

## 2 Ergebnisse

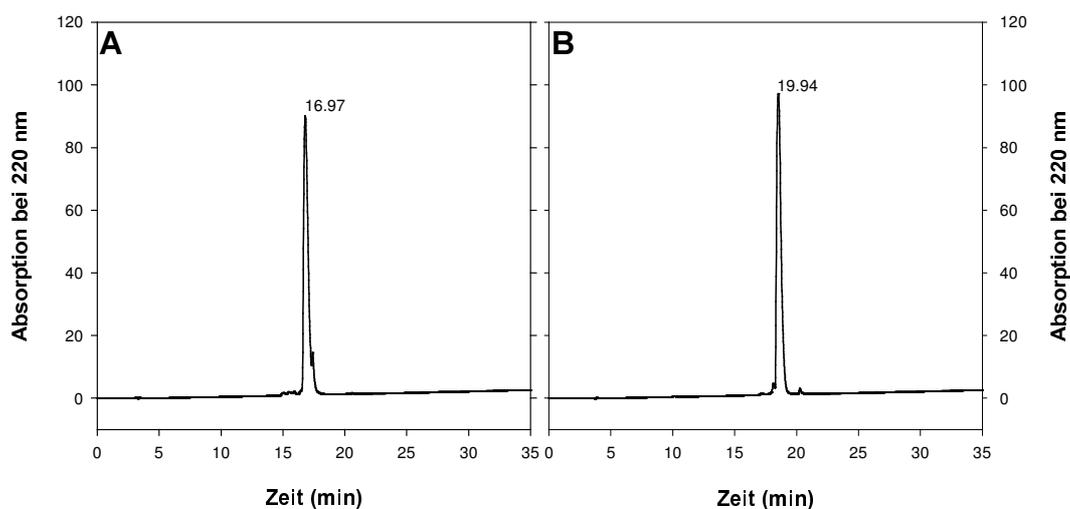
### 2.1 Synthese & Charakterisierung der Hexapeptide

Zu Beginn der Experimente stand das rationale Design einer Peptidbibliothek. Wie in der Einleitung schon beschrieben, sind dabei kleine R-/W-reiche Peptide von besonderem Interesse. Aus den bisher publizierten Erkenntnissen heraus wurde eine Peptidbibliothek synthetisiert, welche sich von der Leitsequenz RRWWRF ableitet (97-99). Für das Design und die Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehungen der Peptide wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

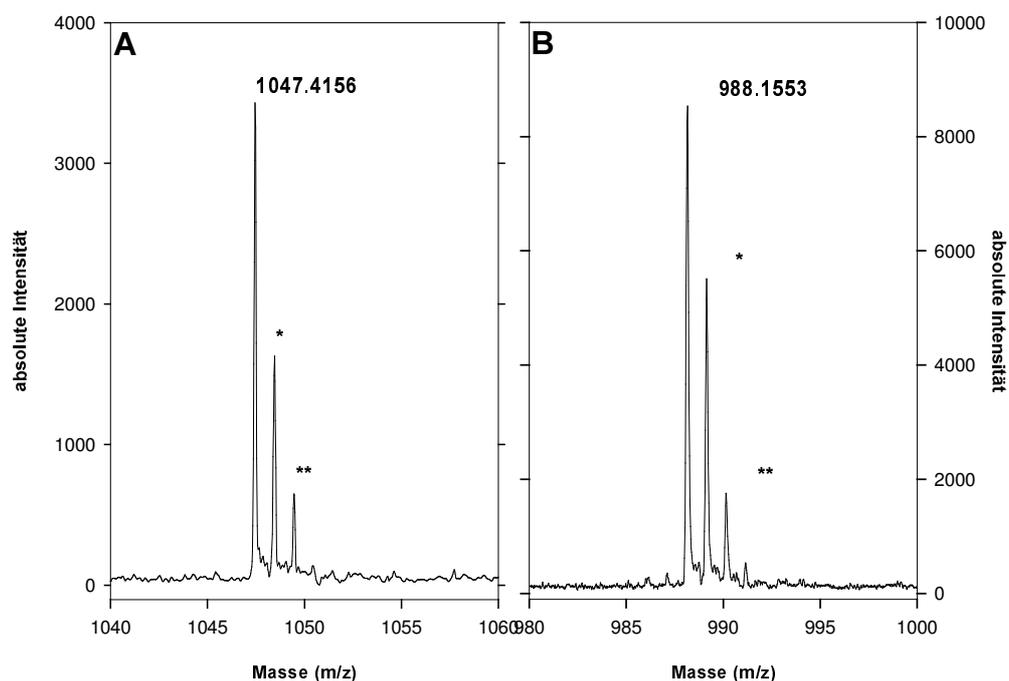
- Variation in der Aminosäuresequenz durch Änderungen in den Positionen der Aminosäurereste;
- Konformationelle Einschränkungen durch „head-to-tail“-Cyclisierung;
- Lokale sterische Änderungen durch D-Aminosäure-Substitutionen;
- Hydrophober Einfluss von Aminosäureresten durch den Austausch der W-Aminosäure mit Naphtylalanin (Nal);

Da die Wichtigkeit der Trennung kationischer und hydrophober Domänen erkannt worden war (68,95,111), sollte der Einfluss in der Variation der Aminosäuresequenz von kationischen und aromatischen Resten auf die Aktivitäten der Hexapeptide untersucht werden. Ergänzend dazu sollte durch eine Cyclisierung der Hexapeptide deren Konformation eingeschränkt werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass solche Einschränkungen z.T. essentiell für die Aktivität eines Peptides sein können und die Ausbildung einer amphipathischen Struktur fördern können (97,98,107,108). Daher wurden die linearen Sequenzen unter Verwendung der Kupplungsreagenz HAPyU homodet (engl. „head-to-tail“) cyclisiert (Details s. Material & Methoden) (112-114). Um den lokalen sterischen Einfluss innerhalb eines solchen in seiner Flexibilität eingeschränkten Systems zu prüfen, wurde in das cyclische Leitpeptid aufeinanderfolgend an den Positionen 1-6 eine D-Aminosäure eingebracht. Es ist berichtet worden, dass das Einbringen einzelner D-Aminosäuren in cyclische Penta- und Hexapeptide großen Einfluss auf die Konformation und somit auch auf die biologische Aktivität nehmen kann (115,116).

Da die Hydrophobizität maßgeblich an der Amphipathie eines Peptids beteiligt ist (92,117), wurde ein Naphtylalanin-Austausch (Nal) der W-Aminosäure vorgenommen. Der Naphtylalaninrest ist mit einem  $\log P$ -Wert von 3.15 ( $\log k_w$ -Wert 1.30) hydrophober als der W-Rest, der einen  $\log P$ -Wert von 2.25 ( $\log k_w$ -Wert 0.84) aufweist (Details s.u.) (118-120). So sollte untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen der Aktivität und der Hydrophobizität der Hexapeptide gibt. Die erstellte



**Abbildung 6 / HPLC-Chromatogramme ausgewählter Hexapeptide** Darstellung zweier charakteristischer Chromatogramme für (A) RW3 (RRWFWR) und (B) cRW3 (cycloRRWFWR). Die Reinheit lag für RW3 bei 97.4% bzw. für cRW3 bei 97.9%.



**Abbildung 7 / Massenspektren ausgewählter Hexapeptide** Darstellung zweier charakteristischer Massenspektren für (A) RW3 (RRWFWR) und (B) cRW3 (cycloRRWFWR). Die mit \* bzw. \*\* markierten Peaks repräsentieren die Isotope ( $^{13}\text{C}$  bzw.  $2 \times ^{13}\text{C}$ ) des jeweiligen Peptids.

Bibliothek umfasste somit drei Sets (all-L, D-substituiert, Nal-substituiert) bestehend aus insgesamt 21 Hexapeptiden, die erfolgreich synthetisiert werden konnten. Die erfolgreiche Synthese wurde durch

die ermittelten Werte bei den RP-HPLC-Messungen (Abbildung 6) und der Massenspektrometrie belegt (Abbildung 7 und Übersicht in Tabelle 4).

	Peptid- kennung	AS-Sequenz*	berechnete Masse	festgestellte Masse	Reinheit (%) nach RP- HPLC
all-L Peptide	<i>RW</i>	RRWWRF	1047.3	1047.4	99.0
	<i>RW2</i>	RRWWFR	1047.3	1047.4	99.4
	<i>RW3</i>	RRWFWR	1047.3	1047.4	97.4
	<i>RW4</i>	RWRFWR	1047.3	1047.5	99.0
	<i>RW5</i>	FRWWRR	1047.3	1047.5	99.5
	<i>cRW</i>	cRRWWRF	988.2	988.2	99.9
	<i>cRW2</i>	cRRWWFR	988.2	988.7	98.1
	<i>cRW3</i>	cRRWFWR	988.2	988.2	99.9
	<i>cRW4</i>	cRWFWR	988.2	988.4	98.0
	<i>cRW5</i>	cFRWWRR	988.2	988.7	97.3
D-substituierte Peptide	<i>cRWd1</i>	c(rRWWRf)	988.2	988.5	99.9
	<i>cRWd2</i>	c(RrWWRF)	988.2	988.5	99.9
	<i>cRWd3</i>	c(RRwWRF)	988.2	988.5	98.7
	<i>cRWd4</i>	c(RRWwRF)	988.2	988.6	99.9
	<i>cRWd5</i>	c(RRWwRf)	988.2	988.6	95.3
	<i>cRWd6</i>	c(RRWWRf)	988.2	988.7	99.9
Naphtylalanin- substituierte Peptide	<i>RNa1</i>	FR <u>Nal</u> NaIRR	1069.3	1069.4	99.6
	<i>RNa2</i>	R <u>Nal</u> NaIRFR	1069.3	1069.6	99.0
	<i>RNa3</i>	FRR <u>Nal</u> NaIR	1069.3	1069.6	99.0
	<i>RNa4</i>	FRFR <u>Nal</u> NaI	1069.3	1069.5	99.8
	<i>cRNa1</i>	c(FR <u>Nal</u> NaIRR)	1010.2	1010.4	97.0

