

## 4 Diskussion & Epilog

### 4.1 Diskussion

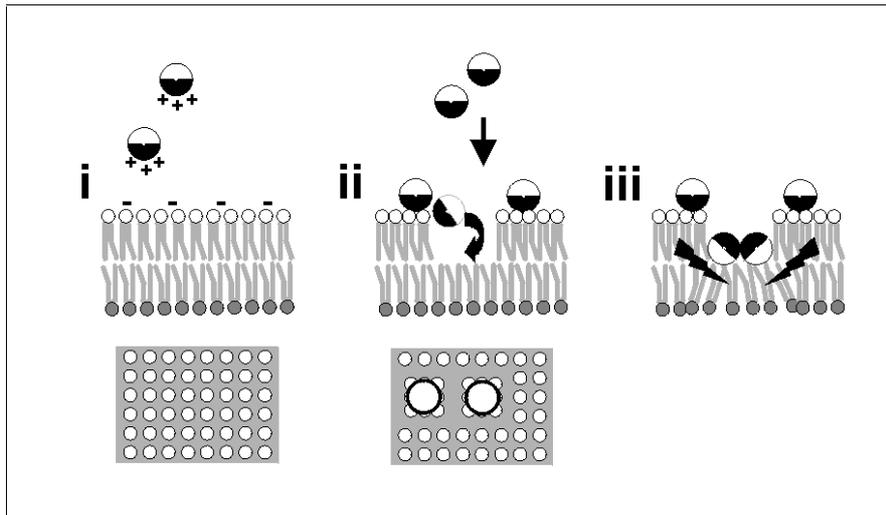
Struktur-Wirkungsuntersuchungen an antimikrobiellen Peptiden (AMP) stellen eine geeignete Vorgehensweise dar, um einen Beitrag zur detaillierten Aufklärung des Wirkmechanismus dieser Substanzklasse zu leisten. In der vorliegenden Arbeit wurde das Interesse auf ein häufig anzutreffendes Aminosäuresequenzmotiv, das durch einen hohen Gehalt an R- und W-Resten charakterisiert ist, fokussiert.

Strøm *et al.* berichten von geringen MICs (4.6  $\mu\text{M}$  bei *Escherichia coli* bzw. 3.1  $\mu\text{M}$  bei *Staphylococcus aureus*) und einer sehr geringen hämolytischen Aktivität für ein von Lactoferricin abgeleitetes R-/W-reiches Undecapeptid (158). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte auch zeigen, dass für die antimikrobielle Wirkung gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* ein Minimum an drei R und W sowie eine Sequenz von mindestens sieben Aminosäureresten essentiell waren (101). Kleine R-/W-reiche AMP ( $\leq 6$  Aminosäurereste) weisen eine hohe antimikrobielle Aktivität auf und sind gleichzeitig nur gering toxisch gegenüber eukaryontischen Zellen (101,102). Im Gegensatz zu den Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Strøm wurden in dieser Arbeit auch konformationell eingeschränkte kleine Peptide in die Struktur-Wirkungsuntersuchungen einbezogen.

Neben dem Einfluss der Änderungen in der all-L-Aminosäuresequenz auf die antimikrobielle Effektivität wurden zusätzlich der Einfluss einer Einbringung von D-Aminosäureresten an Position 1-6 und der stark hydrophoben Aminosäure Naphthylalanin untersucht (siehe Übersicht der Aminosäurereste im Anhang / Abbildung I). Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität der R-/W-reichen all-L-Hexapeptide gegen Gram-positive (*Bacillus subtilis*) und Gram-negative (*Escherichia coli*) Bakterien sehr deutlich zunimmt, wenn es durch eine Cyclisierung zu konformationellen Einschränkungen kommt. Es zeigte sich zusätzlich, dass *Bacillus subtilis* generell anfälliger gegenüber einer Behandlung mit den antimikrobiellen Hexapeptiden war als *Escherichia coli*. Dieser Umstand drückt sich in den wesentlich geringeren MIC-Werten bei den linearen (MIC  $\leq 25$   $\mu\text{M}$  gegenüber  $> 100$   $\mu\text{M}$ ) und cyclischen antimikrobiellen Hexapeptiden (MIC  $\leq 4$   $\mu\text{M}$  gegenüber  $\leq 16$   $\mu\text{M}$ ) aus. Eine Ausnahme bildet cRRWFWR (cRW3). Hier lag der MIC für *Escherichia coli* mit 2  $\mu\text{M}$  nahezu bei der Hälfte von dem für *Bacillus subtilis*. Weiterhin wird deutlich, dass die cyclischen antimikrobiellen Hexapeptide, deren drei aromatische Aminosäurereste aufeinanderfolgend positioniert waren, die höchsten antimikrobiellen Aktivitäten aufzeigten. Trotz der erwünschten hohen

