
Identifizierung, Charakterisierung und Untersuchungen der Struktur-
Wirkungs-Beziehung sowie des Mode of Action eines neuen
antimikrobiellen Peptids aus *Hirudo verbana*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Daniela Müller

aus **Herborn**

Marburg/Lahn **Jahr 2019**

Erstgutachter: **Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Klebe**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Hemberger**

Eingereicht am **14. Mai 2019**

Tag der mündlichen Prüfung am **01. Juli 2019**

Hochschulkennziffer: 1180

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

*Viel ist Dir geschenkt,
viel wird auch von Dir gefordert!*

Hildegard von Bingen



Acronyms

< μ H>	hydrophobes Moment
<H>	Hydrophobizität
ACN	Acetonitril
AMA	Antimikrobielle Aktivität
AMP	Antimikrobielle Peptide
AS	Aminosäure
ATR	abgeschwächte Totalreflexion
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	Basic Local Search Alignment Search Tool
Boc	t-Butyloxycarbonyl-
C	Konzentration
CAMP	cationic Antimicrobial Peptides
CFU	Colony Forming Unit
CID	Collision Induced Dissociation
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CPP	Cell Penetrating Peptide
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOX	Doxorubicin
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamase
ESI	Elektronensprayionisation
EST	Expressed Sequence Tag
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
Fmoc	9-Fluoromethyloxycarbonyl
FT-MS	Fourier-Transformed – Mass Spectrometry
HCD	High Energy C-Trap Dissociation
HDP	Host Defense Peptide
HP	Hirudo Peptid
IC	Inhibitory Constant
IC ₅₀	Inhibitory Constant 50 %
LADME	Liberation-Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion
LBDD	Ligand-based Drug Development
M	Mol
MHB	Müller-Hinton-Broth
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIC	Minimal inhibitory constant
MIC ₅₀	minimal inhibitory constant 50 %
MIC ₉₀	minimal inhibitory constant 90 %

MMP	Matrixmetalloprotease
MoA	Mode of Action
MRE	Multiresistente Erreger
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
N	Sequenzlänge
NCE	New Chemical Entity
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NK	Negativkontrolle
nLC	nano Liquid Chromatography
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PFA	Paraformaldehyd
PG	Phosphatidylglycerol
PK	Positivkontrolle
PMN	Polymorph nuclear neutrophils
PPII	Poly-Proline-Typ-II-Helix
PrAMP	Proline-rich Antimicrobial Peptides
PS	Phosphatidylserin
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
RU	Refractive Units
SAR	Structure Activity Relationship
SBDD	Structure based Drug Development
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SGF	simulated gastric fluid
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
tBu	ter-Butyl
TC	Test compound
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
TOF	Time of Flight
tR	Retention time
Trt	Trityl
VRE	Vancomycin Resistant Enterococcus
VSD	variable secondary dichroic
WHO	World Health Organization

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT	10
ABSTRAKT	11
1 EINLEITUNG	12
1.1 ALLGEMEINE ZIELE IN DER MODERNEN ARZNEISTOFFENTWICKLUNG	12
1.2 ANTIBIOTIKARESISTENZEN	13
1.3 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE	15
1.3.1 ALLGEMEINES	15
1.3.2 PROLINREICHE ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE (PRAMP)	25
1.3.3 DER BLUTEGEL ALS BIORESSOURCE IN DER LEITSTRUKTURSUCHE	34
2 ZIELSETZUNG	38
3 MATERIALIEN UND METHODEN	39
3.1 MATERIALIEN	39
3.1.1 EXTRAKTION UND PROBENVORBEREITUNG DER SALIVA AUS <i>HIRUDO VERBANA</i>	39
3.1.2 FESTPHASENSYNTHESE	40
3.1.3 RATIONALE DESIGNKONZEPTE	42
3.1.4 LC-MS/MS UND <i>DE-NOVO</i> -PEPTIDSEQUENZIERUNG	42
3.1.5 OBERFLÄCHENPLASMONRESONANZSPEKTROMETRIE	43
3.1.6 KONFOKALE LASERSCANNING MIKROSKOPIE (CLSM)	45
3.1.7 PROTEOLYTISCHE STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN	46
3.1.8 ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT MITTELS MIKRODILUTION	47
3.1.9 <i>IN-VIVO</i> -GALLERIENMODELL	48
3.1.10 METHODEN DER ZELLKULTURTECHNIK	49
3.2 METHODEN	50
3.2.1 EXTRAKTION UND PROBENVORBEREITUNG DER SALIVA AUS <i>HIRUDO VERBANA</i>	50
3.2.2 SYNTHESECHEMIE	51
3.2.3 BIOANALYTISCHE METHODEN	60
3.2.4 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	75
3.2.5 METHODEN DER ZELLKULTURTECHNIK	78
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	81
4.1 IDENTIFIZIERUNG UND ISOLIERUNG EINES NEUEN ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDES AUS <i>HIRUDO VERBANA</i>	81
4.1.1 EXTRAKTION, GEWINNUNG UND FRAKTIONIERUNG DES SPEICHELDES DES MEDIZINISCHEN BLUTEGELS	81
4.1.2 ANTIMIKROBIELLE EFFEKTIVITÄT DER GESAMTSALIVA UND EINZELNER FRAKTIONEN	83

4.1.3	IDENTIFIZIERUNG DES NEUEN ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDES AUS <i>HIRUDO VERBANA</i>	85
4.2	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE	89
4.2.1	CHEMISCHE SYNTHESE HP01/HP02	89
4.2.2	VERIFIZIERUNG DER ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT VON HP01/HP02	92
4.2.3	UNTERSUCHUNG ZUR PROTEOLYTISCHEN DER STABILITÄT VON HP01	96
4.2.4	UNTERSUCHUNGEN ZUR ZYTOTOXISCHEN UNBEDENKLICHKEIT VON HP01	110
4.2.5	<i>IN-VIVO</i> -UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT VON HP01	112
4.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNG (QSAR) MIT HILFE EINFACHER RATIONALER DESIGNKONZEPTE	117
4.3.1	ALANINSCAN	117
4.3.2	MODIFIKATIONEN	120
4.3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR ZYTOTOXIKOLOGISCHEN UNBEDENKLICHKEIT AUSGEWÄHLTER DERIVATE	152
4.4	UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKMECHANISMUS	160
4.4.1	SPR-STUDIEN AM 70S RIBOSOM AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	160
4.4.2	SPR-STUDIEN AM 70S RIBOSOM AUS <i>THERMUS THERMOPHILUS</i>	166
4.4.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR INTRAZELLULÄREN LOKALISATION MITTELS FLUORESZENZMIKROSKOPIE	172
5	<u>ABSCHLUSSDISKUSSION</u>	175
5.1	IDENTIFIZIERUNG UND ISOLIERUNG DES NEUEN ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDS AUS DEM SPEICHEL DES BLUTEGELS	175
5.2	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE	176
5.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN STRUKTUR-WIRKUNGS-BEZIEHUNG (QSAR)	178
5.4	UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKMECHANISMUS	181
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	185
7	<u>SUMMARY</u>	191
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	197
9	<u>DANKSAGUNG</u>	218
10	<u>CURRICULUM VITAE</u>	220
11	<u>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</u>	221
12	<u>ANHANG</u>	222

Abstract

The rapid development of antimicrobial resistance is one of the major challenges facing the global healthcare system. Today, many bacterial species already develop pronounced resistance to a variety of antibiotics. Due to neglected antibiotic research, the development pipeline of novel antibacterial agents has not yielded any innovative lead structures so far. An alternative class of substances are antimicrobial peptides, in particular those with intracellular targets and specific effects. A molecule cluster within this substance class is represented by proline-rich antimicrobial peptides, so-called PrAMPs. Due to their specific intracellular effects such as the inhibition of protein biosynthesis, this group moved into the focus of research.

A new proline-rich antimicrobial peptide in the saliva of the medical leech was identified and characterized. Initially, the sequence obtained by *de novo* sequencing was synthesized by solid-phase peptide synthesis and its antimicrobial activity was verified. Both gram-groups showed significant inhibitions against reference organisms and up to 50 % growth inhibition against multi-resistant *Klebsiella* isolates including carbapenem resistance genes and ESBL. The proteolytic activity of the lead structure has also been investigated. In particular, a high stability in human serum and simulated gastric fluid could be demonstrated. Preliminary *in vivo* data for HP01 were generated in an infection model with *Galleria mellonella*. The median survival rate of 80 % after seven days post infectum at a drug dose of 10.3 nM was shown, whereas after the same incubation period a lethality of 100 % occurred in the untreated control group.

Further work packages generated a large number of derivatives in order to increase the antimicrobial activity of the lead structure. The modified sequences were selected using rational design methods based on already published data from known PrAMPs and defined design rules. Thereby, the main focus was on physicochemical parameters such as net charge and amphiphilicity. After completing the studies on the structure-activity relationships of the derivatives, both the dose-activity profile and the parameters IC_{50} and MIC, which are important for further development, were significantly improved. Following modification, a MIC of 3.82 nM was reported. Furthermore, investigations were carried out on the cytotoxic potential of the lead structure and its derivatives. The first cell damaging effects for the lead structure could be detected at 14 times the IC_{50} value in *in vitro* cell culture models with HeLa cells. For the optimized derivatives, an increase in tolerability could be achieved. Cytotoxic effects only occurred after 50 times the effective concentration.

Finally, studies on the mode of action and target identification of the lead structure and its derivatives were carried out. The cellular uptake was studied by confocal laser scanning microscopy. Surface plasmon resonance was used investigating the interaction and binding of the lead structure and its derivatives with the 70S ribosome of gram-negative bacteria. After covalent immobilization of the ribosomes on the sensor chip surface, specific binding constants in the low nM range could be detected. Thereby, the 70S ribosome of gram-negative pathogens could be identified as a possible intracellular target for the identified proline-rich lead structure of the saliva of the medical leech.

Abstrakt

Die rasante Entwicklung antimikrobieller Resistenzen stellt eine der größten Herausforderungen für das globale Gesundheitssystem dar. Bereits heute existieren gegenüber vielen Wirkstoffen unterschiedlicher Antibiotikaklassen bereits ausgeprägte Resistenzen vieler bakterieller Spezies. Die Entwicklung neuer antibakterieller Wirkstoffe liefert aufgrund vernachlässigter Antibiotikaforschung bisher keine neuen innovativen Leitstrukturen. Eine alternative Substanzklasse stellen antimikrobielle Peptide dar, insbesondere diese mit intrazellulären Targets und spezifischer Wirkung. Eine Molekülgruppe innerhalb dieser Klasse wird durch prolinreiche antimikrobielle Peptide, so genannte PrAMPs, repräsentiert. Diese Gruppe rückt aufgrund ihrer spezifischen intrazellulären Wirkungen, wie der Hemmung der Proteinbiosynthese in den Fokus der Forschung.

Innerhalb dieser Arbeit konnte ein neues prolinreiches antimikrobielles Peptid im Speichel des medizinischen Blutegels identifiziert und charakterisiert werden. Zunächst wurde die durch *De-novo*-Sequenzierung ermittelte Sequenz über chemische Festphasensynthese synthetisiert und deren antimikrobielle Aktivität verifiziert. Hier konnten signifikante Hemmungen gegenüber Referenzkeimen beider Gramgruppen gezeigt werden, sowie bis zu 50 % Wachstumsreduktion gegenüber multi-resistenten Klebsiella-Stämmen mit Carbapenem- und ESBL-Resistenzgenen. Ebenso wurden Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität der Leitstruktur durchgeführt. Insbesondere konnte eine hohe Stabilität in Humanserum und künstlichem Magensaft gezeigt werden. Erste *In-vivo*-Daten für HP01 wurden in einem Infektionsmodell mit *Galleria mellonella* generiert. Bei einer Wirkstoffmenge von 10,3 nM konnte sieben Tagen *post infectum* eine mittlere Überlebensrate von 80 % gezeigt werden, bei der unbehandelten Kontrollgruppe trat hingegen eine Letalität von 100 % auf.

In einem weiterem Arbeitspaket wurde eine Vielzahl an Derivaten erzeugt, um die antimikrobielle Aktivität der Leitstruktur zu optimieren. Die Auswahl der modifizierten Sequenzen erfolgte durch rationale Designansätze anhand bereits publizierter Daten bekannter PrAMPs und festgelegter Designregeln. Hauptaugenmerk lag dabei auf physikochemischen Parametern wie Nettoladung und Amphiphilie. Nach Abschluss der Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Derivate konnten sowohl das Dosis-Wirkungsprofil als auch die für eine Weiterentwicklung wichtigen Parameter IC_{50} und die minimale Hemmkonzentration MIC signifikant verbessert werden. Nach Abschluss der Modifikationen konnte eine MIC von 3,82 nM nachgewiesen werden. Desweiteren wurden Untersuchungen zum zytotoxischen Potential der Peptide durchgeführt. Im Zellkulturmodell mit HeLa-Zellen zeigte die Leitstruktur erst ab einer 14-fachen Wirkkonzentration des IC_{50} -Wertes erste zellschädigende Effekte. Für die optimierten Derivate konnte eine Steigerung der Verträglichkeit erreicht werden. Erste zytotoxische Effekte traten erst ab dem 50-fachen der Wirkkonzentration auf.