\* Naphtylalanin, Nal

**Tabelle 4 / Massen- & Reinheitsangaben** Berechnete und ermittelte Massen sowie die Reinheiten der Hexapeptide.

## 2.2 Biologische Aktivitäten

Viele der bisher gefundenen antimikrobiellen Peptide interagieren mit Membranen und sind dabei cytotoxisch als Folge einer Störung der Bakterienmembran. Bei den Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen ist zu berücksichtigen, dass sich Gram-positive und Gram-negative Bakterien im Aufbau der Zellwand grundlegend unterscheiden. Beide Bakterienstämme besitzen eine Cytoplasmamembran, welche von einem Mureinsacculus umgeben ist. Bei den Gram-negativen Bakterien jedoch ist zusätzlich auf den ein- oder maximal zweischichtigen Mureinsacculus eine weitere Membran aufgelagert. Es gilt daher auszuschließen, dass eine mögliche bakterizide Wirkung der Peptide durch diesen phänotypischen Unterschied beeinträchtigt wird damit potentielle Peptidantibiotika gleichermaßen gegen verschiedene Bakterienstämme wirken. Vor diesem

Hintergrund wurde jeweils ein Vertreter Gram-positiver (*Bacillus subtilis*, PY22) und Gram-negativer (*Escherichia coli*, DH5 $\alpha$ ) Bakterien in den Experimenten verwendet. Da eine hohe antimikrobielle Aktivität bei gleichzeitiger geringer Toxizität gegenüber humanen Zellen erwünscht ist, wurden alle Peptide der Bibliothek auch auf ihre hämolytische Aktivität hin untersucht. Die dabei verwendeten Humanerythrozyten standen repräsentativ für eine Säugerzelle, welche keine Zellwand besitzt. Eine Übersicht der Ergebnisse zur antibakteriellen und hämolytischen Aktivität aller R-/W-reichen Hexapeptidanaloga ist in der Tabelle (Tabelle 5) zusammengestellt.

Peptid-name	Biologische Aktivitäten			Permeabilisierungsaktivitäten*	
	MIC <sup>a</sup> <i>E.coli</i>	MIC <sup>a</sup> <i>B.subtilis</i>	Lyse <sup>b</sup> Erythrocyten (%)	EC <sub>25</sub> <sup>c</sup> POPG:POPE (75% / 25% (mol/mol))	EC <sub>25</sub> <sup>c</sup> POPC:CHOL (75% / 25% (mol/mol))
<b>R-/W-reiche Analoga</b>					
RW	>100	25	7	84	44
RW2	125	31	8	116	92
RW3	125	31	6	113	56
RW4	125	31	4	>160	72
RW5	>125	16	6	46	32
cRW	6	3	24	19	8
cRW2	4	4	28	9	2
cRW3	2	4	18	8	2
cRW4	8	4	23	18	6
cRW5	16	4	14	19	9
<b>D-substituierte</b>					
cRWd1	16	4	19	45	9
cRWd2	16	4	11	20	13
cRWd3	16	8	10	15	13
cRWd4	8	4	14	38	12
cRWd5	8	8	9	36	20
cRWd6	16	4	11	21	14
<b>Nal-substituierte</b>					
RNa1	16	4	26	5	3
RNa2	31	8	6	9	5
RNa3	31	8	36	5	1
RNa4	31	4	22	5	2
cRNa1	8	2	49	7	1

\* Anmerkung: EC-Werte für POPE:POPG (75% mol/ 25% mol) > 160  $\mu$ M

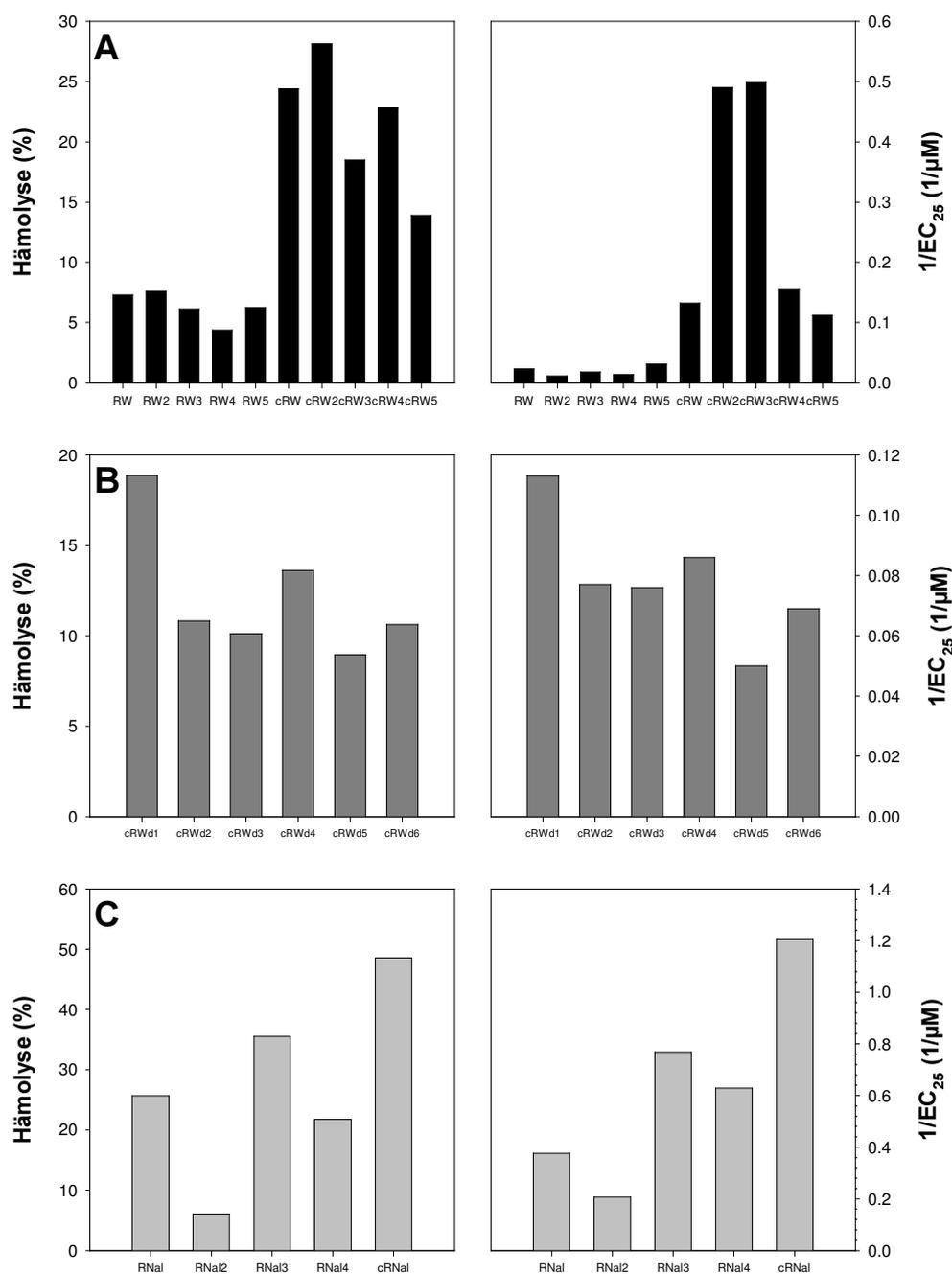
<sup>a</sup> Minimale inhibitorische Konzentration des Bakterienwachstums ( $\mu$ M)

<sup>b</sup> Lyse humaner roter Blutzellen in Prozent bei [Peptide]=100  $\mu$ M

<sup>c</sup> Farbstofffreisetzung; Konzentration der viertelmaximalen Entquenchung der Calceinfloureszenz ( $\mu$ M)

**Tabelle 5 / Antimikrobielle, hämolytische und permeabilisierende Aktivitäten der Hexapeptide**

Die linearen R-/W-reichen Peptide zeigten deutliche Unterschiede in ihren Aktivitäten gegenüber Gram-positiven und -negativen Zellen. Die Gram-positiven *Bacillus*-Zellen waren anfälliger gegenüber einer Peptidbehandlung. Das Wachstum von *Bacillus subtilis* konnte mit Konzentrationen von  $\leq 31 \mu$ M



**Abbildung 8 / Aktivitätsmuster der Hämolyse und der Farbstofffreisetzungen aus Liposomen**  
 Lyse der hRBC (%) und reziproke Konzentration der viertelmaximalen Calceinfreisetzung ( $1/EC_{25}$ ) aus POPC / Cholesterin-LUV (75% / 25% (mol/mol)) von (A) den all-L Hexapeptiden, (B) den D-substituierten Hexapeptiden und (C) den Nal-substituierten Hexapeptiden. Prozentualer Anteil der Hämolyse bei einer Peptidkonzentration von  $100 \mu\text{M}$  ( $1.9 \times 10^9$  Zellen/ml).  $EC_{25}$ -Daten stammen von den fluoreszenz-spektroskopisch gemessenen Calceinfreisetzungen nach 5 min bei steigenden Peptidkonzentrationen und einer Lipidkonzentration von  $25 \mu\text{M}$ .

Peptid gehindert werden. Im Vergleich dazu waren die MIC-Werte für die linearen Peptide gegen *Escherichia coli* größer als  $100 \mu\text{M}$ . Eine Cyclisierung steigerte auffällig den antibakteriellen Effekt. Der gefundene Effekt war für die Peptide c(RRWFR) (cRW2) und c(RRWFWR) (cRW3) gegen

*Escherichia coli* am ausgeprägtesten. So ist c(RRWFWR) (cRW3) nahezu um das 60fache aktiver als das entsprechende lineare Analogon Ac-RRWFWR-NH<sub>2</sub> (RW3) (2.0 µM zu 125 µM). Wie an den erhöhten MIC-Werten abzulesen ist, folgte aus der Einführung von D-Aminosäuren in das hochaktive cyclische Peptid c(RRWWRWF) (RW) eine leichte Abnahme der antibakteriellen Aktivität. Im Gegensatz hierzu führte der Austausch von W mit Nal zu einer allgemeinen Aktivitätssteigerung. Diese war, verglichen mit den R-/W-Peptiden, weder davon abhängig, an welcher Position sich der Aminosäurerest befand, noch von der Cyclisierung.