Aktivität ist die Lysis der humanen roten Blutzellen (human red blood cells, hRBC) durch antimikrobielle Hexapeptide gering (Hämolyse < 29 %; 100 µM Peptid;  $1.9 \times 10^9$  Zellen).

Weiterführende Untersuchungen an neutralen (POPC / Cholesterin, 75% / 25% (mol/mol)) und negativ geladenen Liposomen (POPG / POPE, 75% / 25% (mol/mol)), welche die Phospholipidzusammensetzung der Membran von Erythrocyten bzw. *Bacillus*-Zellen simulieren (55,129,130), bestätigten die membranpermeabilisierenden Eigenschaften der antimikrobiellen Hexapeptiden.



**Abbildung 21 / Modell der Interaktion amphipathischer Peptide mit Lipiddoppelschichten & deren negativ geladener Oberfläche** Elektrostatische Interaktionen zwischen den kationischen Aminosäureresten in der hydrophilen Domäne eines amphipathischen Peptids und den negativ geladenen Kopfgruppen von Phospholipiden binden das Peptid an der Membranoberfläche (i) und verursachen vorzugsweise Umorganisationen der Kopfgruppen (ii). Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der hydrophoben Domäne des Peptids und den Acylketten der Phospholipide treiben eine Insertion der Peptide in die Lipiddoppelschicht voran, wobei sie eine Störung in der Anordnung der Acylketten hervorrufen (iii). Der Vorgang der Insertation ist ein dynamischer Prozess, welcher hier nur ansatzweise dargestellt werden kann. Ob gebundene Peptide ins Innere flippen oder freie Peptide nachdiffundieren ist dabei unklar.