Zuletzt erfolgten Untersuchungen zum Wirkmechanismus und der Targetidentifizierung der Peptide. Es wurde die zelluläre Aufnahme mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht. Zur Untersuchung der Wechselwirkung und Bindung der Leitstruktur und aller Derivate mit dem 70S-Ribosom aus gramnegativen Bakterien wurde die Methode der Oberflächenplasmonresonanz eingesetzt. Nach kovalenter Immobilisierung der Ribosomen auf der Sensorchipoberfläche konnten spezifische Bindungskonstanten im einstelligen nM-Bereich nachgewiesen werden. Somit konnte das 70S Ribosom gramnegativer Organismen als mögliches intrazelluläres Target für die identifizierte prolinreiche Leitstruktur aus der Saliva des medizinischen Blutegels identifiziert werden.

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Ziele in der modernen Arzneistoffentwicklung

Mit dem demografischen Wandel geht eine Verschiebung im Krankheitsspektrum einher: Den alters-assoziierten, nicht übertragbaren Erkrankungen, die häufig einen chronischen Verlauf zeigen, kommt seit einigen Jahrzehnten wachsende Bedeutung zu. Diese werden vom Wandel der Lebensgewohnheiten ebenso beeinflusst wie vom biologischen Altern. Hierzu zählen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, chronische Atemwegserkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, Krankheiten des Muskel-Skelett-Systems aber im Besonderen auch die Neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson. Neben diesen Alters-assoziierten Erkrankungen rücken die zunächst erfolgreich bekämpften Infektionskrankheiten insbesondere durch das Voranschreiten der Antibiotikaresistenzen wieder in den Fokus (WHO international 2018).

Im Bereich der modernen Arzneistoffentwicklung versucht man dem demografischen Wandel und dem damit verknüpften Krankheitsspektrum durch verbesserte Wirkstoffe und Therapiekonzepte entgegenzuwirken. Der Trend geht in Richtung *Personalised Care*, wodurch die moderne Arzneistoffentwicklung zwar komplizierter wird, dieser Ansatz jedoch den Behandlungserfolg erhöht. Eine Differenzierung von Subpopulationen und die daraus resultierenden geringeren Patientenzahlen gestalten die klinische Entwicklung durch die Einführung von personalisierter Medizin erheblich effizienter. Innerhalb der industriellen Pharmaforschung setzt man neben den nach wie vor entwickelten kleinen Molekülen auf zwei weitere Gruppen von Arzneistoffen: Peptide/Proteine/Antikörper und den Ansatz der RNA-Interferenz (RNAi).

Zu Beginn der Entwicklungsphasen eines neuen Arzneistoffs steht der Einsatz von Substanzbibliotheken, die eine enorme strukturelle Komplexität aufweisen und unter anderem Liganden und biologisch aktive Moleküle enthalten können (Andricopulo et al. 2009; Guido et al. 2008). Diese Bibliotheken werden nun nach möglichen neuen Wirkstoffkandidaten, sogenannten Hits durchsucht (*gescreent*). Die Auswahl einiger, weniger Moleküle für eine potentielle Wirkstoffweiterentwicklung und -optimierung stellt eine der größten Herausforderungen im Entwicklungsprozess dar (Andricopulo et al. 2009; Guido et al. 2008; Guido und Oliva 2009). Im Bereich der modernen Arzneistoffentwicklung werden Methoden der traditionellen medizinischen Chemie mit moderner strukturbasierter (structure based drug design - SBDD) oder ligandbasierter Wirkstoffentwicklung (ligand based drug design - LBDD) kombiniert, um möglichst effektiv den riesigen chemischen und biologischen Raum als Schlüsselkomponenten in der *Hit-to-Lead*-Entwicklung nutzen zu können. Gegen Ende des Prozesses steht die Optimierung einer neuen Leitstruktur und Etablierung eines neuen Wirkstoffes, eine sogenannte *New Chemical Entity* (NCE) (Honório et al. 2007).

Naturstoffe erweisen sich bereits seit Jahrzehnten als die Hauptquelle für neue chemische Leitstrukturen. Faktisch stammen nahezu 30 % der zurzeit verfügbaren *Small-Molecule*-Wirkstoffe von Naturstoffen oder deren Derivate ab (Newman und Cragg 2007; Ganesan 2008). Der Bereich der Naturstoffchemie hat entscheidend zur Entwicklung einer multidisziplinären Betrachtungsweise beigetragen. Die Naturstoffforschung vereint die Methoden der medizinischen Chemie, Biochemie, Molekularbiologie und Genomik sowie diverse bioanalytische Techniken. Dieser allgemeine Workflow bis zur Auswahl und Optimierung geeigneter Leitstrukturen ist in Abbildung 1 dargestellt.

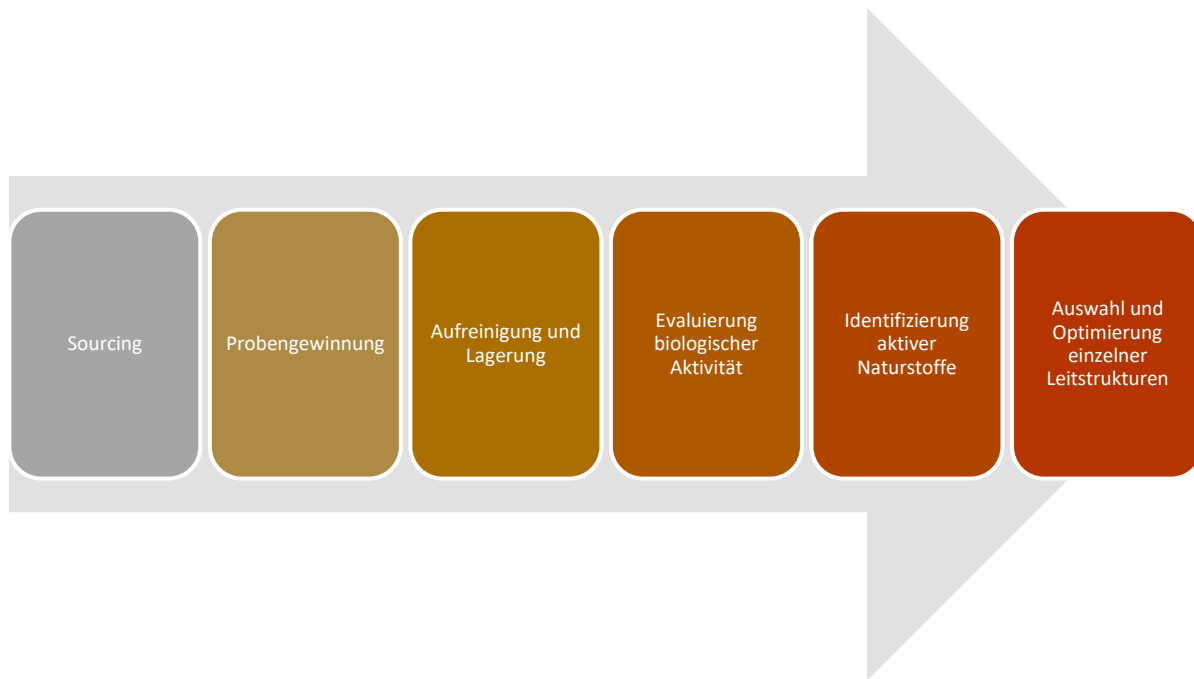


Abbildung 1: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte einer Leitstrukturidentifizierung aus natürlichen Quellen.

Eine der größten Herausforderungen ist hierbei die Identifizierung und Auswahl wertvoller Leitsubstanzen aus einer Vielzahl ähnlich aktiver Proben. Identifiziert man in einer Probe eine interessante und vielversprechende biologische Aktivität, werden weitere Bioassay-basierte Fraktionierungen durchgeführt, bis man schließlich einzelne aktive Komponenten isolieren kann. Dabei haben Fortschritte im Bereich der Extraktion, Isolierung und Aufreinigung bioaktiver Substanzen aus natürlichen Quellen in Verbindung mit bioanalytischen und biophysikalischen Techniken entscheidend zu einer erfolgreichen und schnelleren strukturellen Aufklärung beitragen können. So können Entdeckungen neuer pharmazeutisch wirksamer Inhaltsstoffe vorangetragen werden.

1.2 Antibiotikaresistenzen

Institutionen, wie die Weltgesundheitsorganisation, haben die alarmierende Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen in jüngster Vergangenheit stärker im öffentlichen Fokus thematisiert. Nachdem die pharmazeutische Industrie über Jahrzehnte die Entwicklung neuer antibiotischer Substanzen schlichtweg vernachlässigt hat, führte das verstärkte Bewusstsein möglicher Szenarien ohne wirksame Antibiotika in den vergangenen zehn Jahren wieder zu einer verstärkten Aufmerksamkeit und Tätigkeit auf diesem interessanten und wichtigen multidisziplinären Forschungsgebiet.

Hauptsächlich ökonomische Beweggründe hinsichtlich Rentabilität der Entwicklung und Vermarktung neuer antibiotischer Chemotherapeutika haben dazu geführt, dass Antibiotikaforschung in den großen Pharmakonzernen stark verringert wurde. Die Bereitschaft der Pharmafirmen, den kostenintensiven Einsatz wichtiger Ressourcen für die Entwicklung neuer Antibiotika zu widmen, ist als eher gering einzustufen. Ein Grund hierfür ist möglicherweise, der im Verhältnis mit den Entwicklungskosten zu erwartende relativ geringe finanzielle Gewinn aus einer zeitlich begrenzten Behandlung von Infektionen verglichen mit den Umsätzen von Medikamenten zur Behandlung chronischer Erkrankungen. Hinzu

kommt, dass neue Wirkstoffe gegen multiresistente Keime als sogenannte Reserveantibiotika nur an solche Patienten verabreicht werden, bei denen die verfügbaren Antibiotika nicht mehr wirken. Das reduziert natürlich deutlich die Umsatzmöglichkeiten.

Trotzdem sind pharmazeutische Unternehmen als starke Partner für Forschungs- und Entwicklungsprogramme erforderlich, um die komplexe Herausforderung während der Entwicklung eines neuen Wirkstoffes für den therapeutischen Einsatz bewerkstelligen zu können.

Das strukturelle und mechanistische Verständnis antibakterieller Interventionsmöglichkeiten zusammen mit der Entschlüsselung der bakteriellen Prozesse bei der Entwicklung antibiotischer Resistenzen stellt eine solide Basis für rationale Problemlösungsansätze dar.

Naturstoffe und synthetische Moleküle stellen nach wie vor eine der wichtigsten Ressourcen für antibakterielle Wirkstoffe dar. Mehrgleisige Strategien zur Bekämpfung von Antibiotikaresistenzen im Hinblick auf traditionelle und neue antibiotische Targets eröffnen vielfältige Möglichkeiten, der Problematik der antimikrobiellen Resistenzen fokussiert nachzugehen.

Die Forschung im Bereich neuer Strategien zur Bewältigung von Antibiotikaresistenzen stellt eine besondere Herausforderung dar, da die Ausbildung dieser Resistenzen ein nicht zu unterschätzendes Problem im Gesundheitssystem darstellt. Der exzessive und in vielen Fällen auch unnötige oder falsche Einsatz von Antibiotika führt zunehmend dazu, dass für immer mehr bakterielle Infektionen die Standardtherapeutika wirkungslos werden und die durch multiresistente Erreger verursachte Infektionen nur noch schwer behandelbar sind. Die Gegenwart von antibiotischen Chemotherapeutika erhöht den Selektionsdruck auf mikrobielle Populationen und führt zu einer Vielzahl hochselektierter Mikroorganismen. Diese Organismen wirken dem letalen Effekt der Antibiotika durch genetische Änderung des Targets, durch enzymatische Spaltung der Wirkstoffe, sowie durch limitierte zelluläre Wirkstoffpenetration oder einem gesteigerten Efflux entgegen (Li et al. 2015). Die Resistenzverbreitung zwischen den Bakterien wird durch das Vorhandensein mobiler genetischer Elemente zusätzlich beschleunigt. Die ersten antibiotikaresistenten grampositive Erreger traten in Form nosokomialer Infektionen in intensivmedizinischen Abteilungen von Krankenhäusern auf. Anfangs fiel das Hauptaugenmerk hier insbesondere auf Infektionen durch methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Vancomycin-resistente *Enterococcus spp.* (VRE). In jüngster Zeit rückten aber auch durch das vermehrte Auftreten von Infektionen durch Extended-spectrum-Betalaktamase (ESBL) produzierender *E. coli* die gramnegativen Erreger in den Fokus. Man spricht heute von den sogenannten ESKAPE-Organismen. Hierzu gehören neben *E. coli* die multiresistenten Erreger *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter spp* (Pendleton et al. 2013).