Anschließend an die antimikrobiellen Aktivitätsuntersuchungen folgten die Studien zur hämolytischen Aktivität der R-/W-reichen Peptidantibiotika. Diese dienten zur Einschätzung der Gefährdung von Säugerzellen bei möglicher therapeutischer Anwendung.

Die hämolytische Aktivität der linearen R-/W-reichen Peptide war sehr gering. Die beobachtete Lysis der Humanerythrozyten war geringer als 8% bei einer Peptidkonzentration von 100 µM (Abbildung 8 (A), links). Cyclisierung erhöhte die Aktivität bis um das 3.7fache. Alle D-substituierten Peptidanaloga waren weniger hämolytisch aktiv ( $\leq 19\%$ ) als das entsprechende all-L Analogon (24%). Höchste hämolytische Aktivitäten wurden bei den Nal-substituierten Peptidanaloga gefunden. Hier betrug die Lyse der Erythrozyten bis zu 36% bei den linearen Analoga und erreichte ein Maximum von 49% beim cyclischen Peptid.

Die Ergebnisse der antibakteriellen und hämolytischen Untersuchungen lassen erkennen, dass es eine biologische Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien gibt, die deutlich durch eine konformationelle Einschränkung (hier Cyclisierung) verstärkt wird. Dabei zeigte sich, dass Gram-positive Bakterien anfälliger gegenüber einer Behandlung mit den Hexapeptiden sind. Die beobachtete Aktivität gegenüber Humanerythrozyten ist als moderat zu bezeichnen. Daraus ist abzuleiten, dass die Hexapeptide eine gewisse Selektivität aufweisen, da sie unterschiedlich auf den jeweiligen Zelltypus einwirken.

### 2.3 CD-Spektroskopie

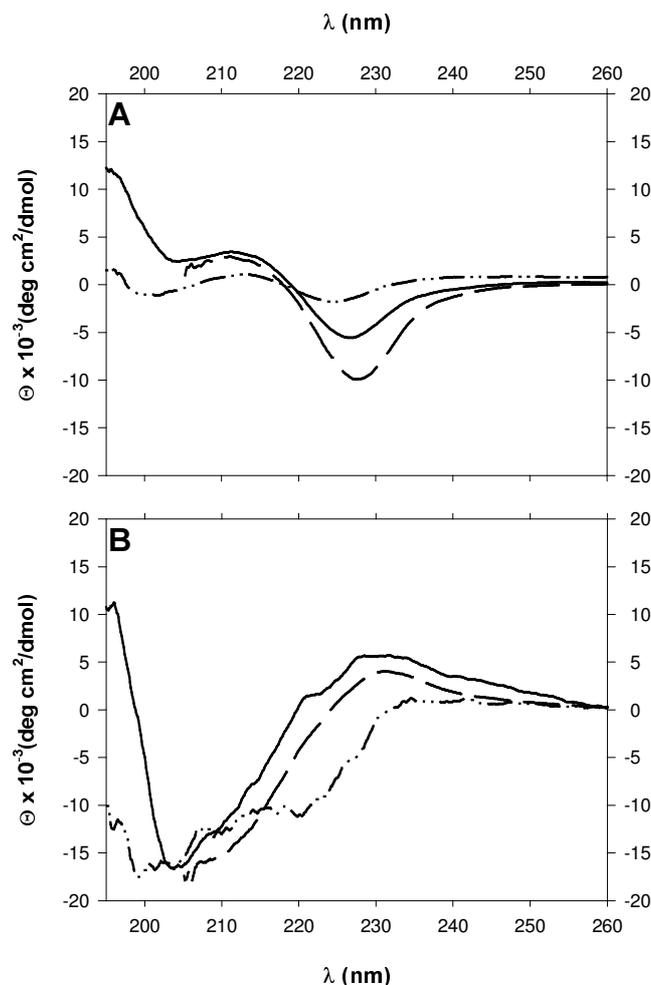
Die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie, eine chiroptische Methode, stellt eine Technik dar, mit deren Hilfe relativ einfach, schnell und sensitiv Konformationseigenschaften von Peptiden in Lösung untersucht werden können. Grundlage des Circular dichroismus ist die unterschiedliche Absorption von links- bzw. rechtsgerichtet zirkular polarisiertem Licht im UV-VIS-Bereich (100-1000 nm) durch optisch aktive Chromophore. Neben inherent chiralen absorbierenden Systemen zeigen auch achirale Chromophore einen CD, wenn sie durch das dissymmetrische Feld einer optisch aktiven Gruppe

gestört werden. So wird das CD-Spektrum von Peptidstrukturen vor allem durch Übergangsdipole der Amidgruppe bestimmt, die durch chirale  $C^\alpha$ -Atome beeinflusst werden. Bei Peptiden erfolgt eine Absorption hauptsächlich im Bereich von 180-240 nm durch  $\pi\pi^*$ -Übergänge der Amidgruppe (unter 200 nm) bzw. intensitätsschwächere  $n\pi^*$ -Übergänge im Wellenlängenbereich um 218 nm. Die Überlagerung der Beiträge aller Chromophore in einem Peptid führt zu den beobachteten komplexen CD-Spektren. Im allgemeinen wird in den Spektren die molare Elliptizität  $\Theta$  als Funktion der Wellenlänge  $\lambda$  dargestellt. Die Spektren geben weniger Auskunft über die Konformation bestimmter Molekülteile, sondern liefern vielmehr ein integrales Bild der Peptidstruktur, an deren Verwirklichung in Lösung intra- und intermolekulare Wechselwirkungen wie Wasser-stoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Ladungsbeziehungen beteiligt sein können. Abstands- und Orientierungsänderungen der absorbierenden Systeme gegenüber dem Störzentrum und Veränderungen der Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor infolge von Konformationsänderungen verschieben die Absorptionsniveaus. So werden Veränderungen der Milieubedingungen beispielsweise durch Temperaturveränderung, Änderung der Lösungsmittelpolarität oder ionische Zusätze, strukturstabilisierende Wechselwirkungen (intra- und intermolekularer Art) und Peptid-Lösungsmittel-Interaktionen beeinflussen und zur Einstellung eines neuen Konformationsgleichgewichtes führen, in einem verändertem CD ausgedrückt (121).

Verfahren zur Abschätzung von in Proteinen oder Peptiden vorhandenen Sekundärstrukturelementen ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt, Knäuelstruktur (engl. „random coil“)) auf der Basis der Analyse von CD-Spektren sind bereits seit Jahrzehnten etabliert, allerdings für kleine Peptide nur geringfügig geeignet, da die Analyseverfahren auf der Auswertung von Proteinen mit Sekundär- und Tertiärstrukturen basieren. Ausgehend von Arbeiten von Woody (122) wurde der Frage nachgegangen, ob auch nicht-repetitive Strukturelemente, wie z.B. sog.  $\beta$ -turns, im CD einer Verbindung ihren Ausdruck finden. Woody berechnete Rotationsstärken und theoretische CD-Kurven für blockierte Dipeptid-Rückgratkonformationen mit den Dihedralwinkeln der verschiedenen  $\beta$ -turn-Typen und teilte sie in Klassenspektren ein.

Dem Anspruch an einen Modellcharakter können auch die hier untersuchten Hexapeptide nicht genügen. Selbst im Falle eines im Peptid vorhandenen predominantem  $\beta$ -turns ist der CD einer Mischkonformation zu erwarten, da diese turns nur vier Aminosäureeinheiten umfassen und in den Hexapeptiden demzufolge zusätzliche Strukturelemente, wie beispielweise  $\gamma$ - oder „open-turn“-Konformationen, potentiell möglich sind.

Anhand der CD-Spektren sollte daher nur geschaut werden, ob sich Unterschiede in den Konformationen der kationischen Peptide erkennen lassen, wenn sie die Möglichkeit haben, mit den membranimitierenden Systemen zu interagieren. Dafür wurden CD-Spektren im Puffer (Kontrolle) und in Gegenwart von SDS-Mizellen und POPG-Liposomen aufgenommen.



**Abbildung 9 / CD-Spektren des linearen und cyclischen Leitpeptidanalogs** Dargestellt sind die CD-Spektren für das (A) lineare und (B) cyclische RW-Peptid in Puffer (Strich-Punkt-Linie), in der Gegenwart von SDS-Mizellen (gestrichelte Linie) und POPG-Vesikeln (durchgezogene Linie).

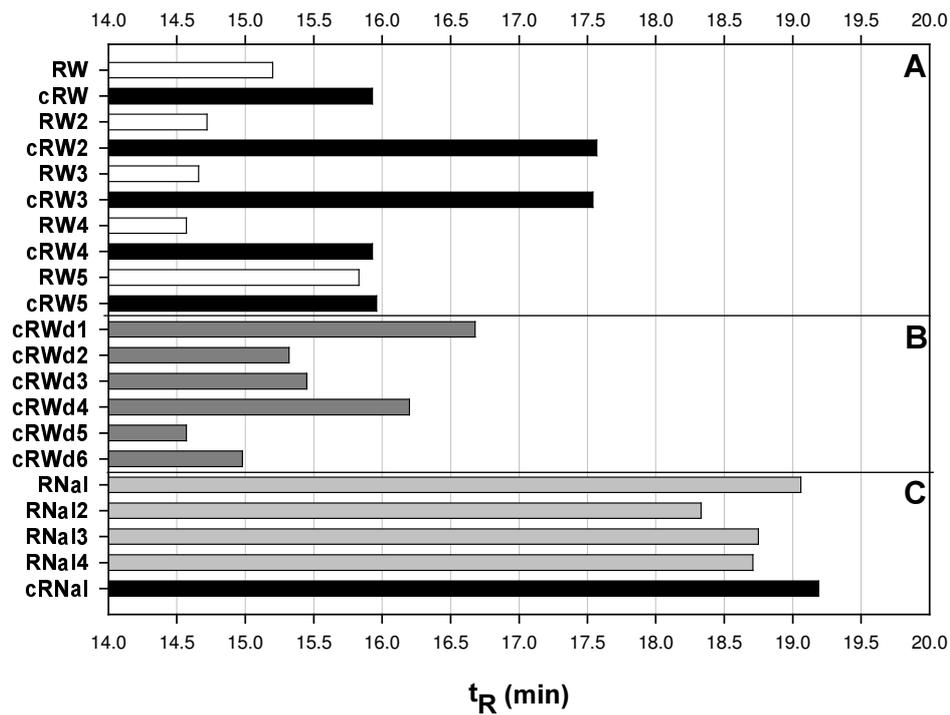
Die in Puffer aufgenommenen Spektren für das lineare RW-Peptid lassen zwei schwache negative Banden bei 200 und 225 nm erkennen (Abbildung 9 (A)). Die negative Bande ist charakteristisch für kleine ungeordnet-gestreckte (sog. „random coil“) Peptide und wahrscheinlich eine Folge des sensitiven Umfelddichroismus der W-Reste (123,124). In der Gegenwart von SDS-Mizellen bzw. POPG-Vesikeln ändern sich die Bandenintensitäten. Die negative Bande bei 225 nm zeigt eine Intensitätssteigerung und ist nach 228 nm hin verschoben. Auch erkennbar ist, dass die