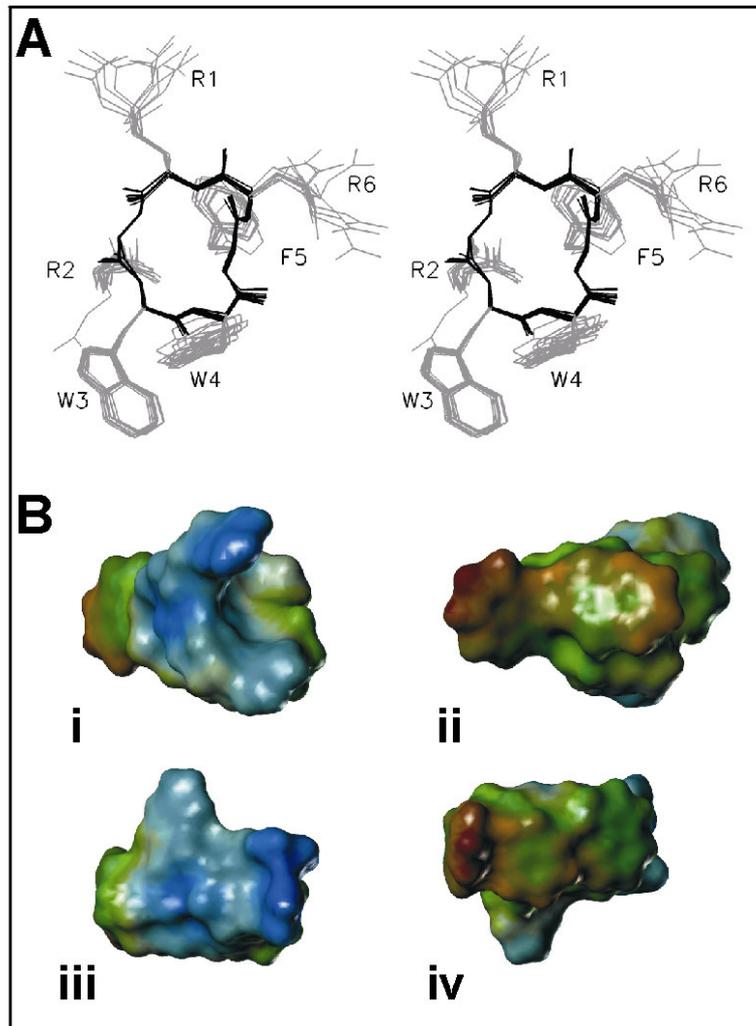
Es ist anzunehmen, dass der antimikrobielle Effekt der Hexapeptide auf Gram-positive Bakterien durch elektrostatische Interaktionen zwischen der negativ geladenen Lipidmatrix der Zielmembran und den drei positiv geladenen R-Aminosäureresten angetrieben wird. Diese elektrostatischen Interaktionen zwischen kationischen AMP und anionischen Phospholipidmembranen sind ein wichtiger initialer Schritt sowohl bei der membranlytischen Wirkung als auch bei der Selektivität gegenüber Membranen von Gram-positiven, -negativen und Säugerzellen (159). Starke elektrostatische Interaktionen zwischen kationischen Peptiden und anionischen Kopfgruppen von Phospholipiden ermöglichen es den Peptiden, sich an der Membranoberfläche festzusetzen, das zu einer Umorientierung der Kopfgruppen führt, und als Folge dessen können sich Peptid-Lipid-Cluster

ausbilden, die zu einer Störung der gesamten Phospholipidorganisation führen können (117). Nach dieser Bindung an die Kopfgruppen können sich Peptide als Folge von hydrophoben Wechselwirkungen in den nicht-polaren Bereich der Membran setzen (Abbildung 21). Solche Modelle wurden bereits für größere AMP (> 6 Aminosäurereste) beschrieben (117,159).

Die CD-Spektren zeigen ebenfalls eine Interaktion der Peptide mit Mizellen bzw. Liposomen und dass diese zu strukturellen Änderungen führt. Dabei erfahren die linearen Peptide bei Bindung an die Membran eine Ordnung ihrer Struktur, ein Phänomen, welches bereits für das SDS-gebundene Ac(RRWRF)NH<sub>2</sub>-Peptid beschrieben wurde (160). Die cyclischen Peptide zeigten ebenfalls Strukturänderungen bei einer Bindung an die SDS-Mizellen und POPG-Liposomen, und es kann daraus geschlossen werden, dass die schon im ungebundenen Zustand konformationell eingeschränkten Cyclopeptide eine weitere Einschränkung ihrer Konformation erfahren, die der Ausbildung einer amphipathischen Struktur im liposomengebundenen Zustand förderlich sein kann.