Zur Bekämpfung dieser multiresistenten Bakterien und zur Sicherstellung erfolgreicher Therapien setzt die Forschung nun auf die Entwicklung neuer Wirkstoffklassen. In der Antibiotika-Wirkstoffforschung baut man bei der pharmazeutischen Leitstruktursuche wie in anderen Indikationsgebieten auch auf natürliche Quellen. Eine vielversprechende und hochpotente Gruppe neuer *Lead-Compounds* stellen antimikrobielle (WHO international 2018) Peptide dar.

1.3 Antimikrobielle Peptide

1.3.1 Allgemeines

Historie und Diversität antimikrobieller Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMPs), auch bekannt als sogenannte *Host Defense Peptides*, finden sich praktisch in allen Lebensformen. Sie werden von Bakterien, Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten produziert. Eine Vielzahl von Bakterien bilden AMPs, um sich im Selektionsdruck und Überlebenskampf gegenüber anderen Spezies Vorteile zu verschaffen, um bezüglich Nahrungsangeboten oder Umwelteinflüssen konkurrenzfähiger zu sein. Bakterielle AMPs, die sogenannten Bacteriocine, können in zwei Subkategorien eingeteilt werden: Lantibiotika und Nicht-Lantibiotika (Mattick et al. 1947).

Der Großteil der bisher identifizierten antimikrobiellen Peptide besitzt allerdings einen eukaryotischen Ursprung und stammt aus Pflanzen, Tieren und Pilzen (Abbildung 2). Seit Ende des 19. Jahrhunderts wurde über das antimikrobielle Potential verschiedener Sekrete und Flüssigkeiten wie Blut, Speichel, Plasma und Drüsensekreten diskutiert (SKARNES und WATSON 1957). Die ersten antimikrobiellen Peptide – die Cecropine – konnten jedoch erst 1981 durch Hans Boman in der Hämolymphe der Wachsmotte *Hyalophora cecropina* identifiziert werden (Steiner et al. 1981). Hierbei handelte es sich um kationische, amphipathische Peptide mit einer ausgeprägten Breitbandwirkung gegen eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen wie grampositive und gramnegative Bakterien sowie Pilze. Mit der Identifizierung der Defensine aus Säugetier-Makrophagen (Patterson-Delafield et al. 1981), der Sacrotoxinen aus Fliegenlarven (Okada und Natori 1983) und der Magaininen aus der Haut des Frosches *Xenopus laevis* (Zasloff 1987) durch Robert Lehrer, Shunji Natori und Michael Zasloff erweiterte sich das Feld der AMPs.

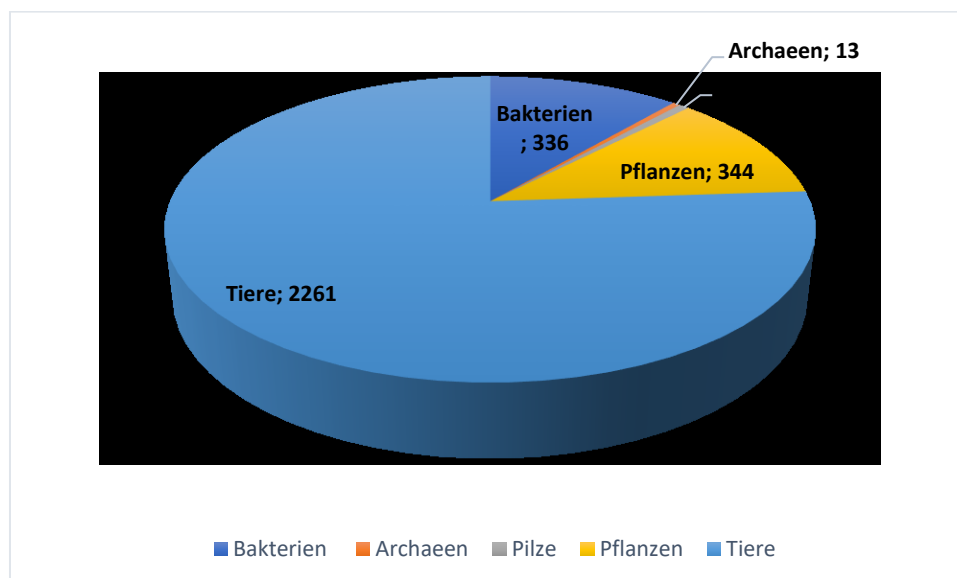


Abbildung 2: Ursprünge isolierter und identifizierter antimikrobieller Peptide, insgesamt 2972, entnommen aus (Wang, G., Li, X. and Wang)

In eukaryotischen Organismen spielen die AMPs eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunabwehr. Im Pflanzenreich fehlt die adaptive Immunabwehr gänzlich, und hier übernehmen die antimikrobiellen Peptide eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von und im Schutz vor

bakteriellen und pilzbedingten Infektionen. Ähnlich wie im Pflanzenreich besitzen auch die Wirbellosen keine adaptive Immunabwehr, so dass auch diese im Schutz gegen Infektionen vollständig abhängig von ihrer angeborenen Immunabwehr sind. AMPs konnten bisher in allen Invertebratenarten gefunden werden, hervorzuheben sind hier allerdings die Insekten und marinen Wirbellosen, da diese eine besonders hohe Diversität dieser Molekülklasse aufweisen (Hancock et al. 2006). Antimikrobielle Peptide konnten so beispielsweise in der Hämolymphe, Hämocyten, Phagozyten und Epithelzellen dieser Organismen identifiziert werden.

Viele marine Invertebraten wie Garnelen, Hummer und Pfeilschwanzkrebse produzieren AMPs konstitutiv (Bachere et al. 2004; Iwanaga und Kawabata 1998). Tachylepsin und Polyphemusin, zwei hochpotente antimikrobielle Peptide aus dem Pfeilschwanzkrebse, besitzen eine antibakterielle und antimykotische Aktivität im unteren μM -Bereich. Interessanterweise zeigt Polyphemusin zusätzlich eine antivirale Aktivität gegen das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) (Masuda et al. 1992).

Das Immunsystem der Vertebraten besitzt sowohl eine angeborene als auch eine adaptive Komponente. Auch aus diesen Spezies konnte eine Vielzahl an AMPs isoliert werden. So findet man diese bei Fischen, Amphibien und auch Säugern. Vertebraten-AMPs konnten aus unterschiedlichen Zellen, wie bspw. Phagozyten, Neutrophilen, Makrophagen oder Natürlichen Killerzellen isoliert werden, aber auch aus epithelalem Gewebe der Lunge oder der Haut, sowie aus verschiedenen Körperflüssigkeiten (Yang et al. 2002; Yang et al. 2004; Bowdish et al. 2005). Ein besonders hohes Maß an Diversität von AMPs konnte in den Hautdrüsen verschiedener Amphibien gefunden werden (Jenssen et al. 2006). Die meisten antimikrobiellen Peptide in Vertebraten zeigen eine direkte antimikrobielle Aktivität. Andere können auch kritische Funktionen im Bereich der Immunmodulation oder bei der Überwachung inflammatorischer Prozesse ausüben (Hilchie et al. 2013; Haney und Hancock 2013; Hancock et al. 2016; Nijnik und Hancock 2009).

Einteilung der antimikrobiellen Peptide

Antimikrobielle Peptide stellen eine ausgeprägte und mannigfaltige Klasse von Biomolekülen dar. Bis heute sind über 3000 Sequenzen antimikrobieller Peptide bekannt. Dies macht eine Einteilung dieser Moleküle unabdingbar. AMPs werden nach unterschiedlichen Methoden klassifiziert, welche auf den strukturellen Begebenheiten, der Sequenz oder aber auch auf dem Wirkmechanismus basieren können. Ebenso bedienen diese Moleküle einen breitgefächerten Bereich an biologischen Aktivitäten. Sie wirken antibakteriell, immunmodulierend, besitzen aber auch anti-karzinogene oder antivirale Wirkung. Da Struktur und Sequenz in unterschiedlicher Weise Einfluss auf die biologische Aktivität nehmen, ist es wichtig bei einer Gruppierung von Molekülen beides in Betracht zu ziehen. Eine strukturbasierte Klassifikation für antibakteriell wirksame Peptide führt zu drei Untergruppen, die in Tabelle 1 dargestellt sind.

Die erste Untergruppe umfasst Moleküle, die strukturell primär die Ausbildung einer α -helikalen Struktur bevorzugt und im allgemeinen eine Sequenzlänge zwischen 14 und 28 AS aufweisen (Gagnon et al. 2017). Diese Moleküle wurden hauptsächlich in der extrazellulären Matrix von Fröschen und Insekten gefunden. In wässriger Umgebung bilden diese Peptide zunächst keine Struktur aus. Kommen sie allerdings in Kontakt mit oberflächenaktiven Substanzen wie Trifluorethanol, Mizellen oder Liposomen (Brogden 2005), bilden sich meistens, wie in Abbildung 3 dargestellt, α -helikale Strukturen aus. Zu dieser Subgruppe gehört auch die häufig in Eukaryoten vorkommende Gruppe der

Cathelicidine. Sie sind in der Regel 12-80 Aminosäuren lang und können, wie aus Tabelle 1 ersichtlich, auch weitere Strukturen ausbilden. Eines der bekanntesten und umfassend untersuchten Peptide dieser Gruppe ist das humane LL-37, ein immunmodulatorisch wirksames Peptid (Nijnik und Hancock 2009). Eine weitere Gruppe α -helikaler AMPs sind die Magainine, welche zuerst aus der Haut des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* isoliert wurden und Aktivität gegen gramnegative und grampositive Bakterien besitzen, aber auch antimykotische und antivirale Wirkung aufweisen (Zairi et al. 2009). Ebenso liegen umfassende Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung der Magainine vor, da diese Peptide die erste Gruppe klinisch getesteter AMPs darstellt (Ge et al. 1999). Auch wenn die ersten AMPs in klinischen Studien oftmals aus toxikologischen Gründen oder zu geringer Proteasestabilität für eine Wirkstoffentwicklung scheiterten, ist das Magainin-Analogon Pexiganan zurzeit noch in klinischen Studien (Zasloff 1987; Fox 2013; Hancock und Sahl 2006).

Die letzte noch zu erwähnende Gruppe mit α -helikaler Struktur ist die der Aureine, welche aus dorsalen Drüsen des australischer Gold-Laubfrösche *Litoria aurea* isoliert wurden. Zur Gruppe der Aureine gehören über dreißig verschiedene kurz- und langkettige AMPs, welche sich in ihrer Aktivität unterscheiden. Die Mehrheit der Aureine ist gegen grampositive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* aktiv. Am Beispiel der Aureine wurden umfassende Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Zusammensetzung der Membranlipide als auch Kürzungen im Bereich des N-Terminus Einfluss auf die Aktivität haben können (Pan et al. 2007). Eine wichtige Erkenntnis aus den Studien mit Aureinen stellt die Tatsache dar, dass die Amidierung des C-Terminus zu einer Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität für α -helikale AMPs führt. Die Amidierung am C-terminalen Ende der Helix bewirkt durch die zusätzliche positive Ladung unter physiologischen Bedingungen eine stärkere elektrostatische Wechselwirkung mit der negativ geladenen Bakterienmembran. Diese Interaktion stabilisiert die helikale Struktur an der Membran (Mura et al. 2016).

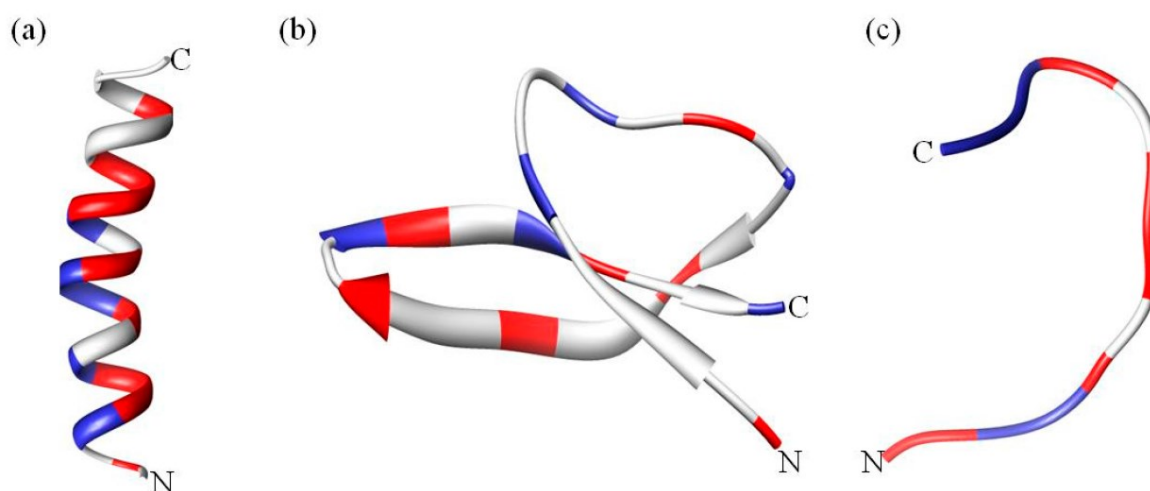


Abbildung 3: Strukturelle Diversität antimikrobieller Peptide. A) Helikales Magainin, b) Humanes Defensin 5 mit β -Faltblattstruktur und c) Indolicidin mit einer Extended Coil Struktur. Positiv geladene Reste sind in blau dargestellt, hydrophobe Reste in rot. Die Figuren wurden mit der Software CHIMERA generiert

Die zweite Untergruppe umfasst Peptide mit einer angenäherten β -Faltblattstruktur. Diese Klasse umfasst die Protegrine, Defensine und Tachylepsine. Ein besonderes Merkmal dieser Klasse ist das Vorhandensein von hochkonservierten Cysteinen und damit verbunden, die Ausbildung von Disulfidbrücken. Diese Disulfidbrücken gewährleisten besonders bei den Defensinen ein hohes Maß an Stabilität und wirken schützend gegen proteolytischen Abbau (Dhople et al. 2006).

