antibiotika führen. Die Forderung, dass diese Verbindungen über drei Guanidine und drei Indole verfügen sollten, ist gleichzusetzen mit der Forderung, dass sie zahlreiche Wasserstoffbrücken-Donoren und ein hohes Molekulargewicht besitzen müssen. Diese Forderungen stehen im Widerspruch zu den Lipinski-Regeln, einem Satz von Bedingungen, die ein Wirkstoff erfüllen muss, um eine gute Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe zu zeigen [171]. Es ist daher eine geringe orale Bioverfügbarkeit zu erwarten, so dass eine Verabreichung in Tablettenform, wie bei den meisten Antibiotika üblich, unwahrscheinlich ist.

Die festgestellte Lyse von Erythrozyten für die c-RW-Peptide sowie für die synthetisierten Analoga spricht außerdem für eine Zytotoxizität dieser Verbindungen. Besonders die Lyse von Erythrozyten ist ein Problem, das bei einer intravenösen Gabe unerwünscht wäre. Es ist daher entscheidend, bei einer Weiterentwicklung verstärkt auf das Problem der Selektivität für bakterielle Membranen zu achten. Inwiefern dies erreicht werden kann, ist jedoch nicht abzusehen.

Alternativ ist eine topische (oberflächliche) Anwendung als eine Art Desinfektionsmittel denkbar, für welche die Zytotoxizität und geringe Bioverfügbarkeit kein Problem darstellen. Auch hier ist das Biguanid Chlorhexidin beispielgebend, das seit Jahrzehnten erfolgreich und in großem Umfang als Desinfektionsmittel im medizinischen Bereich eingesetzt wird. Es zeigt, dass ein Bedarf auch an solchen Wirkstoffen vorhanden ist. Die hier erkannten Prinzipien können dazu beitragen, neue Wirkstoffe zu entwickeln, die eine medizinische Verwendung finden.

5. Zusammenfassung

Arginin- und tryptophanreiche Motive sind in vielen natürlichen antimikrobiellen Peptiden vorhanden. Auch kombinatorischen Peptidbibliotheken entnommene antimikrobielle Peptide weisen arginin- und tryptophanreiche Motive auf. Das Hexapeptid cyclo(RRWWRF) ist eine der kürzesten antimikrobiell wirksamen Sequenzen. In dieser Arbeit wurden die Konformationen des Peptides in Lösung und gebunden an Mizellen bestimmt, seine Wechselwirkung mit Lipiden untersucht und basierend auf diesen Erkenntnissen nicht-peptidische Analoga entwickelt. Es zeigte sich, dass das Peptid cyclo(RRWWRF) in Lösung weniger gut strukturiert ist, während es gebunden an SDS- und DPC-Mizellen eine gut definierte Struktur einnimmt. Die aromatischen Aminosäuren waren auf derselben Seite des Moleküls gruppiert, die gegenüberliegende Seite wurde durch die Argininseitenketten gebildet, wodurch dem Molekül eine amphipathische Struktur verliehen wurde. Durch die Bestimmung der T_1 -Zeiten in Gegenwart einer paramagnetischen Verbindung sowie durch NOEs zwischen Peptidprotonen und Protonen der SDS- und DPC-Mizellen wurde festgestellt, dass das Peptid an der Mizell-Wasser-Grenzfläche lokalisiert und der hydrophile Teil des Moleküls dem Wasser zugewandt war. Strukturuntersuchungen an substituierten Peptiden erlaubten Einblicke in den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion der Peptide. Entscheidend für die Aktivität waren die Guanidinogruppen der Argininseitenketten sowie das Vorhandensein voluminöser hydrophober Gruppen, wie die Seitenketten der Tryptophane. Um die in mizellarer Umgebung gewonnenen Strukturinformationen auf Lipiddoppelschichten übertragen zu können, wurden Moleküldynamiksimulationen von Membransystemen aus cyclo(RRWWRF)-Peptiden und Dipalmitoylphosphatidylcholin-Molekülen in unterschiedlichen Zusammensetzungen durchgeführt. Diese Simulationen bestätigten die NMR-Strukturdaten