Die Korrelation zwischen antimikrobieller Aktivität und dem Retentionsverhalten in der RP-HPLC legt nahe, dass die gefundenen Aktivitätsmuster deutlich durch die hydrophoben Eigenschaften der Peptide mit beeinflusst werden (Abbildung 14). Die antimikrobiellen Hexapeptide, die Naphtylalanin (Nal) enthielten, waren im Vergleich zu den W-Analoga wesentlich aktiver. Der Nal-Rest ist durch den zweiten Benzolring größer und hydrophober ( $\log P = 3.15$ ) als der W-Rest ( $\log P = 2.25$ ) (119,161,162). Daher sind eine Interaktion der Nal-Hexapeptide mit hydrophoben Oberflächen und das Einsetzen in die hydrophobe Region (Acylketten) der Zellmembran begünstigt. Die Ergebnisse stützen die Annahme, dass die Einführung größerer aromatischer Aminosäurereste die antimikrobielle Aktivität steigert (119). Hohe Hydrophobizitäten können unabhängig von der Kopfgruppenladung das Eintauchen von AMP in den hydrophoben Kernbereich der Lipiddoppelschicht fördern und so auch zu einer Permeabilisierung eu- und prokaryontischer Zellen führen (159). Diese Aussage ist auch in Übereinstimmung mit den Befunden, dass die Nal-Peptide neben geringen MIC-Werten auch eine unerwünscht hohe hämolytische Aktivität zeigten. Überdies führte die Cyclisierung zu größeren Retentionszeiten ( $t_R$ ) der antimikrobiellen Hexapeptiden, was einen Anstieg in der effektiven Hydrophobizität impliziert. Inwieweit diese Annahme korrekt ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt werden, da die entsprechenden NMR-Untersuchungen bzw. Berechnungen der jeweiligen hydrophoben Momente der linearen und cyclischen Hexapeptide noch ausstehen. Es kann aber vermutet werden, dass das cyclische antimikrobielle Hexapeptid in Gegenwart einer hydrophob-wässrigen Grenzfläche eine ausgeprägte amphipathische Struktur annimmt, in der es eine deutliche Trennung von hydrophoben und kationischen Domänen gibt. Jing *et al.* beschreiben schon für das

lineare Hexapeptid Ac(RRWWRF)NH<sub>2</sub> eine amphipathische Struktur im gebundenen Zustand an Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate, SDS) und postulieren, dass die amphipathische Struk-



**Abbildung 22 / Stereobild & Connolly-Oberflächen-Diagramm Mizell-gebundener cyclischer Hexapeptide** (A) Dargestellt ist das cRW2-Peptid (c(RRWWFR)); R, Arginin, W, Tryptophan, F, Phenylalanin. (B) Mit Blick auf die distinkten Domänen sind die cyclischen Hexapeptide (i, ii) cRW2 (c(RRWWFR)) und (iii, iv) cRW3 (c(RRWFWR)) dargestellt (Eintrag in die PDB-Datenbank erfolgt in Kürze). Die Peptide sind nach der Hydrophobizitätsskala eingefärbt, in der Braun weniger hydrophile Bereiche (aromatische Aminosäurereste) und Blau die hydrophileren (R-Aminosäurereste) Bereiche markiert (Software: SYBYL® 6.9 Tripos Inc., USA). (Abbildung mit freundlicher Unterstützung von Christian Appelt, FMP, Abt. NMR-unterstützte Strukturforschung)

tur es dem Peptid ermöglicht, tiefer in die Grenzflächenregion der negativ geladenen Membran einzudringen, das in einer lokalen Membrandestabilisierung resultiert (160). Kernmagnetische Resonanzuntersuchungen (Nuclear magnetic resonance, NMR) haben gezeigt, dass die cyclischen Analoga gebunden an SDS-bzw. Dodecylphosphocholin (DPC) -Mizellen ebenfalls eine ausgeprägte amphipathische Struktur annehmen (Appelt *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Die Struktur des

mizellgebundenen Peptids ist charakterisiert durch eine planare Rückgratstruktur, flankiert von R-Resten und Clustern der aromatischen Seitenketten (Abbildung 22 (A)). Die Connolly-Darstellung veranschaulicht die deutliche Separation der hydrophoben und kationischen Domänen am Beispiel des cRW2 und cRW3 (Abbildung 22 (B)). Die drei benachbarten aromatischen Aminosäurereste der Analoga unterstützen die vorteilhafte Rolle einer hohen Amphipathie.

Diese Befunde untermauern die Vorstellung, dass das Ausbilden einer amphipathischen Struktur die elektrostatischen und hydrophoben Interaktionen maximiert und somit äußerst förderlich ist für die antimikrobielle Wirkung R-/W-reicher kationischer AMP (111,160).