β -Faltblattstrukturen bilden sich sowohl in wässriger als auch in hydrophober Umgebung und unterliegen, anders als die α -helikalen Peptide, keinen strukturellen Änderungen. Defensine sind sowohl an antibakteriellen, antimykotischen, antiviralen als auch immunmodulatorischen Prozessen beteiligt. Tachylepsine und Polyphemusin besitzen in der Regel mindestens 30 % Argininreste. Daraus resultiert eine hohe positive Nettoladung (da Mata et al. 2017; Miyata et al. 1989). Auch hier lässt sich die antimikrobielle Aktivität durch starke elektrostatische Wechselwirkungen mit der Bakterienmembran erklären.

Tabelle 1: Klassifizierung antimikrobieller Peptide anhand ihrer strukturellen Merkmale

Subkategorie ^a	Peptid	Besonderheiten bzgl. Struktur und/oder Sequenz	Herkunft
α -helikale Peptide	Aurein 1-2	C-Terminus amidiert	Frosch
	Melittin	C-Terminus amidiert	Biene
	Buforin II	-	Büffel
	Cathelicidine		
	LL-37	C-Terminus amidiert	Mensch
	BMAP-27,28,34 ^b	-	Rind
	Magainine	-	Frosch
	Cecropine	C-Terminus amidiert	Insekten
β -Faltblatt	Cathelicidine		
	Protegrine	Cys – reich	Schwein
	Bactenecine	Disulfidbrücken, Arg- reich	Rind
	Defensine		
	Alpha	drei Disulfidbrücken	Säuger
	Beta	drei Disulfidbrücken	Säuger
	Theta	drei Disulfidbrücken, zyklisiert	Gorilla
	Tachylepsine Polyphemusine	Cys- und Arg-reich, amidiert C-Terminus	Rundkrabben
Extended coil	Cathelicidine		
	PR-39 ^c	Pro- und Arg- reich	Schwein
	Indolicidin	Trp-reich und amidierter C-terminus	Rind
	Crotalicydin	Lys-reich	Schlange
	Histatine	His-reich und amidierter C-Terminus	Mensch

^aKlassifizierung erfolgte aufgrund dominanter Strukturmerkmale, einige Peptide weisen gemischte α -helikale und β -Faltblattstrukturen auf, ^bBMAP = bovine myeloid antimicrobial peptide, ^cPR = proline rich

Die dritte Unterklasse der AMPs repräsentiert Peptide mit einer sogenannten *Extended Coil Structure*, also einer gestreckten, in sich gewundenen Struktur. Die meisten dieser Peptide gehören wiederum zur Familie der Cathelicidine und weisen in der Sequenz zwei oder mehr Prolinreste auf, welche für das Aufbrechen von Sekundärstrukturelementen bekannt sind. Indolicidin ist ein Tryptophan-reiches AMP, welches aus bovinen Neutrophilen isoliert wurde und lediglich 13 Aminosäuren lang ist. Untersuchungen mittels NMR und CD-Spektroskopie zeigen, dass Indolicidin in Gegenwart von Micellen eine besondere membran-assoziierte Peptidstruktur ausbildet (Falla et al. 1996; Rozek et al. 2000). In Studien an einem weiteren AMP dieser Klasse, dem Crotalocidin, zeigten Falcao *et al.*, dass der C-terminale Teil (15-34) des Peptides alleine für die antibakterielle Aktivität gegen gramnegative Bakterien verantwortlich ist (Falcao et al. 2015). NMR-Untersuchungen zeigten, dass sie mit über 80 % überwiegend in einer *Extended Coil Structure* vorlagen. Der N-Terminus (1-14) des Peptids, welcher eine α -helikale Struktur aufweist, ist dagegen vollständig inaktiv.

Allgemeine Eigenschaften antimikrobieller Peptide

Trotz der sequentiellen und strukturellen Diversität antimikrobieller Peptide sind einige physikochemische Eigenschaften in allen Vertretern dieser Molekülklasse zu finden.

Zunächst ist eine positive Nettoladung zu nennen. Die Peptide weisen meist Nettoladungen von +2 bis +13 auf. Diese sind meist in spezifischen kationischen Domänen angeordnet mit einer Häufung von Arginin- oder Lysinresten, zum Teil werden auch Histidinreste verwendet. Der Zusammenhang zwischen antimikrobieller Aktivität und der Nettoladung der AMPs wurde in einer Vielzahl von Studien untersucht und verifiziert (Gagnon et al. 2017; Lyu et al. 2016; Hong 2001; Jiang et al. 2008). So konnte bspw. gezeigt werden, dass mit der Erhöhung der Nettoladung bei Magainin 2 von +3 auf +5 eine Erhöhung der antibakteriellen Aktivität sowohl gegen gramnegative als auch grampositive Bakterien erreicht wurde. Während eine weitere Erhöhung auf +6 oder +8 in einer verstärkten hämolytischen Aktivität und dem Verlust der antimikrobiellen Aktivität resultierte (Dathe et al. 2001). Yeaman und Yount vermuten als Grund hierfür starken elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Peptid und Zelle, welche eine Membrantranslokation deutlich erschweren und somit dazu führen, dass diese Peptide an der Membranaußenseite verbleiben (Yeaman und Yount 2003).

Eine weitere Schlüsseleigenschaft antimikrobieller Peptide stellt die Hydrophobizität dieser Moleküle dar. Sie drückt sich direkt in dem prozentualen Anteil der Aminosäuren Leucin, Valin, Alanin, Isoleucin, Prolin, Tryptophan, Methionin, Tyrosin und Phenylalanin innerhalb der Sequenz aus und beträgt bei den meisten antimikrobiellen Peptiden mindestens 50 %. Diese Eigenschaft steuert die Fähigkeit wasserlöslicher Peptide in die Zellen aufgenommen werden zu können, was eine Translokation über die Membranbarriere bedeutet. Ein zu hoher Gehalt an hydrophoben Aminosäuren führt allerdings häufig zu einem Anstieg der Zytotoxizität und zum Verlust der antibakteriellen Spezifität (Yin et al. 2012; Chen et al. 2007). Chen und Koautoren untersuchten an einem synthetischen AMP den Einfluss der Hydrophobizität auf die antimikrobielle Aktivität verbunden mit der Hämolyse von humanen Erythrozyten (Chen et al. 2007). Die Ergebnisse zeigten, dass ein optimaler Anteil an hydrophoben Aminosäuren für die antimikrobielle Aktivität dieser Moleküle entscheidend ist. Führen nun bspw. intramolekulare Wechselwirkungen durch eine höhere Hydrophobizität zu einer Dimerisierung der Peptide, kann dies zu einem Aktivitätsverlust führen.

Eine weitere Gemeinsamkeit aller AMPs ist deren Amphiphilie, welche durch die relative Abundanz hydrophiler und hydrophober Reste oder Domänen innerhalb des Moleküls zu beschreiben ist. Sie kann als eine Balance zwischen hydrophoben und kationischen Aminosäureresten verstanden werden, was sich nicht nur auf Bereiche der Primärstruktur bezieht, sondern sich auch in der Sekundär- und Tertiärstruktur der Moleküle niederschlägt. Diese Amphiphilie lässt sich durch eine Vielzahl von Strukturen, wie in Tabelle 1 aufgelistet, darstellen, das klassische Beispiel ist aber die α -Helix. Diese Struktur führt zur Ausbildung zweier unterschiedlicher Bereiche, wobei eine hydrophobe und eine polare Oberfläche entstehen. Die Amphiphilie eines AMP kann durch die Berechnung des hydrophobischen Moments abgeschätzt werden. Interessanterweise wurde für α -helikale Peptide zunächst angenommen, dass eine Störung der Amphiphilie zu einem Anstieg der antimikrobiellen Aktivität bei gleichzeitiger Abnahme der Erythrozytenlyse führt (Takahashi et al. 2010; Mihajlovic und Lazaridis 2012; Hawrani et al. 2008; Chen et al. 2007; Jiang et al. 2011). Allerdings zeigten Zhang und Mitarbeiter am Beispiel des AMPs Melittin aus der Honigbiene, dass ein Anstieg der Amphiphilie einen Abfall der Erythrozytenlyseaktivität nach sich zieht (Zhang et al. 2016).

Mechanismen antimikrobieller Aktivität

Antimikrobielle Peptide stellen eine besondere Molekülgruppe dar, deren Wirkungsweisen (MoA = Mode of Action) seit ihrer Entdeckung Gegenstand vieler Untersuchungen sind. Man nahm zunächst an, dass bakterielle Membranen das Hauptangriffsziel für AMPs darstellen. Einige Untersuchungen lieferten hier allerdings Hinweise, dass es noch weitere Wirkungsmechanismen geben müsse (Ulm et al. 2012). Die Wirkungsweise antimikrobieller Peptide kann in zwei Hauptklassen unterteilt werden: Das direkte Abtöten der Bakterien und eine durch Modulation des Immunsystems erzeugte indirekte antibakterielle Wirkung. Die direkte Wechselwirkung von AMPs mit Bakterienzellen kann nochmals in zwei unterschiedliche Varianten unterteilt werden: membran-assoziiertes Abtöten und intrazelluläres Targeting.

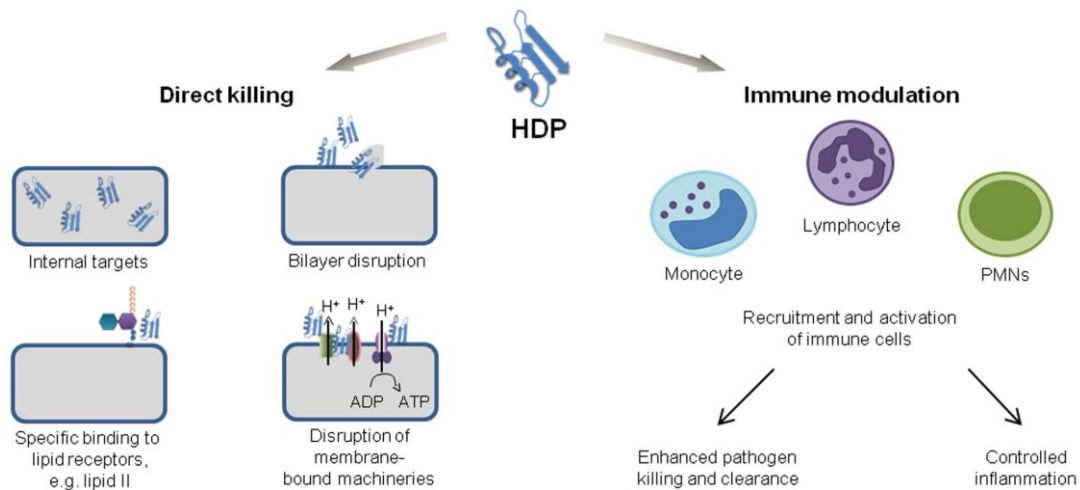


Abbildung 4: Unterschiedliche Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide (Ulm et al. 2012). Rechts der Wirkmechanismus durch Modulierung der Immunreaktionen; links der direkte Wirkmechanismus mit direktem Kontakt zu den Mikroorganismen; PMN: polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt

Membranpermabilisierung

Antimikrobielle Peptide deren Zielstrukturen bakterielle Membranen darstellen, können mit diesen entweder über rezeptorvermittelter oder nicht-rezeptorvermittelter Wechselwirkungen interagieren.