Elliptizitätswerte im unteren Bereich der Wellenlängen (< 205 nm) positiv werden. Solche Veränderungen implizieren Einschränkungen in der Rückgratflexibilität. Die Zunahme der negativen Elliptizität um 225 nm kann auf Änderungen in der unmittelbaren Umgebung der aromatischen Reste zurückgeführt werden, wie sie für Vesikel-assoziierte Peptide schon beschrieben wurden (123). Das aufgenommene Spektrum des cyclischen Analogons cRW in Puffer zeigt eine deutlich negative Bande bei 202 nm und eine Schulter bei 230 nm (Abbildung 9 (B)). Die Spektren des Peptids in Gegenwart der SDS-Mizellen und POPG-Liposomen zeigen eine negative Bande um 205 nm und eine positive Bande um 230 nm. Die Spektrenänderungen zeigen eine offensichtliche Bindung an die Mizellen bzw. Vesikel und dass es als Folge dieser Bindung zu einer konformationellen Veränderung kommt. Die sehr ähnlich aussehenden Spektren lassen vermuten, dass die Strukturen des cyclischen Peptids in Gegenwart von Mizellen und Vesikeln vergleichbar sind. Das Maximum bei 230 nm spricht für deutliche Veränderungen in der Orientierung der aromatischen W- und F-Reste.

Diese Befunde lassen vermuten, dass konformationell sehr eingeschränkte Cyclopeptide beim Übergang vom ungebundenen (im Puffer) in den gebundenen (SDS- bzw. Vesikel-assoziiert) Zustand eine weitere Einschränkung seiner Konformation erfährt und es zu einer Neuorientierung der aromatischen Aminosäureseitenketten kommt. Somit ist festzuhalten, dass die Peptide in der Lage sind, mit Lipidoberflächen zu interagieren und als Folge der Bindung eine konformationelle Einschränkung erfahren, welche u.U. dem amphipathischen Prinzip förderlich ist.

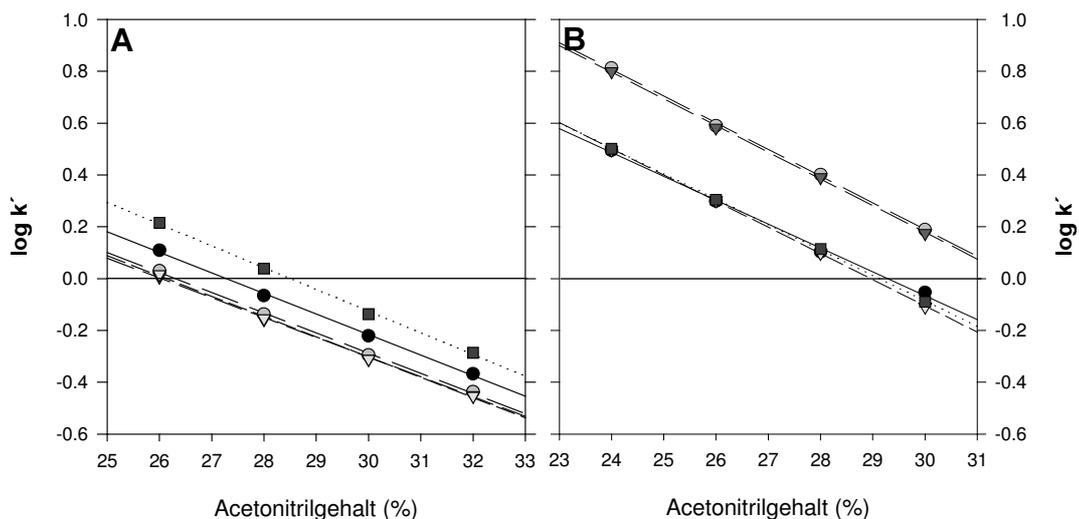
## **2.4 Hydrophobizitätsparameter**

Zusätzlich zu den sterischen und elektrostatischen Eigenschaften hat auch die Hydrophobizität starken Einfluss auf die biologische Aktivität von Peptiden (118,125). Legt man Hydrophobizitätswerte der einzelnen Aminosäurereste (Übersicht z.B. von D. Eisenberg (126)) der Berechnung der mittleren Hydrophobizität der einzelnen Peptide zu Grunde, so sollten sich die Werte nicht unterscheiden, da die Aminosäurekomposition sich nicht geändert hat. Bis auf die Nal-substituierten Hexapeptide ist die mittlere Hydrophobizität identisch, da jedes Peptid die gleiche Anzahl an R-, W-, und F-Resten besitzt. Da aber die Sequenz variiert, zudem einige der Peptide durch eine Cyclisierung konformationell stark eingeschränkt sind und den cyclischen Peptiden die beiden funktionellen Gruppen (Acetyl- und Amidgruppe) des linearen Peptids fehlen, galt es zu prüfen, inwieweit die globale bzw. effektive Hydrophobizität sich verändert.



**Abbildung 10 / HPLC-Retentionszeiten der Hexapeptide** Dargestellt sind die Retentionszeiten für (A) die all-L Peptide, (B) die D-substituierten Peptide und (C) die Nal-substituierten Peptide. Die Totzeit ( $t_0$ ) von 2.40 min ist bereits subtrahiert.

Um diese Frage zu klären und eventuell den Einfluss der Hydrophobizität mit der biologischen und biophysikalischen Aktivität der Hexapeptide korrelieren zu können, sind Hydrophobizitätsparameter mittels Umkehrphasen-HPLC bestimmt worden (118,127).



**Abbildung 11 / Änderungen in den Kapazitätsfaktoren** Änderungen der Kapazitätsfaktoren für (A) die linearen und (B) cyclischen Peptide des all-L Sets bei ansteigendem Gehalt an Aceton in Wasser (0.1% TFA; 37° C, (●) (c)RW, (●) (c)RW2, (▼) (c)RW3, (▼) (c)RW4, (■) (c)RW5)).

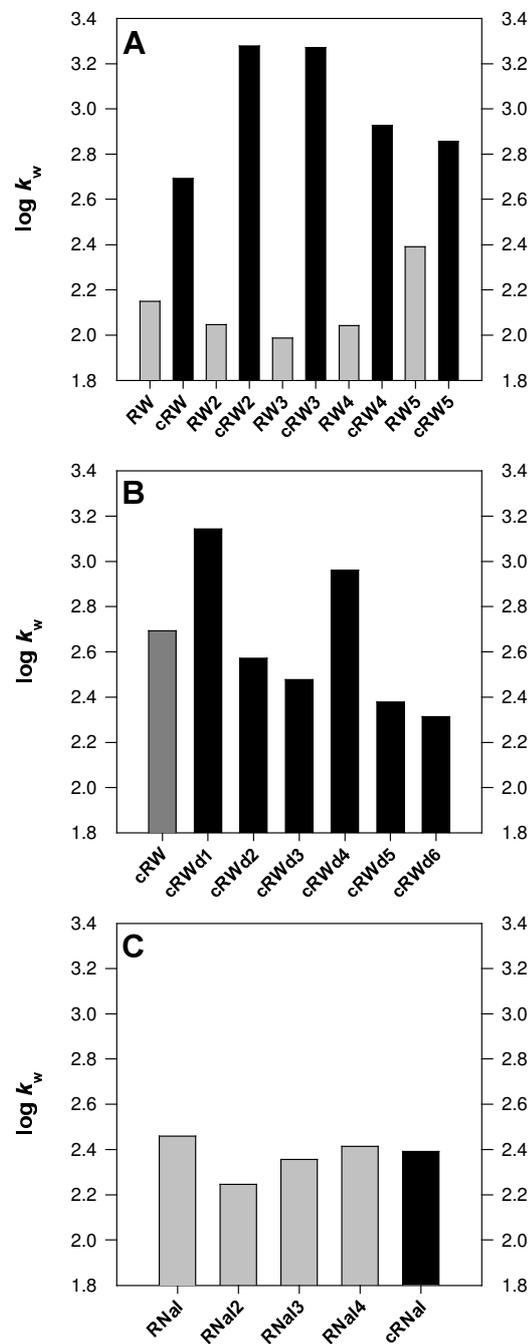
Die Retentionszeiten ( $t_R$ ) der Peptide sind in Abbildung 10 dargestellt. Die  $t_R$  der linearen R-/W-Peptide waren kleiner (14.6 - 15.8 min) als die der entsprechenden cyclischen Analoga (15.9 – 17.6 min). Die größten  $t_R$ -Werte (17.5 und 17.6 min) wurden für c(RRWWFR) (cRW2) und c(RRWFWR) (cRW3) beobachtet. Das demonstriert die höhere Affinität zur hydrophoben Phase der HPLC-Säule der Peptide mit Clustern von aromatischen Aminosäuren. Ein Vergleich des Retentionsverhalten von c(RRWWRf) (cRW), c(rRWWRf) (cRWd1) und c(RRWwRF) (cRWd4) zeigte eine höhere Affinität der D-Analoga, wohingegen die Einführung einer D-Aminosäure bei den übrigen D-Analoga zu keiner weiteren Steigerung der Affinität führte. Die größten und am wenigsten differenzierten  $t_R$  wiesen die Nal-Peptide FRNaINaIRR (RNaI)- FRRNaINaIR (RNaI4) (18.3 - 19.1 min) und c(FRNaINaIRR) (cRNaI) (19.2 min) auf.