Anhand verschiedener Diastereomere und einem Enantiomer des KKVVFVKFKK-Peptids untersuchten Hong *et al.* den Einfluss von D-Aminosäuren u.a. auf die antimikrobielle Aktivität und stellten fest, dass eine partielle D-Aminosäureeinführung eine nützliche Technik darstellt, um die Wirksamkeit *in vivo* zu verbessern (163). So wird die biologische Aktivität des Gramicidin S und seiner Analoga durch die Rückgratkonformation beeinflusst, welche die relative Positionierung von kritischen Seitenketten und die Fähigkeit der Peptide, sich in Membranen einzusetzen bestimmt (164,165). Im Gegensatz hierzu kann eine D-Substitution bzw. D-Einführung aber auch derartig zu strukturellen Änderungen führen, dass die antimikrobielle Aktivität negativ beeinflusst wird (159,166). Es ist zu erwarten, dass eine bestimmte Position eines D-Aminosäurerestes zu einer möglichen Änderung der Konformation des Hexapeptidringes führt und so die Gruppierung von aromatischen AA-Resten mit beeinflusst (167,168). Durch das Einbringen von D-Aminosäuren ist es außerdem möglich in cyclischen Hexapeptiden, die oftmals eine Struktur mit zwei  $\beta$ -Schleifen bevorzugen, gewünschte Sequenzen in verschiedenen räumlichen Positionen zu fixieren (116,169). Die Strategie, Enantiomersubstitutionen innerhalb eines konformationell eingeschränkten Molekürückgrates vorzunehmen, hat somit den Vorteil, dass die Peptidsequenz, die Hydrophobizität und Basizität beibehalten werden, es aber zu Strukturunterschieden kommen kann.

Die aufeinanderfolgende Einführung einer D-Aminosäure in den Positionen 1-6 der cyclischen Leitsequenz c(RRWRF) hatte nur geringen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität. Allerdings wurde, wie die  $t_R$ -Werte erkennen lassen, die Amphipathie der Peptide geringfügig modifiziert. Diese moderaten Änderungen in den  $t_R$ -Werten spiegelten sich auch in den Aktivitätsprofilen an hRBC und neutralen POPC / Cholesterin-Doppelschichten wider (Abbildung 8). Es ist bekannt, dass lokale Effekte die wesentlichen Neigungen eines Aminosäurerestes für eine bestimmte Sekundärstruktur bestimmen, während nicht-lokale Effekte (z.B. die Neigung eines Peptids eine bestimmte Sekundärstruktur anzunehmen) die Positionierung der individuellen Aminosäurereste im Kontext einer

gesamten Aminosäuresequenz dominieren können (170). Bezogen auf die D-substituierten antimikrobiellen Hexapeptide und in Übereinstimmung mit den Befunden von Xiong *et al.* (170) bedeutet dies, dass die durch die D-Aminosäure induzierbare lokale konformationelle Änderung nur gering ausgeprägt ist, da das gesamte Molekül eine globale amphipathische Struktur anstrebt.

Bei den Interaktionen der antimikrobiellen Hexapeptide mit Erythrozyten und POPC / Cholesterin-Lipiddoppelschichten spielt der elektrostatische Einfluss nur eine untergeordnete Rolle, und Hydrophobizität ist die bestimmende Determinante der permeabilisierenden Wirkung von hRBCs und neutralen Lipiddoppelschichten. Generell ist die hämolytische Aktivität der antimikrobiellen Hexapeptide moderat, doch je hydrophober und je amphipathischer das Peptid, desto größer der unerwünschte lytische Effekt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass es bei hoher Hydrophobizität und starker Amphipathie zu einer unerwünschten Abnahme in der Selektivität gegenüber bakteriellen und humanen Zellen kommt, und stehen im Konsens mit den Befunden von Wieprecht *et al.*, die in ihrer Arbeit beschreiben, dass sich das Permeabilisierungspotential von Peptiden gegenüber Vesikeln mit einem vergrößerten Anteil an Phosphatidylcholin (PC) drastisch erhöht, wenn die Peptidhydrophobizität gesteigert wird (111,125). Eine Steigerung der Hydrophobizität führt aber nicht nur zur höheren Hämolyseaktivität, gleichzeitig führt sie auch zu einer gesteigerten antibakteriellen Aktivität und unterstreicht so den Verlust an Selektivität der AMP gegenüber neutralen und negativ geladenen Lipiddoppelschichten (125,159). Somit können die geringen MIC-Werte des Hexapeptids c(FRNalNaIRR) für *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* bei gleichzeitiger sehr hoher hämolytischer Aktivität und starkem Permeabilisierungspotential gegenüber neutralen Lipiddoppelschichten erklärt werden.