hinsichtlich der Konformation und der Lokalisation des Peptides. Die Lipide waren an der Grenzschicht komprimiert und es wurde eine Störung der elektrostatischen Wechselwirkungen der Lipide bewirkt. Die Argininseitenketten erwiesen sich als hervorragende Partner für Wasserstoffbrückenbindungen mit den Lipidkopfgruppen. Die resultierenden Peptid-Lipid-Komplexe reduzierten die Fluidität der Membran. Mit dem Peptid assoziiertes Wasser drang tief in den hydrophoben Bereich der Membran ein.

Als Voraussetzungen für die antimikrobielle Aktivität wurden die folgenden Eigenschaften postuliert: 1. das Vorhandensein von drei Guanidinofunktionen, 2. das Vorhandensein von drei voluminösen Aromaten, 3. die Möglichkeit, eine amphipathische Struktur auszubilden. Diese Annahmen wurden durch das Design und die Synthese analoger nicht-peptidischer Verbindungen überprüft, bei denen drei Guanidine und drei Indole an ein Trimesinsäure-Grundgerüst gekoppelt wurden. Diese Verbindungen zeigten eine dem cyclo(RRWWRF)-Peptid ähnliche antimikrobielle Aktivität, die teilweise selektiv für *Bacillus subtilis* war. Diese neuen Analoga bestätigen zum einen die Gültigkeit der postulierten Aktivitätskriterien, sie stellen aber auch die ersten nicht-peptidischen Analoga tryptophan- und argininreicher Peptide dar.

Summary

Arginine- and tryptophan-rich motifs are present in many natural antimicrobial peptides. Also antimicrobial peptides derived from combinatorial libraries displayed arginine- and tryptophan-rich motifs. The hexapeptide cyclo(RRWWRF) is one of the shortest sequences with antimicrobial activity. In this thesis, the structure of the peptide was determined in solution and bound to micelles. Furthermore, important peptide-lipid interactions were characterized and based on these results, non-peptidic analogues were developed. It was found that the peptide cyclo(RRWWRF) is less structured in solution, whereas when bound to SDS- and DPC-micelles, it adopts a well defined structure. The cluster

of aromatic residues forming one side of the molecule and the arginine side chains forming the opposite site gives rise to an amphipathic structure. The determination of T_1 times in presence of a paramagnetic compound and NOEs between protons of the peptide and the SDS- and DPC-micelles revealed the localisation of the peptide at the micelle-water-interface and the orientation of the hydrophilic part of the molecule towards the water. The structure determination of substituted peptides allowed conclusions concerning the relationship between structure and function. The guanidine moieties of the arginine side chains as well as the existence of bulky hydrophobic groups like tryptophan side chains turned out to be crucial for the activity. In order to transfer the structural information derived from micellar environments to a lipid bilayer, molecular dynamics simulations were carried out consisting of DPPC membranes with different numbers of cyclo(RRWRF) peptides. These simulations confirmed the NMR data concerning the conformation and the localisation of the peptide. The lipids were compressed at the interface and the electrostatic interactions of the lipids were perturbed. The arginine side chains appeared to be well suited to bind to lipid head groups through hydrogen bonds, the resulting complexes of peptides and lipids reduced the membrane fluidity. Peptide-associated water entered the hydrophobic regions of the membrane.

As prerequisites for the antimicrobial activity, the following properties were postulated: 1. the presence of three guanidino moieties, 2. the presence of three bulky aromatic moieties, 3. the possibility to form an amphipathic structure. These assumptions were verified, through the design and the synthesis of analogous non-peptidic compounds, which had three guanidino moieties and three indoles coupled to a framework of trimesic acid. These compounds showed an antimicrobial activity similar to cyclo(RRWRF), with some compounds being selective for *Bacillus subtilis*. On one hand, these new analogues verified the postulated prerequisites for the activity. On the other hand, they represent the first non-peptidic analogues of tryptophan- and arginine-rich peptides.