Generell ist der Verteilungskoeffizient zwischen 1-Oktanol und Wasser ( $\log P$ ) als hydrophober Parameter und Referenzsystem auf Grund der - wenngleich eingeschränkten - Analogie zu Biomembranen akzeptiert. Jedoch ist seine Nutzung durch experimentelle Probleme limitiert (128), und alternative Methoden wie die Ermittlung der isokratischen Kapazitätsfaktoren ( $\log k'$ ) mittels HPLC werden zur Bestimmung von Hydrophobizitätsindices herangezogen. Dabei wird die Veränderung von  $\log k'$  in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil eines organischen Lösungsmittels (hier Acetonitril) im Laufmittel aufgetragen und auf 100% Wasser ( $\log k_w$ ) extrapoliert (Abbildung 11). Man erhält so ein Maß für die individuelle Hydrophobizität der Hexapeptide.

In Abbildung 12 sind die  $\log k_w$ -Werte für die jeweiligen Sets der Bibliothek dargestellt. Die für das all-L-Set dargestellten Hydrophobizitätswerte lassen deutlich erkennen, dass die cyclischen Peptide größere Werte besitzen als die entsprechenden linearen Analoga (Abbildung 12 (A)). Zudem ist zu erkennen, dass bei den cyclischen Peptiden mit einer Clusterung der aromatischen Aminosäurereste die  $\log k_w$ -Werte am größten sind, was auf eine erhöhte Affinität gegenüber der hydrophoben Phase der HPLC hindeutet. Die Einführung von D-Aminosäuren in die Leitsequenz führte lediglich in zwei Fällen (c(rRWWRf) und c(RRWwRF)) zu größeren  $\log k_w$ -Werten im Vergleich zur all-L Sequenz (Abbildung 12 (B)). Die Einführung einer D-Aminosäure in die übrigen Positionen hatte eine Abnahme der Hydrophobizität zur Folge, was sich in den geringeren  $\log k_w$ -Werte ausdrückt.

Die Daten zu dem Nal-Set zeigen nur geringe Unterschiede zwischen dem linearen und cyclischen Analogon (Abbildung 12 (C)). Es fällt auf, dass die  $\log k_w$ -Werte grundsätzlich unter denen der cyclischen all-L Peptide liegen, obwohl der Nal-Rest hydrophober ist als der W-Rest. Um die einzelnen  $\log k_w$ -Werte vergleichen zu können, muss der Bereich der Acetonitrilkonzentration, in dem

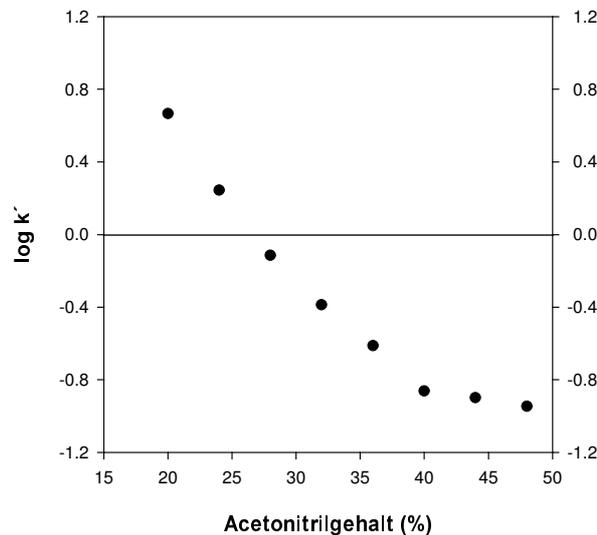
die  $\log k$ -Werte ermittelt werden, identisch sein. Über den Meßbereich findet man eine lineare Abhängigkeit der  $\log k$ -Werte für die Peptide des Nal-Sets, doch führt eine Extrapolation auf 100%



**Abbildung 12 / Hydrophobizitätsparameter der Hexapeptide** Dargestellt sind die ermittelten  $\log k_w$ -Werte für (A) die all-L Peptide, (B) die D-substituierten Peptide im direkten Vergleich zur all-L Sequenz (dunkelgrauer Balken) und (C) die Nal-substituierten Peptide.

Wassergehalt zu geringeren  $\log k_w$ -Werten. Die ermittelten Werte lagen unter den Werten der R-/W-Peptide, obwohl der Nal-Rest eine größere Hydrophobizität besitzt als der F-Rest. Dieses ist durch ein

mögliches nicht-lineares Verhalten zwischen den  $\log k$ -Werten und der Acetonitrilkonzentration zu erklären. Solch eine nicht-lineare Korrelation wurde in Vorversuchen z.B. für das c(RRW<sub>w</sub>rF)-Peptid (cRWd5) beobachtet (Abbildung 13). Demnach kann man die gemessenen Werte der NaI-Peptide nur untereinander vergleichen, nicht jedoch mit den Peptiden der übrigen Sets. Nichtsdestominder

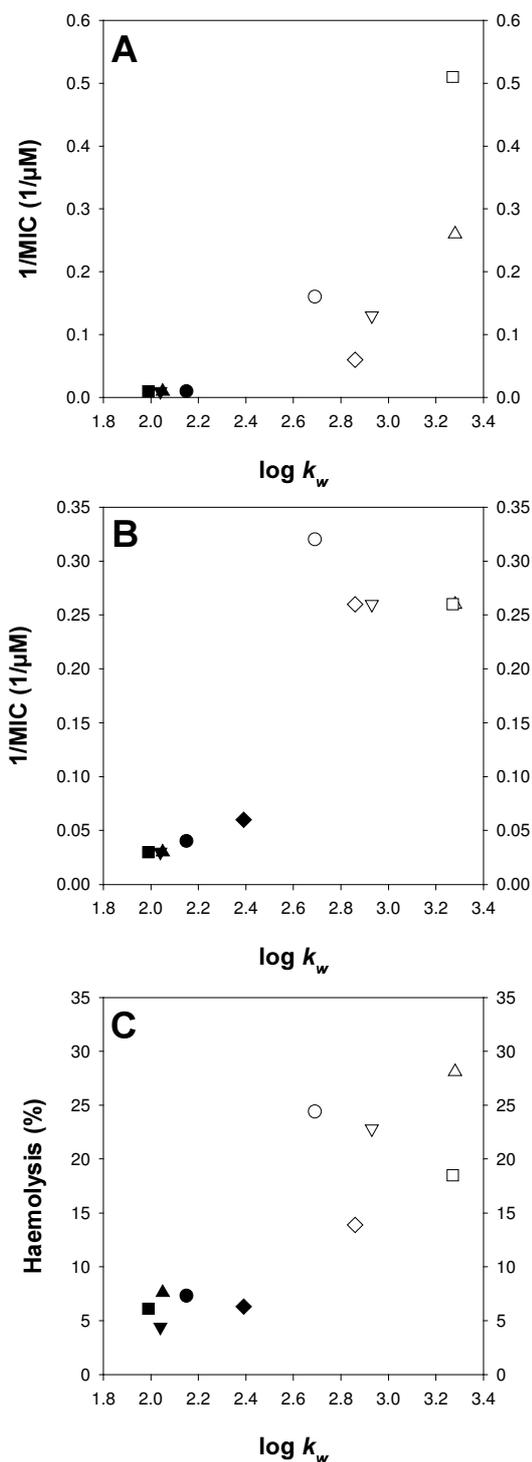


**Abbildung 13 / Änderungen in den Kapazitätsfaktoren**  
Dargestellt sind die ermittelten  $\log k$ -Werte für das cRWd5-Peptid bei ansteigendem Gehalt an Acetonitril in Wasser.

machen die ermittelten  $t_R$ - und  $\log k_w$ -Daten deutlich, dass, obwohl die Aminosäurezusammensetzung bei dem all-L- und D-Set identisch ist, sich Variationen in der Aminosäurepositionierung und konformationelle Einschränkungen auf die effektiven Hydrophobizitäten der individuellen Hexapeptide auswirken. Zudem zeigt sich für die RW-Sequenzen, dass die antimikrobielle Aktivität deutlich mit der Hydrophobizität korreliert (Abbildung 14). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass sich durch das Clustern der aromatischen Aminosäurereste und konformationelle Einschränkungen der Rückgratstruktur vergrößerte hydrophobe Domänen ausbilden können und so zur Amphipathie des Moleküls stark beitragen.

## 2.5 Farbstofffreisetzung aus Vesikeln

Wie die CD-Versuche schon gezeigt haben, ist eine Assoziation der Peptide an Lipidstrukturen möglich, und um ein besseres Verständnis von dem Wirkmechanismus zu erhalten, wurden Freisetzungsversuche aus Liposomen, welche mit dem sich selbst quencheden Farbstoff Calcein beladen waren, durchgeführt. Da die verwendeten Liposomenspezies jeweils die Lipidkomposition der

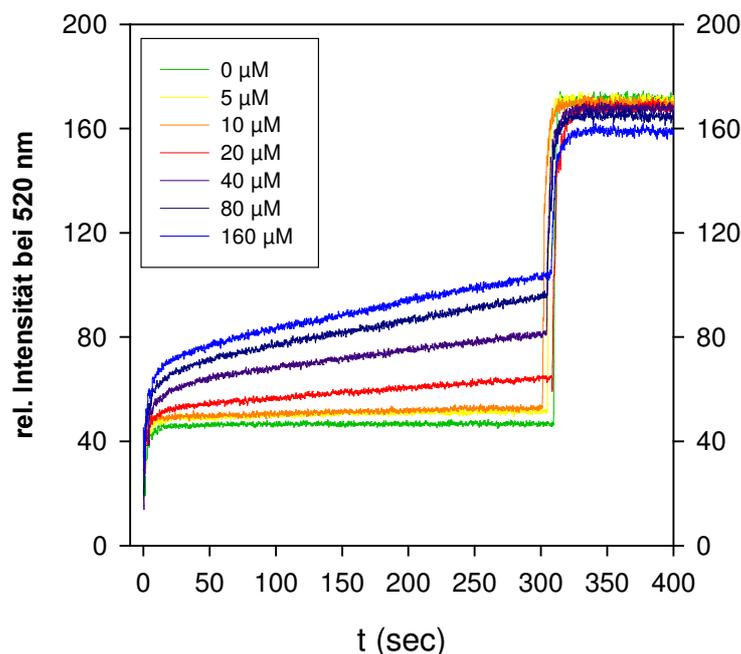


**Abbildung 14 / Minimale inhibitorische Konzentration des Bakterienwachstums und Hämolyse als Funktion der Peptidhydrophobizität**  
 Reziproke minimale inhibitorische Konzentration ( $1/\text{MIC}$ ) von (A) *Escherichia coli* und (B) *Bacillus subtilis* und Lyse der hRBC (%) aufgetragen gegen den Hydrophobizitätsparameter ( $\log k_w$ ). ((●) RW\*, (▲) RW2, (■) RW3, (▼) RW4, (◆) RW5\*\*, (○) cRW, (△) cRW2, (□) CRW3, (▽) cRW4, (◇) cRW5)  
 Für (A) gilt: \*/\*\* MIC > 100  $\mu\text{M}$  bzw. > 125  $\mu\text{M}$