Sehr interessant ist die Tatsache, dass der aktivitätssteigernde Effekt der Cyclisierung der Hexapeptide gegen Gram-negative Bakterien am stärksten ausgeprägt war, jedoch keine Permeabilisierung der Lipiddoppelschicht, welche die Lipidkomposition der Cytoplasmamembran von *Escherichia coli* reflektiert, beobachtet werden konnte. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich durch die höhere Komplexität der Zellwand von Gram-negativen Bakterien begründet.

Die verwendeten Liposomen spiegeln jedoch nur die Phospholipidkomposition der Cytoplasmamembran von *Escherichia coli* wider und waren frei von LPS. Dies könnte erklären, warum keine permeabilisierende Wirkung der Peptide bei POPE / POPG-Vesikeln (75% / 25% (mol/mol)) beobachtet werden konnte. Um die Rolle der äußeren Membran für die biologische Wirkung der antimikrobiellen Hexapeptide zu untersuchen, wurden Permeabilisierungsuntersuchungen *in vivo* durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass es eine konzentrationsabhängige Permeabilisierung der

äußeren Membran durch antimikrobielle Hexapeptide bei *Escherichia coli* gibt. Allerdings zeigte das als Standard eingesetzte Polymyxin B eine höhere Permeabilisierungsaktivität. Für Polymyxin B wurden mehrere Bindungsstellen am LPS postuliert und berichtet, dass zusätzlich eine Interaktion der Polymyxinseitenkette mit der Acylkettenregion des Lipid A wahrscheinlich ist (77,171). Daraus kann man ableiten, dass Polymyxin tiefer in die Lipiddoppelschicht der äußeren Membran eindringt (s.a. Anhang / Abbildung III) und so zu einer stärkeren Störung der Membranintegrität beiträgt. Die durchgeführten ELISA-Bindungsstudien an Lipid A von *Escherichia coli* bestätigen die geringe Affinität ausgesuchter antimikrobieller Hexapeptide zu der Lipid A-Domäne. Folgt man dem self-promoted uptake-Modell (siehe Einleitung, Abbildung 4), so liegt die Bindungsstelle der untersuchten kationischen antimikrobiellen Hexapeptide mit großer Wahrscheinlichkeit bei den anionischen 2-Keto-3-octulosonat-Zuckern (KDO) in der Kernzonen-Domäne der LPS-Moleküle (Untersuchungen in dieser Richtung haben bereits begonnen). Diese Annahme wird unterstützt durch die Polyphemusin-LPS Interaktionsbefunde, welche ergaben, dass das R-reiche Polyphemusin I und dessen Varianten an divalente Bindungsstellen der LPS-Moleküle binden, kompetitiv die divalenten Kationen ( $Mg^{2+}$ ) verdrängen und in die äußere Membran penetrieren (172).