Mittels rezeptorassoziierter Wechselwirkungen agieren meist AMPs, welche prokaryotischen Ursprungs sind, wie bspw. Nisin, welches im nanomolaren Bereich wirksam ist (Breukink et al. 1999). Der Großteil der aus Vertebraten und Invertebraten stammenden AMPs treten ohne spezifische Rezeptoren mit der Membran in Wechselwirkung und wirken typischerweise *in vitro* gegen Mikroorganismen im mikromolaren Konzentrationsbereich. Die äußere Membran grampositiver und gramnegativer Bakterien setzt sich aus Teichonsäure und Lipopolysacchariden zusammen, die dort auf der Oberfläche eine negative Nettoladung ausbilden und somit den Erstkontakt der kationischen AMPs mit der bakteriellen Membran über elektrostatische Wechselwirkung gewährleisten (Yeaman und Yount 2003; Shai 2002).

Für das Auftreten und die Stärke dieser elektrostatischen Wechselwirkungen spielt die Zusammensetzung der Membran eine entscheidende Rolle und ist somit für die Differenzierung von prokaryotischen und eukaryotischen Membranen der AMPs zuständig. Die äußere Schicht des bakteriellen Bilayers setzt sich aus Lipiden wie Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin mit negativ geladenen Kopfgruppen zusammen (Zhang et al. 2001), wohingegen die Oberflächen von Säugerzellen aus zwitterionischen Phospholipiden wie Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin und neutralen Komponenten wie Cholesterol zusammengesetzt sind (Guilhelmelli et al. 2013; Zasloff 2002). Die unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen AMPs gehen starke elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phospholipiden der äußeren bakteriellen Membran ein.

Ein interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass einige AMPs auch antikanzerogene Wirkung zeigen. In Krebszellen ist die Asymmetrie der Phospholipidzusammensetzung zwischen der inneren und äußeren Membran in Form der negativ geladenen Phospholipide weitgehend aufgehoben. Dies erfolgt durch einen Anstieg der relativen Häufigkeit negativ geladener Phosphatidylserine in der äußeren Lage der Lipiddoppelschicht, welche die Interaktion der AMPs mit der Membran steigert. Ebenso führt die Überexpression anderer negativ geladener Biomoleküle wie Heparin, o-glykosidischer Mucine und der Anstieg des transmembranen Potentials sowie der Membranfluidität zu einer spezifischen Wirkung mancher antimikrobieller Peptide gegenüber Krebszellen (Félicio et al. 2017).

Die Spezifität und damit die Wirksamkeit der AMPs ist allerdings nicht alleine von der Ladung der Membranbestandteile abhängig, sondern auch von der generellen Zusammensetzung der Membranlipide. Magainin beispielsweise zeigt eine deutlich höhere Aktivität gegenüber anionischen Phosphatidylglycerol-Liposomen, die sich vorzugsweise in bakteriellen Membranen finden. Gegenüber negativ geladenen Phosphatidylserin-Liposomen, wie sie in tierischen Membranen vorkommen, zeigt Magainin eine schwächere Aktivität (Matsuzaki 1998). Lipide weisen durch die Größe ihrer polaren Kopfgruppen und der Länge der hydrophoben Ketten eine große strukturelle Diversität auf. Phosphatidylserin (PS) weist eine kegelartige Struktur, PG hingegen eine eher zylinderförmige Struktur auf. Diese wirken sich bei der Bildung einer Membran auf deren Krümmung aus und nehmen so Einfluss auf die Wirksamkeit antimikrobieller Peptide. Dies sind insbesondere Ladungen, die in den gekrümmten Regionen lokalisiert sind (Jouhet 2013).

AMPs besitzen desweiteren die Fähigkeit auch mit zwitterionischen Membranbestandteilen wie Phosphatidylethanolamin zu interagieren. Auch dieses Lipid findet sich häufig an der Oberfläche bakterieller Membranen und wird ebenfalls in großer Anzahl in der inneren Membranschicht tierischer Zellen gefunden (Strömstedt et al. 2016; Phoenix et al. 2015). Diese aufgeführten Studien zeigen deutlich, dass nicht deren Ladung alleine verantwortlich für den ersten Kontakt sein kann, sondern Faktoren wie Membrankrümmung eine wichtige Rolle im Rahmen der initialen Wechselwirkungen spielen.

Nach den ersten elektrostatischen oder hydrophoben Wechselwirkungen lagern sich die AMPs nun nach Erreichen einer bestimmten Konzentration an die Oberfläche der bakteriellen Membran an (Epanand et al. 2016; Andersson et al. 2016). Ab dieser Phase existieren verschiedene Modelle zur Beschreibung des tatsächlichen Wirkmechanismus (*Mode of Action*). Die Modelle können grob in zwei Kategorien eingeteilt werden: Transmembran-Porenmodelle und porenfreie Modelle.

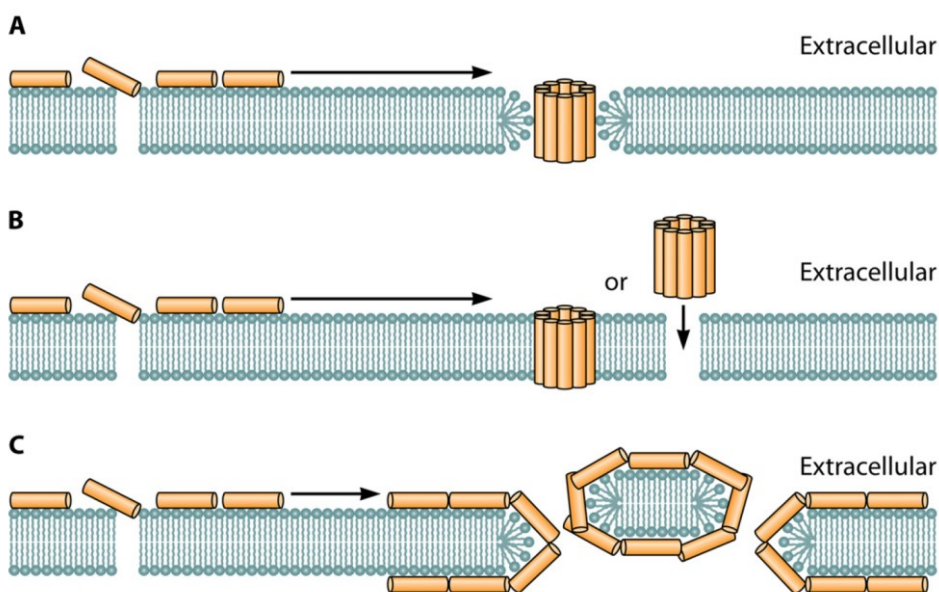


Abbildung 5: Membrano-lytische Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide: A) Das Toroidale – Pore – Modell mit Interaktion und Porenbildung durch Peptid-Lipid-Wechselwirkungen, B) das Barrel-Stave-Modell mit spezifischer Peptid-Peptid-Interaktion und Porenbildung und C) das Carpet-Modell nach Erreichen der Threshold-Konzentration und darauffolgenden mizellaren Kollaps der Membran (Le et al. 2017)

Weiterhin können die Transmembran-Porenmodelle in das sogenannte *Barrel-Stave-Modell* und das *Toroidal-Pore-Modell* unterteilt werden. Wirken die antimikrobiellen Peptide über das *Barrel-Stave-Modell*, so ordnen sie sich zunächst parallel zur Membran an, um schließlich senkrecht in den Bilayer eindringen zu können. Diese Art des Eindringens in die Membran führt auf Grund von lateralen Peptid-Peptid-Wechselwirkungen zu einer Anordnung, die der eines transmembranen Ionenkanals ähnelt. Für diese Art der Wechselwirkung ist eine amphiphile Struktur, wie man sie in α -helikalen oder β -Faltblatt-Strukturen findet, notwendig. Um diese Art von transmembranen Poren ausformen zu können, interagiert der hydrophobe Teil des Moleküls mit der Membran. Der hydrophile Teil bildet hingegen im Inneren der Pore das Lumen des Kanals aus. Eine essentielle Gemeinsamkeit dieser AMPs ist die minimale Länge von 22 Aminosäureresten für eine α -Helix bzw. 8 Aminosäureresten für einen β -Strang. Diese Anzahl von Aminosäure ist notwendig, um einen vollständigen Durchgang durch die Membran

gewährleisten zu können. Bisher ist nur eine geringe Anzahl an Peptiden bekannt, die auf diese Weise wirken. Hierzu gehören die Protegrine (Brogden 2005), das Paradaxin (Rapaport und Shai 1991; Shai et al. 1990) und das Alamethicin (Wimley 2010).

Im Fall des *Toroidal-Pore*-Modells wandern die AMPs ebenfalls senkrecht in den Membranbilayer ein, allerdings ohne spezifische Peptid-Peptid-Interaktionen. Dabei erzeugt das AMP durch seine Einlagerung im Bilayer die Ausbildung von Poren, die im Gegensatz zum *Barrel-Stave*-Modell aus Peptiden und den Kopfgruppen der Phospholipide bestehen. Dies hat eine lokale Krümmung der Membranoberfläche zur Folge. Diese dynamischen und transienten Supramoleküle werden auch als toroidale Pore bezeichnet und führen zum Aufbrechen des Bilayers. Dies bietet neue Interaktionsmöglichkeiten für die Lipidköpfe und -enden. Über diesen Mechanismus ist es manchen Peptiden möglich, in das Innere der Bakterienzelle zu gelangen, um dort auch intrazelluläre Targets zu erreichen. Als weitere Merkmale des *Toroidal*-Modells sind die Ionenselektivität und die diskontinuierliche Größe der ausgebildeten Poren zu nennen. Die Wirkung von Magainin 2 (Lee et al. 2016), Aurein 2.2 (Cheng et al. 2009) und Melittin (Lee et al. 2016; Wimley 2010) lässt sich im Rahmen dieses Modells erklären.

Desweiteren können antimikrobielle Peptide auch ohne Porenbildung mit den bakteriellen Membranen interagieren. Eine Möglichkeit stellt das sogenannte *Carpet*-Modell dar. In diesem Fall lagern sich die Peptide zunächst parallel zur Oberfläche an die Membran an. Nach Erreichen einer bestimmten, kritischen Konzentration, der *Threshold Concentration*, ist die Oberfläche nahezu gesättigt, was dem Bild eines Teppichs (*Carpet*) entspricht. Folglich stellt sich ein Verlust der Membranintegrität ein und die AMPs erzeugen einen ähnlichen Effekt, wie ihn Detergenzien auf Oberflächen ausüben. Schließlich kollabiert die Bakterienzelle unter Ausbildung von Mizellen. Dieser Effekt wird auch im Rahmen des *Detergence-like*-Modells beschrieben. Viele AMPs wirken, unabhängig von ihrer Länge und Aminosäurezusammensetzung in hohen Konzentrationen völlig unspezifisch über solche Phänomene. Bekannte AMPs mit diesem Wirkmechanismus sind bspw. die Cecropine, Indolicidin, Aurein 1.2 und LL-37 (Rozek et al. 2000; Shai 2002; Fernandez et al. 2012). Insgesamt haben sich in der Literatur eine Vielzahl unterschiedlicher Membranmodelle etabliert, durch die der Wirkmechanismus mittels Membranpermeation erklärt werden kann.

Nicht-Membranassoziierte Wirkmechanismen

Diese Art antimikrobieller Peptidwirkung kann ebenfalls in zwei Subkategorien unterteilt werden. Zur ersten Gruppe gehören Moleküle, die spezifisch in die Zellwandsynthese eingreifen und eine zweite Gruppe von Molekülen, die intrazelluläre Targets besitzen. Ähnlich wie das konventionelle Antibiotikum Penicillin, können AMPs die Zellwandbiosynthese inhibieren. Dies geschieht, indem sie mit einer Vielzahl an Vorläufermolekülen der Zellwandsynthese interagieren und somit einen Einbau der Moleküle in die bakterielle Zellwand verhindern. Eines der primären Zielmoleküle ist das hoch konservierte Lipid II (Malanovic und Lohner 2016). So binden bspw. Defensine an die negativ geladenen Pyrophosphatzuckerreste des Lipid II-Moleküls. Diese Bindung verursacht nach Einbau von Lipid II in die Membran eine Porenbildung oder eine Störung des Aufbaus der regelmäßigen Membranstruktur. Das humane β -Defensin 3 (Münch und Sahl 2015) und das α -Defensin (Leeuw et al. 2010) besitzen eine selektive Bindungsfähigkeit zu Lipid II, die für ihre antimikrobielle Wirkung verantwortlich gemacht

werden kann. Zu Beginn der AMP-Forschung wurde zunächst angenommen, dass diese Molekülklasse keine intrazellulären Targets besitzt.