Ziellmembran der oben erwähnten Zellen imitieren sollte, wurden drei verschiedene Arten an Liposomen hergestellt:

- (i) POPG / POPE (75% / 25% (mol/mol))
- (ii) POPG / POPE (25% / 75% (mol/mol))
- (iii) POPC / Cholesterin (75% / 25% (mol/mol))

Die Liposomen mit einem vermehrten Anteil an negativ geladenem POPG (i) stehen repräsentativ für die Cytoplasmamembran von *Bacillus subtilis* (129-131). Um die Cytoplasmamembran in ihrer Lipidkomposition einer *Escherichia coli*-Zelle zu imitieren, wurde das zuvor unter (i) benutzte Verhältnis von POPG zu POPE (75% / 25% (mol/mol)) umgekehrt (ii) (79,131,132). Das verwendete POPC / Cholesterin-Verhältnis (iii) spiegelt die Lipidanteile der Erythrocytenmembran wider (55,56,133). Durch die Untersuchungen der Aktivität gegen eine der jeweiligen Liposomenspezies konnten Daten zum Permeabilisierungspotential der spezifischen Lipiddoppelschicht erhoben werden (Abbildung 8, rechts & 15).



**Abbildung 15 / Konzentrationsabhängige Kinetiken der Vesikelpermeabilisierung** Konzentrationsabhängiger Anstieg in der Calceinfluoreszenz induziert durch cRW3 an POPG:POPE (75% / 25% (mol/mol)) LUV als Funktion der Zeit. Die Lipidkonzentration betrug 25 µM. Totale Farbstofffreisetzung wurde nach 5 min durch Zupipettierung von Triton X-100 induziert.

Die Ergebnisse der Experimente mit negativ geladenen POPG / POPE- (75% / 25%; (mol/mol)) und neutralen POPC / Cholesterin-Liposomen (75% / 25%; (mol/mol)) demonstrieren die permeabilisierende Aktivität der Peptide (Tabelle 5). Lineare R-/W-Peptide zeigten eine moderate

Aktivität. Die Peptidkonzentrationen, die zu 25% der maximalen Fluoreszenz ( $EC_{25}$ ) führten, variierten zwischen 46 und  $< 160 \mu\text{M}$  bei Studien an POPG / POPE- Liposomen (75% / 25% (mol/mol)). Die Permeabilisierungsaktivität konnte durch Cyclisierung gesteigert werden. Der Effekt der Cyclisierung war auch hier am ausgeprägtesten für die Peptide mit drei in Folge positionierten aromatischen Aminosäuren (c(RRWWFR) (cRW2) und c(RRWFWR) (cRW3)). Vergleichbar mit den biologischen Systemen folgte auf die Einführung von D-Aminosäuren in die cyclische Leitsequenz eine Reduzierung der Aktivität, wenngleich die Unterschiede in den  $EC_{25}$ -Werten gering ausfielen. Die höchsten, aber am wenigsten differenzierten  $EC_{25}$ -Werte wurden für die Peptide des Nal-Sets gefunden. In Abbildung 8 ist die Korrelation der hämolytischen und permeabilisierenden Aktivität bei POPC / Cholesterin-Doppelschichten illustriert. Die weniger hämolytischen linearen Peptide zeigten auch eine geringere Permeabilisierungsaktivität gegenüber neutralen Lipiddoppelschichten. Im Kontrast dazu steht die hohe Aktivität der cyclischen Analoga (Abbildung 8 (A)). Die Aktivitätsmuster der Peptide des D-Sets (Abbildung 8 (B)) sowie der wesentlich aktiveren Peptide des Nal-Sets (Abbildung 8 (C)) waren nahezu identisch. Außergewöhnlich war die Tatsache, dass keine Farbstofffreisetzung aus den weniger negativ geladenen POPE / POPG- (75% / 25%; (mol/mol)) Liposomen, welche die Cytoplasmamembran Gram-negativer Bakterien nachbilden, gemessen werden konnte.

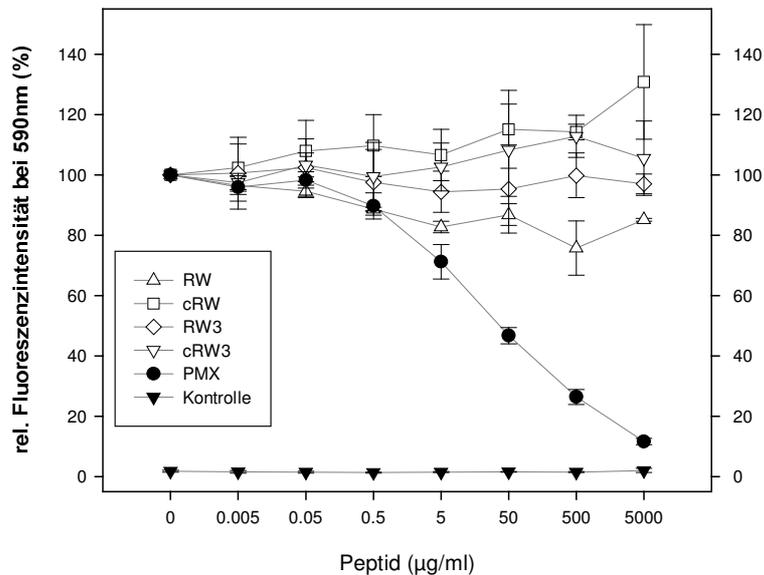
Die Untersuchungen an den artifiziellen Lipiddoppelschichten zeigen eine Interaktion der Peptide mit stark negativ geladenen und neutralen Membranen, die entweder zu einer Porenbildung und / oder Lyse führt.

Warum sich keine Permeabilisierung der nur schwach negativ geladenen *Escherichia*-Liposomen (ii) messen ließ, sollte anhand von Bindungsstudien (Bindung an Lipid A, s.u.) und Experimenten *in vivo* (Zellpermeabilisierung von *Escherichia coli*-Zellen, s.u.) geklärt werden.

## 2.6 Bindung an Lipid A

In den folgenden Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, warum keine Permeabilisierung der Liposomen, die die Lipidkomposition der Cytoplasmamembran von *Escherichia coli* nachbildeten, zu messen war. In den Bindungsexperimenten sollte anhand von Lipid A, einer Untereinheit des LPS-Moleküls, geprüft werden, ob die R-/W-Peptide mit dieser Region interagieren können. Die Ergebnisse sollten Aufschluss darüber geben, ob eine Translokation der Peptide über die äußere Membran mittels self-promoted uptake möglich ist.

Der hierfür modifizierte „Enzyme-linked immuno-stimulated assay“ (ELISA) stellt eine Synthese aus verschiedenen, zuvor beschriebenen Assays dar (134-139). Das Prinzip des verwendeten ELISAs lässt sich wie folgt beschreiben:



**Abbildung 16 / Hemmungs-ELISA mit Polymyxin** Mikrotiterplatten, beschichtet mit *Escherichia coli* Lipid A (25 ng / Well), wurden mit ansteigenden Konzentrationen an RW (△, RRWWRF), cRW (□, cRRWWRF), RW3 (◇, RRWFWR), cRW3 (▽, RRWFWR) und PMX (●, Polymyxin) inkubiert und anschließend, nachdem die Platten gewaschen worden waren, mit anti-LPS inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde mit sekundärem Antikörper (IgG Meerrettichperoxidase-Konjugat) inkubiert und der Substratumsatz fluorimetrisch detektiert. Bei der Kontrolle (▼) wurden weder Lipid A noch Peptid verwendet.

Mikrotiterplatten werden mit Antigen (hier Lipid A) beschichtet. Grundsätzlich ist der angewendete Antikörper (anti-Lipid A, ab 8467) in der Lage, an die Lipid A-Domäne zu binden (134). Gebundenes anti-Lipid A kann mit einem sekundären Antikörper-Peroxidasekonjugat (Ziege/Anti-Maus IgG-Meerrettichperoxidasekonjugat) detektiert und fluorimetrisch ausgewertet werden. Wird eine Bindung des anti-Lipid A durch einen Kompetitor unterbunden, kann dieses durch Waschen entfernt werden und ist anschließend vom sekundären Antikörper nicht detektierbar. Als Folge dessen wird ungebundener sekundärer Antikörper ebenfalls abgewaschen, und es kann keine bzw. nur eine verminderte Substratumsetzung stattfinden. Dieser Umstand drückt sich in abnehmenden Fluoreszenzintensitäten aus.

Da für das Peptid c(RRWFWR) (cRW3) die höchste Aktivität gegen *Escherichia coli* ermittelt worden war, wurde in den nachfolgenden Experimenten besonderes Augenmerk auf dieses Cyclopeptid und

sein lineares Analogon gelegt. Die Ergebnisse des Hemmungs-ELISA sind in Abbildung 16 dargestellt. Als Standard wurde Polymyxin B (PMX) eingesetzt. Polymyxin B, ein fettsäurehaltiges cyclisches antimikrobielles Peptid, das von *Bacillus polymyxa* produziert wird und eine hohe Affinität zu LPS bzw. Lipid A aufweist (134,140), zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Bindung des primären Antikörpers an Lipid A. Die sich daraus ergebende Abnahme in der relativen Fluoreszenzintensität konnte nicht für die untersuchten linearen R-/W-Peptide RW und RW3 beobachtet werden. Auch bei den sonst hochaktiven cyclischen Analoga cRW und cRW3 war keine Inhibierung zu erkennen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Hexapeptide nicht an die Lipid A-Domäne von LPS binden. Sollten die Peptide in der Lage sein, mit der äußeren Membran der Gram-negativen Bakterien zu assoziieren, muss eine potentielle Bindungsstelle im LPS in der Kernzonen- oder O-Antigenregion vermutet werden.