Die Permeabilisierungsergebnisse der Cytoplasmamembran von *Escherichia coli* lassen nur ein geringes Maß an membranpermeabilisierender Aktivität der untersuchten antimikrobiellen Hexapeptide erkennen. Die Gründe hierfür könnten in der Phospholipidkomposition der Membran liegen. Die Cytoplasmamembran von *Escherichia coli*-Zellen weist einen Anteil an Phosphatidylethanolaminen (PE) von bis zu 82 % auf (131). Boggs beschreibt, dass basische Peptide mit einer geringeren Affinität an PE-Lipidmonoschichten binden, da die anionischen Phosphatgruppen der PE-Lipide bevorzugt mit den Aminen der benachbarten Lipidmoleküle interagieren anstelle der Peptide, und dass die höhere Packungsdichte einer PE-Lipidmonoschicht ebenfalls die Möglichkeit der Penetration durch Peptide einschränkt (173). Studien von Matsuzaki *et al.* zeigen zusätzlich, dass ein „Ausdünnungseffekt“ der Lipiddoppelschicht durch kationische Peptide durch das Erhöhen des Gehaltes an PE, welches eine negative Membrankrümmung induziert, stark vermindert werden kann (89,174). Sie schlussfolgern, dass die Aktivität des kationischen Peptids stark von der Lipidkomposition der Doppelschichten abhängt, wobei das Ausbilden von Poren nur in PG-Doppelschichten zu beobachten war und nicht in PE-Doppelschichten (89). Die Ausbildung einer stabilen Pore durch die antimikrobiellen Hexapeptide bei den eingesetzten Konzentrationen erscheint demzufolge wenig wahrscheinlich. Wu *et al.* zweifeln in ihrer Arbeit sogar an, dass der bakterizide Effekt vieler Peptide überhaupt ein Resultat der Störung der Membranintegrität ist (88). Es ist für

einige Peptide beschrieben, dass der Verlust des Membranpotentials, induziert durch Membranpermabilisierung, nicht *per se* zum Zelltod führt (88,175). Wie Wu *et al.* berichten auch andere Forschergruppen von einer fehlenden Korrelation zwischen gefundenen MIC-Werten und Konzentrationen, die zu einer vollständigen Permeabilisierung der Cytoplasmamembran führen (19,37,88,176,177). Diese Studien zeigen, dass Peptide bei der niedrigsten inhibitorischen Konzentration weniger in der Lage sind, die Zellmembran zu schädigen, und dass sie stattdessen die Fähigkeit beibehalten, die Synthese von Makromolekülen zu inhibieren (91). Einige Forschergruppen gehen davon aus, dass eine Lyse der Cytoplasmamembran nicht der primäre Grund für den Zelltod ist und vielmehr die Ziele der kationischen AMP im Cytoplasma liegen. So fanden z.B. Park *et al.*, dass Buforin II bei fünffacher MIC-Konzentration *Escherichia coli*-Zellen abtötet ohne erkennbare Lysis der Zellmembran, aber an DNS und RNS bindet (19). Schon einige Jahre vorher wurde von Boman *et al.* ein Wirkungsmechanismus für das antimikrobielle Peptid PR-39 vorgeschlagen, indem es die Protein- und DNS-Synthese hemmt (178).

Welcher Mechanismus nun auf die untersuchten cyclischen antimikrobiellen Hexapeptide zutrifft, kann an dieser Stelle nicht mit Sicherheit gesagt werden. Es sollte aber in Betracht gezogen werden, dass es vielleicht mehr als nur einen separaten Weg in die Zelle gibt. Das Bilden von invertierten Mizellen (83,87) würde zumindest einen Erklärungsansatz bieten, warum auch in geringem Maß ONPG-Substrat ins Cytoplasma gelangen konnte, ohne dass eine vermehrte Permeabilisierungsaktivität der antimikrobiellen Hexapeptide zu beobachten gewesen ist. Grundsätzlich zeigen aber auch hier die vorgestellten Ergebnisse der Promotionsarbeit, dass für die antimikrobielle Aktivität eine amphipathische Struktur, wie sie in den cyclischen Analoga vorzufinden ist, favorisiert wird.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass diese Untersuchungen ein gutes Beispiel für die Beziehung zwischen der Struktur, der Aminosäuresequenz und der Wirkung von R-/W-reichen AMP sind. Die Cyclisierung der Aminosäuresequenzen und die zusätzliche Clusterung der aromatischen Aminosäurereste resultierten in hochpotenten antibakteriellen Peptiden mit moderater Toxizität gegenüber Säugerzellen. Diese Eigenschaften machen die antimikrobiellen Hexapeptide zu vielversprechenden Substanzen zur Behandlung von äußeren bakteriellen Infektionen.