Erste Studien mit α -helikalen Peptiden wie Magainin, Cecropin und Melittin zeigten, dass es keinen Unterschied in der Wirkung zwischen beiden enantiomeren Formen der Peptide gab (Wade et al. 1990). Diese Ergebnisse ließen Vermutungen aufkommen, dass stereospezifische Zielmoleküle wie Proteine oder DNA/RNA nicht für eine antibakterielle Aktivität der Peptide in Frage kommen, sondern diese Art von Molekülen die Membran angreifen (Epand et al. 2016). Später zeigten weitere Untersuchungen, dass doch einige AMPs dieser Klasse existieren, bei denen sich die beiden Enantiomere sehr wohl in ihrer Wirkung unterscheiden (Vunnam et al. 1997). Heute ist bekannt, dass verschiedene AMPs intrazellulär spezifische Zielmoleküle für ihre antibakterielle Aktivität benötigen. Diese Moleküle verursachten innerhalb ihrer minimal-effektiven Konzentration keine Schädigung der Membranen, führten aber jedoch zum Absterben der Bakterien (Brogden 2005).

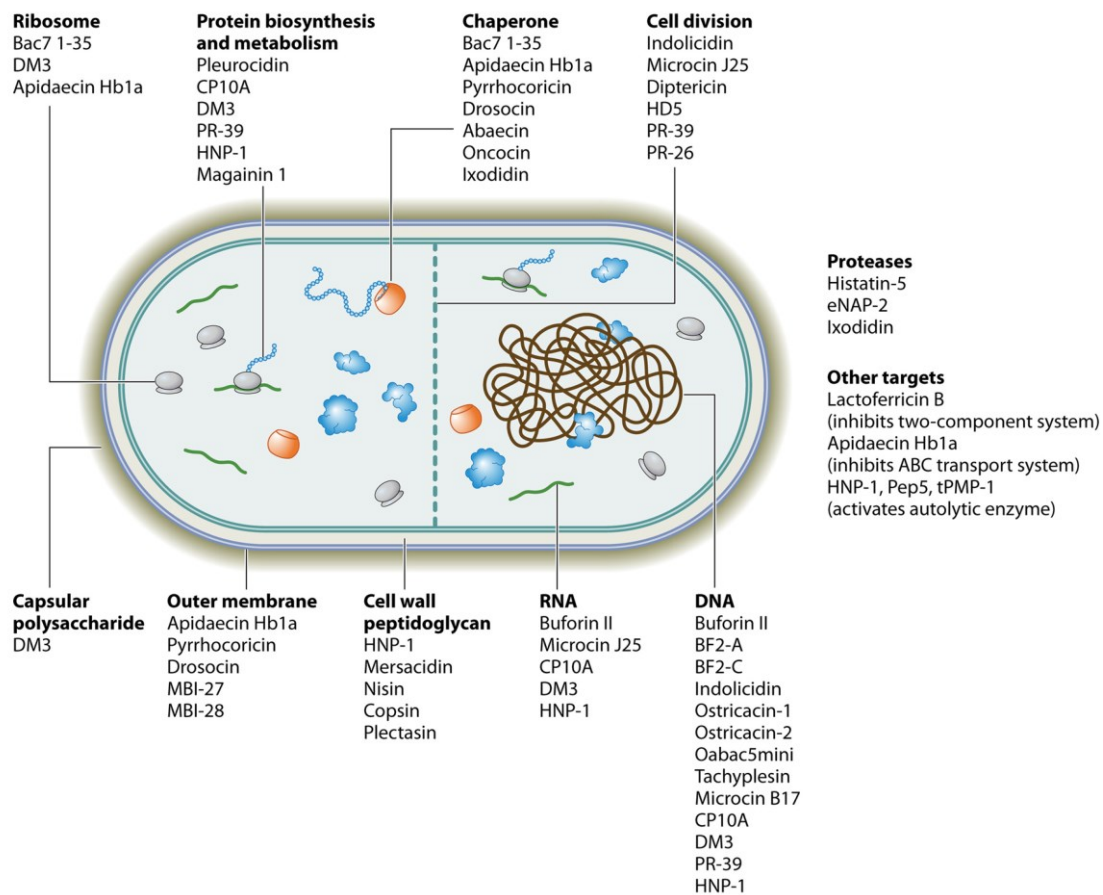


Abbildung 6: Intrazelluläre Zielstrukturen einer bakteriellen Zelle, welche mit AMPs interagieren (Le et al. 2017)

Diese Peptide interagieren zunächst mit der Membran und sammeln sich schließlich im Inneren der Zelle an, wo sie wichtige, kritische zelluläre Prozesse inhibieren. Verschiedene Mechanismen wie die Inhibition der Protein- oder Nukleinsäuresynthese oder die Inhibition wichtiger Enzyme konnten hier nachgewiesen werden. Buforin II bindet beispielsweise nach Membrantranslokation an Nukleinsäuren

(Park et al. 1998). Indolicidin (Subbalakshmi und Sitaram 1998), humanes β -Defensin 4 (Sharma und Nagaraj 2015) und PR-39 (Boman et al. 1993) sind weitere Beispiele aus dieser Gruppe. Eine Übersicht intrazellulärer Targets und ihrer dazugehörigen Peptide ist in Abbildung 6 dargestellt.

Eine hochinteressante eigenständige Gruppe intrazellulär wirksamer AMPs, auf deren Fokus diese Arbeit liegt, stellen die prolinreichen antimikrobiellen Peptide dar. Auf diese soll nun im Folgenden näher eingegangen werden.

1.3.2 Prolinreiche Antimikrobielle Peptide (PrAMP)

Prolin-reiche antimikrobielle Peptide besitzen trotz hoher Sequenzdiversität einige allgemeine Charakteristika und finden sich in einer großen Anzahl von Organismen. Namensgebend zeichnen sich diese Peptide durch einen ungewöhnlich hohen Anteil an Prolinresten aus. Ebenso besitzen sie eine positive Nettoladung, welche in der Regel durch das Vorkommen der Aminosäure Arginin vorgegeben wird. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Tatsache, dass sie hauptsächlich wirksam gegenüber gramnegativen Bakterien sind und dieser Effekt nicht durch eine Membranalyse induziert wird. Sie besitzen höchstwahrscheinlich ein intrazelluläres Target (Casteels et al. 1989; Boman et al. 1993; Casteels und Tempst 1994; Gennaro et al. 1989; Gennaro et al. 2002), was durch eine Vielzahl an Studien mit L- und D- Enantiomeren verifiziert werden konnte (Podda et al. 2006). Diese Eigenschaften machen sie, wie bereits erwähnt, im Bereich der Antibiotikaforschung zu einer hochinteressanten Wirkstoffgruppe.

Diversität prolinreicher antimikrobieller Peptide

PrAMPs konnten zunächst in Honigbienen (Casteels et al. 1989) und Schafen (Gennaro et al. 1989) identifiziert werden und sind heute in einer Vielzahl von Insekten und Säugetieren dokumentiert (Otvos 2002), ebenso wie in Amphibien (Li et al. 2006a), Krustentieren und Mollusken (Schnapp et al. 1996; Destoumieux et al. 1999; Rolland et al. 2010; Gueguen et al. 2009). Unabhängig von ihrer Herkunft und Primärsequenz, haben alle PrAMPs den hohen Anteil von 25-50 % der Aminosäure Prolin gemeinsam. Ebenso ist das Vorhandensein von Arginin üblicherweise in speziellen Sequenzmotiven und eine damit verbundene kationische Nettoladung ein Charakteristikum der PrAMPs. Nahezu alle Säuger-PrAMPs gehören der Familie der Cathelicidine an, welche gemeinsam mit den Defensinen die sogenannten *Host-Defense*-Peptide der Wirbeltiere bilden. Cathelicidine können anhand ihrer hochkonservierten N-terminalen Prä-Proregion und einer sehr variablen C-terminalen Domäne charakterisiert werden. Diese strukturellen Begebenheiten ähneln denen antimikrobieller Peptide, die erst nach Proteolyse in ihrer aktiven Form vorliegen (Zanetti et al. 2000; Lehrer und Ganz 2002; Scocchi et al. 1992). PrAMPs der Cathelicidinfamilie wurden bisher lediglich in Paarhufern identifiziert. Bac5 und Bac7 konnten als erste PrAMPs dieser Untergruppe aus bovinen Neutrophilen isoliert werden (Frank et al. 1990). Weitere Bac-Analoga konnten in weiteren Rinderarten sowie Schafen und Ziegen gefunden werden. Trotz der Zugehörigkeit zu einer Familie weisen die Säuger-PrAMPs eine hohe Variabilität und Diversität in Länge und Sequenz auf, ebenso das Auftreten verschiedenen repetitiver tetramerer Motive wie PRPX oder PPRX, wobei X häufig großen hydrophoben Resten oder Glycin entspricht.

Tabelle 2: Prolinreiche Peptide isoliert aus Insekten

Name	Herkunft	Sequenz	Anzahl	Netto-	Prolin
			AS	ladung	(%)
Kurz-kettige					
Apidaecine	Honigbiene	GNNRPVYIPQPRPPHORL	18	3	33
	Hummel	ANRPVYIPPPRPPHPHRL	17	3	41
	Wespe	NRPTYVPPRPPHPRL	16	3	44
	Hornisse	GKPRPQQVPPRPPHPRL	17	3	41
Pyrrhocoricin	Feuerwanze	VDKGSYLPRPTPRPIYNRN	20	3	25
Drosocin	Fruchtfliege	GKPRPYSPRPTSHPRPIRV	19	5	32
Lang-kettige					
Metchnikowin	Fruchtfliege	HRHQGPIFDTRPSPFNPNQPRPGPIY	26	2	27
Labocin	Motte	DLRFLYPRGKLPVPTPPFNPKEIYIDMGNRY	32	2	25
Abaecins	Honigbiene	YVPLNIPQGRPFPTFGQGPFNPKIRWPQGY	34	4	30
	Hummel	FVPYNPPRPGQSKPFPTFGHGPFNPKIQWPYPLNPGH	39	4	33

Die größte Anzahl PrAMPs konnte bisher in Insekten identifiziert werden, welche in zwei Subgruppen eingeteilt werden können: Langkettige PrAMPs und kurz-kettige PrAMPs (Bulet et al. 1999). Apidaecine aus der Hämolymphe der Honigbiene *Apis mellifera* gehörten zu den ersten entdeckten prolinreichen Insekten-AMPs. Eine große Anzahl weiterer PrAMPs konnten aus verschiedenen Wespen-, Hummel- und Hornissenarten isoliert und identifiziert werden. Pyrrhocoricin aus der Feuerwanze *Pyrrhocoris apterus* und Oncocin aus der Bodenwanze *Oncopeltus fasciatus* stellen weitere potente PrAMPs dar.

Konformationen und Struktur-Wirkungsbeziehungen

Eine entscheidende Rolle spielt die Aminosäure Prolin, eine proteinogene, zyklische sekundäre Aminosäure, nicht nur bei der Namensgebung dieser Peptidklasse, sondern nimmt auch auf eine einzigartige Weise Einfluss auf die strukturellen Gegebenheiten der Sekundärstruktur der Peptide. Durch die zyklische Form des Prolins können diese Peptide kaum α -helikale oder β -faltblattähnliche Strukturen ausbilden.

Prolinreiche Sequenzen neigen zur Ausbildung von Strukturen ähnlich einer Poly-L-Prolin-Typ-II-Helix-Konformation (PP-II Helix), einer ausgestreckten Strukturform mit drei Prolinresten pro Windung (Abbildung 7). CD-Spektren von PR-39 in wässriger Phase zeigen genau solch eine Struktur und weisen keinerlei Strukturänderung nach Zugabe von Liposomen auf. Dies spricht auch für die Annahme, dass eine Interaktion mit der Membran keine strukturelle Änderungen nach sich zieht (Cabiaux et al. 1994). CD und NMR-Studien mit Bac5 und seinen funktionellen Bruchstücken ließen ähnliche Rückschlüsse zu (Raj und Edgerton 1995; Raj et al. 1996; Niidome et al. 1998). Ebenso zeigten Apidaecine und Drosocin die postulierte PP-II helikale Struktur (Li et al. 2006b; Dutta et al. 2008). Dies lässt darauf schließen, dass eine PP-II-Helix die biologisch aktive Form dieser Peptide ist.

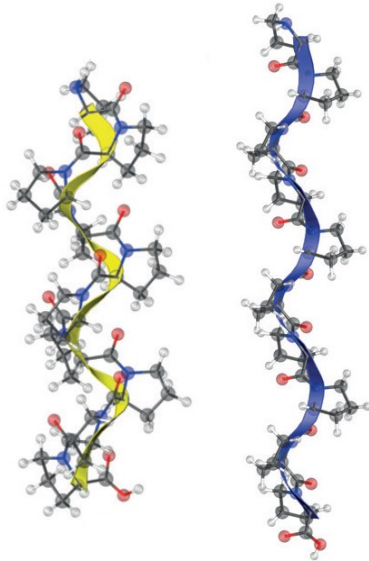


Abbildung 7: Helikale Strukturen von Poly-L-Prolinen: Links die Ausbildung einer Poly-L-Prolin-Typ-I-Helix, wie sie hauptsächlich durch cis-Isomere ausgebildet wurde; rechts die durch trans-Isomere ausgebildete Poly-L-Typ-II-Helix

Obwohl sich die strukturellen Aspekte der aus Tieren oder Insekten stammenden PrAMPs meist auf Methoden mit geringer Auflösung wie CD-Spektroskopie stützen, scheint es, dass diese PrAMPs ähnliche gestreckte und im Vergleich zu anderen AMPs „entspanntere“ Konformationen annehmen und diese auch in Anwesenheit von biologischen Membranen nicht merklich ändern. Dies lässt einen Wirkmechanismus vermuten, welcher nicht mit einer Umstrukturierung oder Zerstörung mikrobieller Membranen einhergeht.