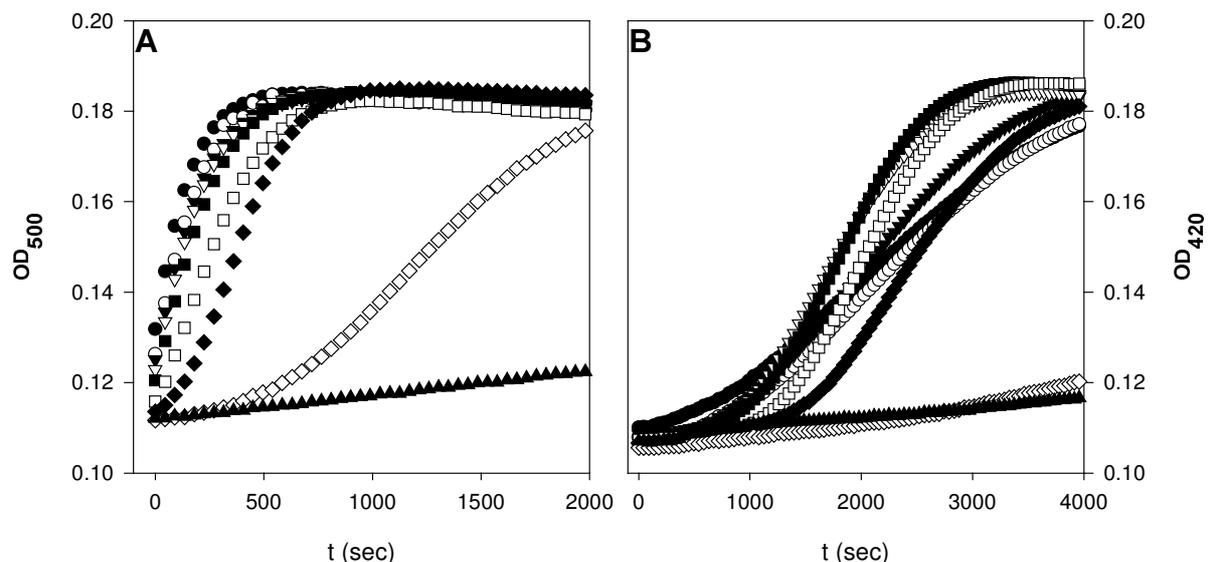
### **2.7 Zellpermeabilisierung von *Escherichia coli*-Zellen**

Die Farbstofffreisetzungsversuche (s.o.) haben gezeigt, dass die R-/W-reichen Hexapeptide offensichtlich nicht in der Form mit der Lipiddoppelschicht interagieren, dass diese von den Peptiden permeabilisiert wird. Dieser Befund steht im starken Kontrast zu den gefundenen biologischen Aktivitäten und Arbeiten, die eine Peptid-Lipiddoppelschicht-Interaktion als eine Grundvoraussetzung der antimikrobiellen Wirkung beschreiben (69,141-144). Das verwendete Membranmodell bei den Farbstofffreisetzungsversuchen ist ein sehr einfaches System und repräsentiert nur in geringem Umfang die biologische Membran der Zelle. Da Interaktionen kationischer Peptide mit Membranstrukturen der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien in der Literatur beschrieben worden waren (60,74,145-147), wurde nach Möglichkeiten gesucht, den Mechanismus der biologischen Wirkung der antimikrobiellen Hexapeptide in einem System zu untersuchen, das weitgehendst dem Zielorganismus gleicht. Unabhängig davon, ob die gegen die Zellwand gerichtete antimikrobielle Aktivität der Peptide Permeabilisierung und das Auslaufen der Zelle oder das Durchdringen der Membranen, um dann in das Zellinnere zu gelangen, verursacht, ist in beiden Fällen zu einem gewissen Grade eine Störung der Lipiddoppelschicht involviert. Eine simple Vorgehensweise, um solch eine Membranstörung zu messen, ist der Einsatz von kleinen fluoreszierenden Molekülen oder chromogenen Substanzen, die normalerweise von der Zelle ausgeschlossen werden, aber an Stellen, wo die Membranintegrität gestört wird, ins Zellinnere diffundieren können. Durch das Überwachen dieses Zelleintritts und der chemischen Konvertierung

solcher Moleküle sollte man in der Lage sein, Einsicht in die Permeabilisierungskinetiken und die Bedingungen, die die Aktivität antimikrobieller Peptide beeinflussen, zu erhalten.

Hierzu ist ein Assay entwickelt worden, der es ermöglicht, die Permeabilisierung der inneren und äußeren Membran bei Gram-negativen Bakterien zu messen (148-150).

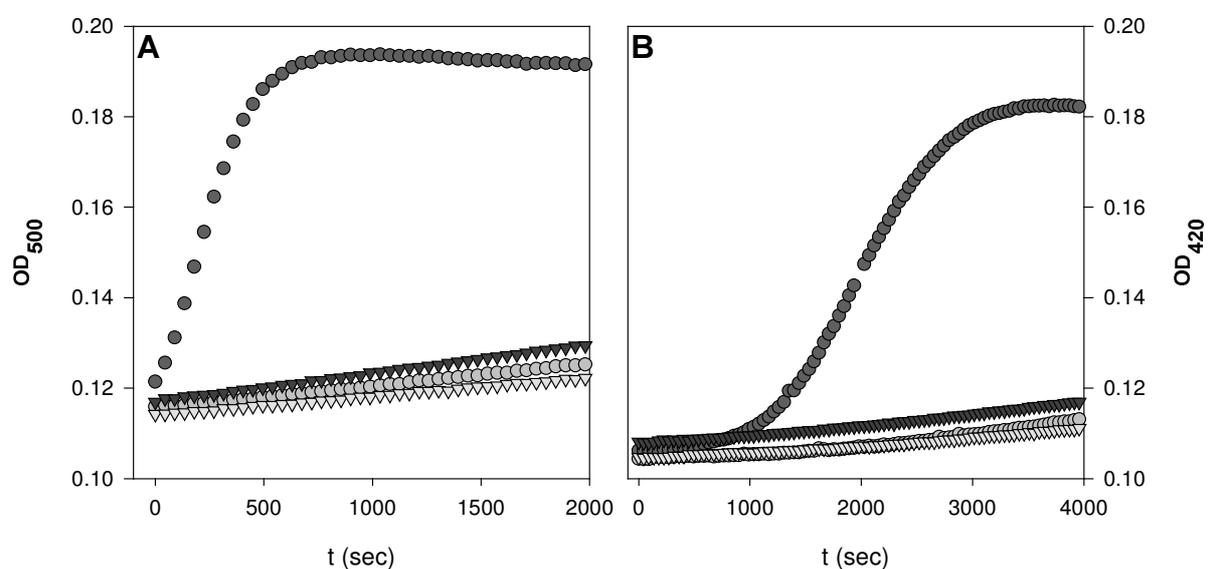
So kann die äußere Membranpermeabilisierung mit der Substanz Nitrocefin (NCF) überwacht werden. NCF wird normalerweise von der Zellmembran ausgeschlossen, doch wenn es diese Barriere passiert, kann NCF von der im periplasmatischen Raum lokalisierten  $\beta$ -Lactamase gespalten werden. Diese Spaltung resultiert in einem Farbumschlag von gelb nach rot. In ähnlicher Weise kann die Permeabilisierung der inneren Membran mittels *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -galactosidase (ONPG) ermittelt werden. In der *Escherichia coli*-Zelllinie ML-35p, die einen Mangel an der *lac*-Permease hat, wird ONPG am Zelleintritt von der Cytoplasmamembran gehindert. Kann ONPG jedoch in Folge einer Membranintegritätsstörung ins Cytoplasma gelangen wird es dort von der  $\beta$ -Galactosidase gespalten. Diese Spaltung hat einen Farbumschlag von farblos nach gelb zur Folge.



**Abbildung 17 / Permeabilisierungskinetiken der äußeren & inneren Membran durch Polymyxin B**  
 Dargestellt sind die Kinetiken (A) der NCF-Spaltung im periplasmatischen Raum und (B) der ONPG-Spaltung im Cytoplasma bei Polymyxin B-behandelten *Escherichia coli*-Zellen. ((▲) Kontrolle, (◆) 0.5  $\mu$ M, (◇) 0.75  $\mu$ M, (□) 1.0  $\mu$ M, (■) 1.25  $\mu$ M, (▽) 1.5  $\mu$ M, (▼) 1.75  $\mu$ M, (○) 2  $\mu$ M, (●) 4  $\mu$ M)

Zur Charakterisierung des Assays und als Standard wurde PMX eingesetzt, da dieses mit hoher Affinität an die äußere Membran Gram-negativer Bakterien bindet und sowohl die äußere als auch die innere Membran permeabilisiert (140,147,150,151). Vorversuche haben gezeigt, dass der optimale Konzentrationsbereich des PMX unterhalb 1.5  $\mu$ M liegt (Abbildung 17). Daher wurde, auch in

Anlehnung an die Literatur (150), PMX als Standard bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die aufgenommenen Kinetiken der Membranpermeabilisierung zeigen charakteristische Kurvenverläufe, welche erkennen lassen, dass eine Permeabilisierung der äußeren Membran (Abbildung 17 (A)) unmittelbar nach Zugabe des PMX eintritt und die Cytoplasmamembran ebenfalls zeitverzögert (in der Regel 16 min) durch PMX permeabilisiert wird (Abbildung 17 (B)). Von diesen Ergebnissen ausgehend wurden im Anschluss nach ihrer biologischen Aktivität (höchste Aktivität gegen *Escherichia coli*) ausgewählte Hexapeptide auf ihr Membranpermeabilisierungspotential hin untersucht.