## 4.2 Epilog

„It is hard to imagine (especially after reading a classic immunology text) that most animals now alive, including insects and creatures like octopus and starfish, rely heavily on antimicrobial peptides for defence against microbes, and do so quite effectively without the help of lymphocytes, a thymus, or antibodies.“

Dr. Michael Zasloff

Der eindeutige Nutzen der AMP in Bezug auf die Abwehr mikrobieller Erreger und das anwachsende Problem von resistenten Bakterien gegenüber den konventionellen Antibiotika hatte zu einer Reihe von Versuchen zur Entwicklung der AMP als Medikamente geführt. Klinische Studien zur Anwendbarkeit von AMP schließen Untersuchungen zur Behandlung von Fußgeschwüren, oraler Mucositis, meningokokkaler Meningitis, Katheterinfektionen, Akne, kardialer Ischämie und Pilzinfektionen ein (179). Einige Biotech-Firmen haben in Zusammenarbeit mit pharmazeutischen Unternehmen begonnen, erste Studien am Menschen mit AMP durchzuführen. Das aus der Haut von *Xenopus laevis* isolierte AMP Magainin war eines der ersten Peptide, welches den Prozess der Wirkstoffentwicklung durchlief. Das Magaininderivat Pexiganan<sup>®</sup> erreichte die Phase III der klinischen Studien. Dem Produkt wurde jedoch von der US-Behörde Food & Drug Administration letzten Endes die Zulassung verweigert. Einige weitere AMP befinden sich in der vorklinischen oder klinischen Phase, worunter sich auch das Enfuvirtide<sup>®</sup> (T-20) befindet, das von der Firma Trimeris (USA) als Wirkstoff gegen den Human-Immunschwächevirus (HIV) eingesetzt werden soll. Sehr erfolgreich ist hingegen das kationische Peptid MBI-226 der Firma Micrologix Biotech (CAN). Im Jahr 2000 räumte die US Federal Drug Administration dem Produkt, welches eine venöse Infektion durch Katheter verhindern soll, eine vorgezogene Behandlung bei der klinischen Prüfung ein (180). Mittlerweile befindet sich MBI-226 in der klinischen Phase III (Micrologix, Internetseite Product Development: <http://www.mbiotech.com/product.html>).

Bereits jetzt befinden sich auf dem Markt Hautcremes, wie z.B. Colostrum<sup>®</sup>, welche Bestandteile des Lactoferrins enthalten, oder Lösungen mit Polymyxinen (37). Jüngste Untersuchungen zeigen, dass es neben dem reinen antimikrobiellen Effekt der Peptide auch direkte Beziehungen zwischen der Funktion von AMP (u.a. Chemotaxis) und der Pathogenese gibt (31,68,179). Berichte aus den Laboren und Kliniken deuten darauf hin, dass eine Resistenzentwicklung weniger wahrscheinlich ist (68). *Staphylococcus aureus* jedoch ist in der Lage, in geringem Umfang Resistenz gegenüber AMP

(Defensine, Protegrine) zu entwickeln, aber eine vollständige Resistenz konnte bisher nicht gezeigt werden (181). Nichtsdestotrotz scheinen verschiedene Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien in der Lage zu sein, durch enzymatische Modifizierungen z.B. des Lipid A oder der Phospholipide die physikochemischen Eigenschaften der Membran derart anzupassen, dass sie weniger anfällig für eine Behandlung mit kationischen antimikrobiellen Peptide werden (182).

Abschließend sei bemerkt, dass die antimikrobiellen Peptide ein weites Spektrum an nützlichen Wirkungen wie die antimikrobiellen oder immunantwortmodulierenden Effekte offerieren und weitere Forschung notwendig ist, um ihre biologische Wichtigkeit in der angeborenen Immunantwort zu beleuchten. Erforschung des kombinierten Einsatzes von Peptiden mit bakterienselektiven Synergismen, wie sie für Magainin 2 und Tachyplesin I gezeigt worden sind (141), könnte Möglichkeiten einer „Cocktailtherapie“ bieten und möglicherweise auch die Frage beantworten, warum ein einzelner Organismus so viele verschiedene AMP produziert (141). Dabei ist es sehr wichtig, dass „Antibiotika essentielle therapeutische Agenzien sind, welche aber sehr umsichtig genutzt werden sollten“ (5).