Erkenntnisse über den Wirkmechanismus prolinreicher AMPs konnten aus Untersuchungen sowohl an Insektenpeptiden als auch an tierischen AMPs gewonnen werden. In der Gruppe der Insekten-PrAMPs sind insbesondere Pyrrhocoricin, Apidaecin und Oncocin zu nennen, Bac5, Bac7 und Pr-39 führten zu weiteren Erkenntnissen im Bereich der tierischen PrAMPs. In diesen Studien wurden meist kurze Peptidfragmente aus den Sequenzen der genannten PrAMPs synthetisiert, um Informationen über die Aktivität wichtiger Sequenzabschnitte zu erhalten (Gennaro et al. 2002). Ergebnis dieser Studien ist, dass spezifische Sequenzregionen für die antimikrobielle Aktivität verantwortlich sind. So wurde bei Bac5, Bac 7 und PR-39 von C-terminaler Seite her die Sequenz bis zu einer minimalen Länge von 15-16 Aminosäuren gekürzt, was zum signifikanten Verlust der Aktivität führt (Chan et al. 2001; Benincasa et al. 2004; Tokunaga et al. 2001). Kürzungen von N-terminaler Seite her, meist eine kationische Region in diesen Peptiden, wirkten sich besonders fatal aus und führten zu einem starken Aktivitätsverlust bis hin zur vollständigen Inaktivierung (Gennaro et al. 2002; Benincasa et al. 2004). Der N-terminale Arginin-Rest scheint besonders wichtig für die Aktivität zu sein. Bac7(1-23) und Bac7(1-35) stellen vollständig aktive Derivate da, wohingegen Bac7(5-23) und Bac7(5-35) nach Entfernen eines RRIR-Motivs eine stark reduzierte Aktivität aufweist (Benincasa et al. 2004). Das Anfügen dieser Sequenz an ein inaktives Bac7(29-56) führte zur partiellen Reaktivierung des Peptides. Ebenso wurde nach Substitution von RRIR durch KKIK bei Bac7(1-23) ein partieller Verlust der antimikrobiellen Aktivität verzeichnet (Gennaro et al. 2002). Dies spricht dafür, dass offenbar neben der kationischen Ladung weitere spezifische Eigenschaften wie Stereochemie und Wasserstoffbrückenbindungskapazität der Aminosäure Arginin für die antibakterielle Aktivität zuständig sein müssen.

Diese Ergebnisse erwecken den Anschein, dass die antibakterielle Aktivität tierischer PrAMPs am N-terminalen Ende lokalisiert ist und der restliche Teil der Peptidsequenz lediglich eine unterstützende Funktion besitzt. Dies konnte jedoch durch SAR-Studien an PR-39 widerlegt werden (Chan et al. 2001).

SAR-Studien an Apidaecin zeigten, dass die C-terminale Region für die generelle antibakterielle Aktivität zuständig ist, wohingegen der N-terminale Sequenzabschnitt für das antibakterielle Spektrum verantwortlich zu sein scheint (Li et al. 2006b). Die Substitution eines einzelnen Arginin-/Leucin-Restes durch ein Glycinanalogon zur Steigerung der Proteolyseresistenz zeigte, dass die Position der Substitution merklichen Einfluss auf die Aktivität hat. Am N-Terminus führt die Modifikation des Restes zu einer Erhöhung der Proteolyseresistenz, ohne signifikant Einfluss auf die Aktivität zu nehmen. Ersetzt man allerdings Leucin am C-terminalen Ende, speziell in der bei Apidaecinen hochkonservierten Sequenzfolge PRPPHPRL, führt dies zu einem progressiven Verlust der Aktivität. Hier zeigt die Substitution von Leucin mit einem Peptoidanalogon einen sofortigen Verlust der Aktivität (Gobbo et al. 2009).

Wirkungsmechanismus von PrAMPs

Erste Hinweise auf einen intrazellulären, nicht-membranolytischen Wirkmechanismus lieferten Untersuchungen an *E. coli*-Zellen mittels Lichtstreuung. Hier wurden *E. coli*-Kulturen mit Apidaecin inkubiert und es zeigte sich trotz bakterizider Wirkung der Peptide keine Änderung in ihrer Lichtstreuung (Casteels et al. 1989). Dies spricht dafür, dass diese nicht durch die bis dahin bekannte Membranpermeabilisation wirken konnten. Ein weiteres Indiz für einen intrazellulären Wirkmechanismus findet sich in der sehr langsamen Abtötungskinetik von mehreren Stunden verglichen mit der schnellen Kinetik der membranolytischen AMPs, die bereits nach einigen Minuten eine Reduktion über mehrere Größenordnungen verzeichnen können.

Der Einfluss der Peptidstereochemie ist ein weiterer Punkt, der für einen besonderen Wirkmechanismus der PrAMPs spricht. Eine Vielzahl an Studien belegt den merklichen Verlust der Aktivität hochaktiver L-Derivate durch den Einbau von D-Aminosäuren. Trotz ihrer intrazellulären Lokalisation konnte für viele PrAMPs der genaue Wirkmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt werden (Scocchi et al. 2016). Nach Meinung der Forscher wurden zwei wichtige Mechanismen für die zelluläre Aufnahme postuliert: (i) Transporter-vermittelte Translokation und (ii) spontane Translokation. Eine Membrantranslokation über bakterielle Proteintransporter wurde bereits für einige PrAMPs beschrieben (Mattiuzzo et al. 2007; Berthold und Hoffmann 2014). Verschiedene PrAMPs, darunter PR-39, Bac7, Apidaecin 1b, Oncocin und Arasin 1, nutzen für die Translokation in *E. coli* und anderen gramnegativen Bakterien ein inneres Membranprotein, den sogenannten SmbA-Transporter (Mattiuzzo et al. 2007; Runti et al. 2013; Berthold und Hoffmann 2014; Paulsen et al. 2016). In Fall des gramnegativen *E. coli* scheint es, dass einige PrAMPs ausschließlich SmbA für die zelluläre Aufnahme nutzen, wohingegen andere, darunter auch Bac7(1-35) und Oncocin, ohne Vorhandensein des SmbA-Transporters in die Zelle gelangen können. Dies lässt darauf schließen, dass ein weiteres bakterielles Transportersystem geben muss, welches in Form des yjil-mdtM Genclusters identifiziert wurde (Krizsan et al. 2015a).

Für den Mechanismus der spontanen Translokation wurde das *Shai-Matsuzaki-Huang-Modell* (Huang et al. 1997; Matsuzaki et al. 1998; Shai 2002) vorgeschlagen. Nach diesem Modell binden Peptide zunächst an die Membranoberfläche und rücken schließlich in Folge ihrer amphiphilen Struktur in die Membran hinein, in der sich auf diese Weise transiente Poren bilden. Nach Zerstörung dieser Poren

können einige Peptide ins Zellinnere gelangen. Unterhalb einer kritischen Peptidkonzentration, die noch keinen Membrankollaps nach sich zieht, können Peptide so unter Erhalt der Membranintegrität ins Innere gelangen.

Sowohl einzelne als auch multiple Targets werden für nicht-membranolytischen Peptide beschrieben (Le et al. 2017). Zu den wichtigsten Wirkungsmechanismen gehören die Hemmung der Proteinbiosynthese, die DNA-Bindung, welche die Transkription/Replikation beeinflusst sowie die Inaktivierung von grundlegenden Enzymaktivitäten.

Für eine Reihe nicht-lytischer Peptide konnte gezeigt werden, dass diese die Proteinbiosynthese stören. Nachweise für diesen Wirkungsmechanismus brachten unter anderem Untersuchungen an Derivaten des Pleurocidins (Patrzykat et al. 2002) und des Indolicidins (Friedrich et al. 2001). Die bakterielle Proteinbiosynthese und die Inhibition molekularer Chaperone konnten bereits als wesentliche Targets für PrAMPs identifiziert werden (Knappe et al. 2010). Weitere Hinweise und Untersuchungen legten den Einfluss der PrAMPs auf die Proteinbiosynthese und Proteinfaltung nahe. Otvos *et al.* (2000) und Morell *et al.* (2008) zeigten, dass die Insektenpeptide Pyrrhocoricin, Drosocin und Apidaecin eine spezifische Bindung mit dem Hitzeschockprotein DnaK und in geringem Maße auch mit dem Chaperon GroEL eingehen (Otvos et al. 2000; Morell et al. 2008). Diese Hemmung kann in erster Linie auf eine sterische Hinderung der Chaperone und im Weiteren auf das Konkurrieren um eine Substratbindedomäne der DnaK zurückgeführt werden (Kragol et al. 2001; Kragol et al. 2002). Hinweise auf einen solchen Mechanismus geben Experimente unter Einbau von D-Aminosäuren. Solche modifizierten Peptide sind inaktiv, so dass auf eine stereospezifische Interaktion zwischen PrAMP und DnaK geschlossen werden kann (Scocchi et al. 2009). Unlängst konnte diese Wirkungsweise auch für die Peptide Oncocin (Knappe et al. 2010), verschiedene Apidaecine (Czihal et al. 2012) sowie für eine Anzahl von Fragmenten und Derivaten des Pyrrhocoricin und A3-APO (Zahn et al. 2013) beschrieben werden.

Für Bac7 und Oncocin konnte allerdings beobachtet werden, dass die alleinige Inhibition der DnaK-Aktivität zur Abtötung der Bakterien nicht ausreichend zu sein scheint. In *E. coli*-Mutanten, deren DnaK-Aktivität ausgeschaltet wurde, zeigten diese Peptide weiterhin ihre Wirksamkeit (Krizsan et al. 2015b). So konnten in neuerer Zeit Untersuchungen das 70S Ribosom und somit die Proteinbiosynthese als eines der Haupttargets nachweisen und zeigen, dass die PrAMP-Derivate Api88, Onc72 und Bac7(1-35) die Proteinsynthese sowohl *in vivo* (Mardirossian et al. 2014) als auch in kultivierten *E. coli*-Zellen inhibieren. Die Inhibition der *In-vitro*-Translation von Bakterien wurde in Arbeiten von Seefeldt *et al.* 2016 für die PrAMPs Pyrrhocoricin und Metalnikowin 1 gezeigt. In gleicher Weise konnte die spezifische Bindung von Api88 an das bakterielle Ribosom nachgewiesen werden (Volke et al. 2015). Kürzlich konnte mittels Proteinkristallographie am 70S Ribosom von *Thermus thermophilus* die A-Site und der Exit-Tunnel als Bindestelle für das 19mer Peptid Onc112 identifiziert werden (Seefeldt et al. 2015). Diese Bindestellen und Wirkmechanismen konnten ebenso für Bac7(1-16) und Bac7(1-35), Pyrrhocoricin und Onc112-Derivate verifiziert werden (Gagnon et al. 2016). Für diese Peptide konnte gezeigt werden, dass ein Übergang in die Elongationsphase der Proteinbiosynthese blockiert wird. Für Peptide vom Apidaecintyp hingegen wurde ein anderer Mechanismus identifiziert. Diese Peptide blockieren den Zusammenbau der großen 50S-Untereinheit und der kleinen 30S-Untereinheit zum funktionsfähigen Ribosom.

Das Verständnis der Wirkmechanismen dieser Peptide könnte weitere Fortschritte in der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung einer neuer Generation Therapeutika mit sich bringen. Obwohl

diese Art antimikrobieller Peptide hauptsächlich gegen gramnegative Bakterien aktiv ist, konnte durch rationales Design neuer Oncocinderivate oder durch synergistisches Zusammenwirken mit anderen AMPs das Spektrum ihrer antimikrobiellen Aktivität auf grampositive Spezies erweitert werden (Benincasa et al. 2004; Bluhm et al. 2015; Knappe et al. 2016). Ebenso wurde von anderen Autoren eine *In-vivo*-Aktivität der Oncocine und Apidaecine innerhalb von Infektionsversuchen an Mäusen mit *E. coli* und *K. pneumoniae* nachgewiesen (Knappe et al. 2012). Untersuchungen hinsichtlich der molekularen Mechanismen dieser antimikrobiellen Aktivitäten können helfen, weitere hochpotente PrAMP-basierte Wirkstoffkandidaten zu entwickeln und damit das therapeutische Potential erhöhen.