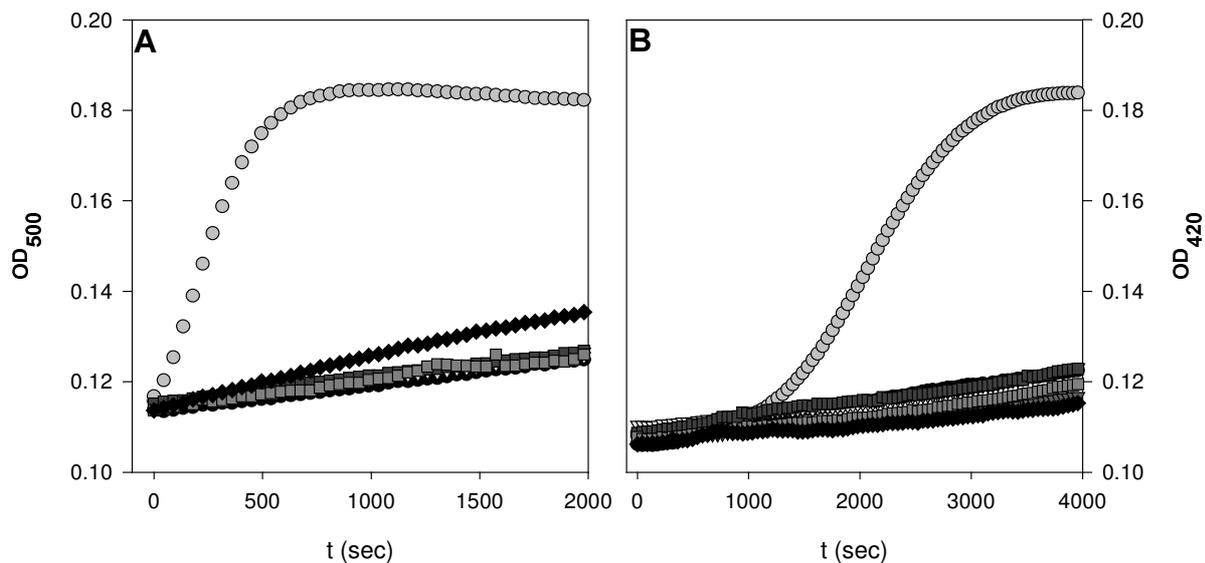


**Abbildung 18 / Kinetiken der äußeren & inneren Membranpermeabilisierung durch AMP & Polymyxin B**  
Dargestellt sind die Permeabilisierungskinetiken an der (A) äußeren und (B) inneren Membran bei einer Peptidkonzentration von 1  $\mu\text{M}$ . ((▼) RW3, (▽) cRW3, (●) Polymyxin und (●) Kontrolle)

*Permeabilisierung der äußeren Membran* Im Kontrast zu PMX zeigten die verwendeten linearen und cyclischen R/W-Peptide keine Permeabilisierung der äußeren Membran bei einer Peptidkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  (Abbildung 18 (A)). Eine Erhöhung der Peptidkonzentration des cRW3 auf 4  $\mu\text{M}$  resultierte lediglich in einem geringen Anstieg der Fluoreszenz und blieb weit unter dem Niveau der PMX-Aktivität (Abbildung 19 (A)).

*Permeabilisierung der inneren Membran* Im Vergleich zu den Messungen der PMX-induzierten Permeabilisierung konnte kein Anstieg in der ONPG-Umsetzung durch die linearen und cyclischen R/W-Analoga bei einer Peptidkonzentration von 1-4  $\mu\text{M}$  beobachtet werden (Abbildung 18 (B) & 19 (B)).

Zusammenfassend demonstrieren die Untersuchungsergebnisse zur Permeabilisierungsaktivität, dass im direkten Vergleich zu PMX weder die ausgewählten linearen noch die cyclischen Peptide die äußere bzw. innere Membran in ihrer Integrität zu stören vermögen und dass auch eine Erhöhung der Peptidkonzentration auf 4  $\mu\text{M}$  nicht ausreichend ist, um eine deutliche Permeabilisierung hervorzurufen.



**Abbildung 19 / Effekte der Peptidkonzentrationen auf die Kinetiken der äußeren & inneren Membranpermeabilisierung** Kinetiken der (A) Nitrocefin-Passage über die äußere Membran und (B) der ONPG-Passage über die innere Membran von *Escherichia coli*-Zellen in der Anwesenheit von (●) Polymyxin (1  $\mu\text{M}$ ), (▼) cRW3 (1.25  $\mu\text{M}$ ), (▼) cRW3 (1.5  $\mu\text{M}$ ), (■) cRW3 (1.75  $\mu\text{M}$ ), (■) cRW3 (2  $\mu\text{M}$ ), (◆) cRW3 (4  $\mu\text{M}$ ) und (●) in Abwesenheit von Peptid.

Bestimmungen der individuellen MICs der ausgewählten Cyclopeptide c(RRWRF) (cRW), c(RRWFR) (cRW2) und c(RRWFWR) (cRW3) haben aber gezeigt, dass die verwendete ML-35p-Zelllinie weniger anfällig gegenüber einer Behandlung mit den antimikrobiellen Hexapeptiden ist als die zuvor eingesetzte Zelllinie DH5 $\alpha$  (Tabelle 6). Daraufhin wurden die Messungen bei Peptidkonzentrationen von 1-32  $\mu\text{M}$  für c(RRWFWR) (cRW3) wiederholt. Die aufgenommenen Kinetiken der Permeabilisierung der äußeren Membran durch die R-/W-Peptide lassen erkennen, dass die nun eingesetzten Konzentrationen zu Konzentrationsabhängigen Kinetiken führten und dass in ersichtlichem Maße die äußere Membran durch c(RRWFWR) (cRW3) permeabilisiert wurde (Abbildung 20 (A)). Obwohl die eingesetzten Peptidkonzentrationen nun um die bzw. über den ermittelten MIC-Konzentrationen lagen, zeichnete sich nur in sehr geringem Umfang eine Permeabilisierung der inneren Membran durch c(RRWFWR) (cRW3) ab (Abbildung 20 (B)). Offenbar sind die eingesetzten Peptide selbst bei Konzentrationen, die höher liegen als der ermittelte MIC, nicht

in der Lage, die Cytoplasmamembran der *Escherichia coli*-Zellen ersichtlich im beobachteten Zeitraum zu schädigen. Dabei aber ist zu berücksichtigen, dass eine Erhöhung der Peptidkonzentration über das eigentliche optimale Wirkungsspektrum des Assays erfolgt ist und dass eine Erhöhung der PMX-Konzentration zu einer Änderung der Kinetiken führte.

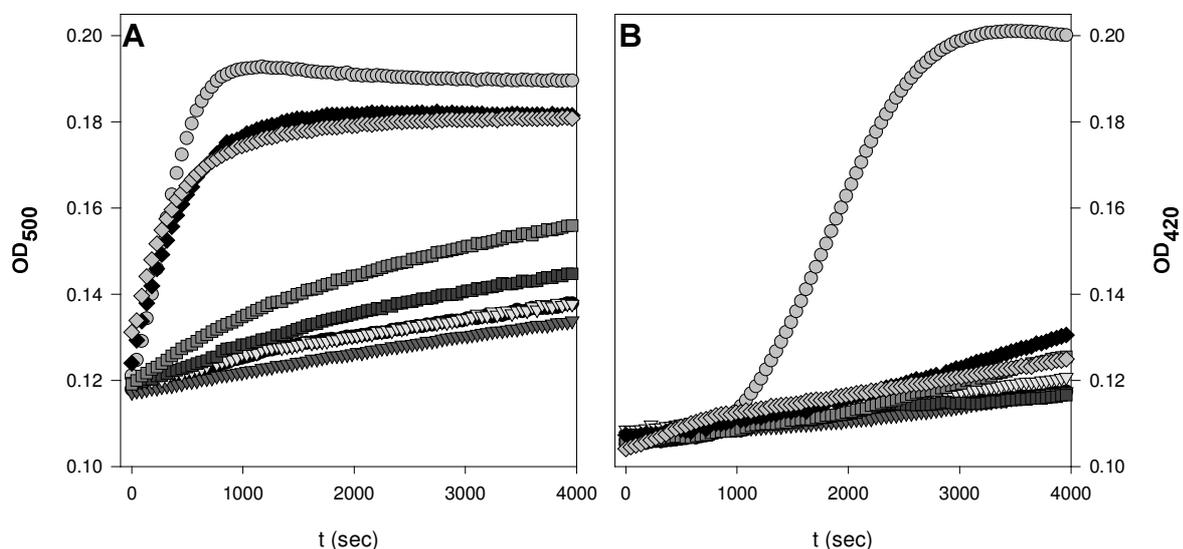
Peptidkennung	AS-Sequenz	MIC <sup>a</sup> <i>E.coli</i> DH5a	MIC <sup>a</sup> <i>E.coli</i> ML-35p
RW	RRWWRF	>100	n.b.
RW2	RRWWFR	125	100
RW3	RRWFWR	125	100
cRW	cRRWWRF	6.3	12.5
cRW2	cRRWWFR	3.9	12.5
cRW3	cRRWFWR	2.0	6.3
PMX	-	0.9 <sup>b</sup>	0.2

<sup>a</sup> 2.5 \* 10<sup>5</sup> Zellen / Well

<sup>b</sup> *E.coli* K-12 (pBR322)

n.b. nicht bestimmt

**Tabelle 6 / Minimale inhibitorische Konzentrationen (MIC) Vergleich der Gram-negativen Stämme. Wert für *E.coli* K-12 (pBR322) nach Dixon (152).**



**Abbildung 20 / Effekte der Peptidkonzentrationen über dem MIC-Wert auf die Kinetiken der äußeren & inneren Membranpermeabilisierung** Kinetiken der (A) Nitrocefin-Passage über die äußere Membran und (B) der ONPG-Passage über die innere Membran von *Escherichia coli*-Zellen in der Anwesenheit von (●) Polymyxin (1 µM), cRW3: (▼) 1 µM, (▽) 2 µM, (■) 4 µM, (▣) 8 µM, (◆) 16 µM, (♦) 32 µM und (●) in Abwesenheit von Peptid.