***In-vivo*-Applikationen und therapeutisches Potential der PrAMPs**

In den vergangenen Jahren wurden einige Studien mit PrAMPs durchgeführt, um deren Potential als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Antiinfektiva zu prüfen. Das Interesse an diesen Untersuchungen fußt auf zwei unterschiedlichen Anwendungsoptionen. Wobei die Entwicklung neuer Antibiotika sich auf nicht-membranolytischen Wirkungsweisen fokussiert. Ein weiteres Anwendungsgebiet umfasst neuartige *Drug Delivery* Systeme durch zellpenetrierende Peptide für einen intrazellulären Wirkstofftransport. Versuche, deren Anwendungspotential zu steigern, basieren in erster Linie auf der Erhöhung der Serumstabilität ohne die antimikrobiellen oder translokativen Eigenschaften dieser Moleküle zu verändern. Die Optimierung von Pyrrhocoricin konnte beispielsweise Derivate mit einer hohen Serumstabilität und geringer Zytotoxizität in Mäusen hervorbringen (Otvos et al. 2005). Eines der vielversprechendsten Designerpeptide auf diesem Gebiet ist A3-APO, welches den vollständigen Erhalt der antimikrobiellen Aktivität in Gegenwart von Serum ausweist und gleichzeitig erfolgreich systemische Infektionen durch gramnegative Erreger im Mausmodell bekämpfen konnte (Otvos et al. 2005; Noto et al. 2008; Szabo et al. 2010). Diese Peptide besitzen offenbar einen dualen Wirkmechanismus, da sie zum einen die Fähigkeit der Membraninteraktion und Lyse besitzen, aber auch intrazellulär durch Bindung an DnaK wirken. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass A3-APO eine höhere Aktivität besitzt, die sich durch zusätzliche immunstimulierende Effekte der AMPs erklären ließe (Szabo et al. 2010).

Ausgangssequenz für das Design des synthetischen Peptids Oncocin, mit der Sequenz VDKPPYLPRPRPPRIYNR-NH₂, war ein eher moderat aktives Analogon des PrAMPs Pyrrhocoricin. Dieses PrAMP wurde mit einer Sequenzhomologie von ca. 70 % aus der Bodenwanze *Oncopletus fasciatus* isoliert (Schneider und Dorn 2001). Eine Anzahl verschiedener Modifikationen optimierte schließlich die Wirkung gegenüber gramnegativen Erregern (Knappe et al. 2011). Diese Derivate besitzen nun Fähigkeiten zur Translokation ohne Membranlyse sowie geringes zytotoxisches Potential gegenüber humanen Zelllinien. Die Substitution von Argininresten durch Ornithin konnte die Halbwertszeit und somit auch die Aktivität in Mäuseserum steigern. Arbeiten von Scocchi *et al.* zeigten ähnliche Entwicklungen hinsichtlich des Potentials von Bac7, das unter anderem zur Behandlung von Salmonellosen eingesetzt wurde. Das Fragment Bac7(1-35) zeigte nach 24 h Inkubation in murinem Serum noch eine signifikante Aktivität und zeigte in *In-vivo*-Experimenten eine deutliche Reduktion der Mortalität infizierter Tiere in einem Mausmodell zur Untersuchung des Typhus (Benincasa et al. 2010). Ebenso wurde gezeigt, dass Bac7(1-35) in einem *In-vivo*-Rattenmodell zur Untersuchung des septischen Schocks signifikant den Effekt von LPS reduzierte und hier eine ähnliche Wirkung wie mit Polymyxin B erzielt werden konnte (Ghiselli et al. 2003).

Das zweite potentielle Anwendungsgebiet der PrAMPs ist der Wirkstofftransport in Form von zellpenetrierenden Peptiden. Die zelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Bac7(1-35)-Peptide in Bakterienzellen konnte mittels *Flow*-Zytometrie oder konfokaler Laserscanning-Mikroskopie verfolgt werden (Benincasa et al. 2009). Ein weiteres Experiment mit eukaryotischen Zellen zeigte, dass dieses PrAMP auch die Fähigkeit besitzt, ein nicht-kovalent gebundenes Protein in das Zellinnere zu transportieren (Sadler et al. 2002). Diese Fähigkeit zum transmembranen Transport konnte auch für Insekten-PrAMPs nachgewiesen werden. Fluoreszenzmarkierte Oncocin-Derivate zeigten eine vollständige Aufnahme in die Zelle bereits nach 50 min (Knappe et al. 2011). Ähnlich effizient verhielten sich das native Pyrrolicocin und sein potenteres Dimer A3-APO, für das eine Penetration in dendritische Zellen und Fibroblasten nachgewiesen werden konnte (Otvos et al. 2004). Die Eigenschaft der PrAMPs, sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Membranen zu penetrieren, ist ungewöhnlich und lässt sich durch zwei unterschiedliche Mechanismen erklären: Die simultane Beteiligung von Makropinozytose und direkter Membrantranslokation im ersten Fall und die Nutzung von Membrantransportern im zweiten Fall.

Zusammenfassend lässt sich für die Klasse der PrAMPs sagen, dass sie eine neue, potente Klasse zellpenetrierender Peptide für den intrazellulären Wirkstofftransport darstellen.

Design neuer PrAMPs für die therapeutische Anwendung

Bis zum heutigen Tag konnten keine eindeutigen Beweise für einen direkten Zusammenhang zwischen strukturellen Gruppen der AMPs und deren Wirkmechanismus, dem Aktivitätsumfang oder der Wirtsspezifität aufgezeigt werden. AMPs mit sehr ähnlichen strukturellen Eigenschaften können auf unterschiedlichste Weise wirken oder auch eine unterschiedliche Anzahl von Zellen angreifen (Jensen et al. 2006). Als Beispiel hierfür seien die beiden strukturell sehr ähnlichen AMPs Buforin und Magainin genannt. Buforin interagiert mit DNA und RNA, während Magainin 2 die Zellmembran angreift, was die Lyse der Zelle zur Folge hat (Kobayashi et al. 2000). Auch wenn zu diesem Zeitpunkt noch keine Struktur-basierte Vorhersage der Aktivität, verbunden mit dem *Mode of Action* und dem Wirtsspektrum möglich ist, können einige Designregeln formuliert werden.

Zweifelslos ist die Struktur antimikrobieller Peptide sehr wichtig, ebenso entscheidend nehmen die physikochemischen Parameter wie Größe, Ladung, Hydrophobizität, Amphiphilie und Löslichkeit Einfluss auf die biologische Aktivität und das Wirtsspektrum (Tossi et al. 2000). Änderungen in diesen Parametern lassen eine Modifizierung der Aktivität und des Erregerspektrum der AMPs zu.

Wichtige physikochemische Eigenschaften

- ***Einfluss der Sequenzlänge der Peptide auf ihre biologische Wirkung***

Die Länge der Aminosäuresequenz spielt eine entscheidende Rolle, da mindestens 7-8 Aminosäurereste zur Ausformung amphiphiler Strukturen mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen auf den sich gegenüberliegenden Seite eines Moleküls benötigt werden. Die Anzahl der Aminosäuren für eine α -Helix um eine Lipiddoppelschicht vollständig zu durchspannen, wie es im *Barrel-Stack*-Modell geschieht, beträgt bereits 22 Aminosäurereste, wohingegen für diesen Wirkmechanismus acht Reste für eine β -Faltblattstruktur benötigt werden (Westerhoff et al. 1989). Eine Poly-L-Polypeptid-Helix zur vollständigen Durchspannung der Membran ist aus zehn Resten aufgebaut, was drei Windungen entspricht (Ruggiero et al. 2016). Neben den Effekten, die die Länge auf die 3-D-Struktur und den Wirkmechanismus ausübt,

ist sie oft auch ein entscheidender Parameter hinsichtlich der Zytotoxizität. Beispielsweise besitzt das C-terminal eingekürzte 15mer Melittin (Park et al. 2007) eine ca. 300-fach schwächere Toxizität auf humane und murine Erythrozyten, verglichen mit seiner nativen Form. Daher sollte die Länge beim Design neuer AMPs immer in Verbindung mit einer Änderung der Zytotoxizität betrachtet werden.

- ***Einfluss der Nettoladung der Peptide auf ihre biologische Wirkung***

Die Nettoladung bekannter AMPs, die sich als Summe aller Ladungen ionisierbarer Gruppen der Peptide in der Regel unter physiologischen Bedingungen darstellen lässt, kann sowohl negativ als auch positiv sein und ist in erster Linie für die Interaktion mit der negativ geladenen bakteriellen Zellmembran zuständig. Verändert sich die Nettoladung eines AMPs wirkt sich das auf die antimikrobielle Aktivität aus und hat auch Einfluss auf die Hämolysefähigkeit. Über diesen Parameter kann Einfluss auf die selektive Wirkung gegenüber bestimmten Mikroorganismen genommen werden und der Effekt auf die Wirtszellen gleichzeitig minimiert werden.

Ein Beispiel für das erfolgreiche Design hinsichtlich der Nettoladung stellt das Peptid V13K dar. Das Erhöhen der Nettoladung von +8 auf +9 resultiert in einer höheren Hämolyseaktivität, eine Erniedrigung unter +4 verschlechtert seine Wirkung gegenüber *P.aeruginosa* (Jiang et al. 2008).

- ***Einfluss der Helizität der Peptide auf ihre biologische Wirkung***

Die Helizität beschreibt die Fähigkeit eines AMP eine spiralförmige Struktur ausbilden zu können. Sie besitzt einen bedeutsamen Einfluss bei der Ermittlung der Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen. Eine Reduktion der Helizität durch das Einfügen von D-Aminosäuren zeigte eine Verringerung der Hämolyse bei gleichbleibender antimikrobieller Aktivität (Oren und Shai 1996). Papo *et al.* modifizierten 2002 einige α -helikale Peptide mit 35 % D-Aminosäuren anstelle ihrer L-Antipoden und erzielten so eine vollständige Eliminierung der Hämolyseaktivität. Gleichzeitig steigerten sie die Stabilität gegenüber Proteasen, die eine Spaltung benachbart zu D-Aminosäuren nicht katalysieren können. Diese Experimente zeigten, dass eine Substitution mit D-Aminosäuren sowohl der Hämolyse als auch der Proteolyse entgegenwirken und somit stabilere Derivate mit geringerer Zytotoxizität erzeugt werden können (Papo et al. 2002).

- ***Einfluss der Hydrophobizität auf die biologische Wirkung der Peptide***

Hydrophobizität stellt einen der wichtigsten Parameter für das Design von AMPs dar. Sie beeinflusst sowohl die Aktivität als auch die Selektivität der Moleküle gegenüber dem Wirtsorganismus. Die meisten natürlichen AMPs bestehen zu ca. 50 % aus hydrophoben Aminosäuren (Tossi et al. 2000). In den meisten Fällen führt die Erhöhung der Hydrophobizität an der kationischen Seite eines AMPs zu einem Anstieg der antimikrobiellen Aktivität, wohingegen eine Verminderung in der Regel mit einem Verlust an Aktivität einhergeht (Lee et al. 2002). Es scheint eine optimale Hydrophobizität für jedes AMP zu existieren, unterhalb dieser ein rapider Verlust der Aktivität eintritt (Chen et al. 2007). Einige Studien belegen auch, dass dieser Parameter ebenfalls kritisch im Hinblick auf das Wirtsspektrum eines AMP ist. Ein Anstieg der Hydrophobizität kann zu einer Änderung der Wirtsspezifität führen (Kustanovich et al. 2002; Zelezetsky et al. 2005). Magainin wirkt im nativen Zustand nur gegen gramnegative Bakterien. Einige synthetische Analoga mit erhöhter Hydrophobizität wirken auch gegen grampositive Bakterien und zytotoxisch gegenüber eukaryotischen Zellen (Dathe et al. 1997).

- *Einfluss der Amphiphilie auf die biologische Wirkung der Peptide*

Eine weitere bedeutende physikochemische Eigenschaft stellt die Amphiphilie dar. Sie beeinflusst die Interaktion der Moleküle mit der Membran. Fernandes-Vidal *et al.* zeigten, dass die Amphiphilie verglichen mit der Hydrophobizität entscheidender für die Membranbindung ist (Fernández-Vidal *et al.* 2007). Die amphiphile Struktur hat besonderen Einfluss auf die Stärke der Membraneinlagerung und sollte daher beim Design neuer AMPs besonders berücksichtigt werden, insbesondere beim Modifizieren der AMP hinsichtlich der Wirtsspezifität.

- *Der Einfluss der Löslichkeit der Peptide auf ihre biologische Wirkung*

Da AMPs an der Membranoberfläche agieren oder durch diese translozieren, stellt eine gute Wasserlöslichkeit der AMPs eine essentielle Eigenschaft dar. Aggregieren Moleküle untereinander verlieren sie in der Regel ihre Fähigkeit mit einer Zellmembran zu interagieren. Ein Beispiel stellt eine synthetisches Hydrid-AMP aus Cecropin und Melittin dar, welches dazu neigt Dimere auszubilden. Die Substitution eines einzelnen Lysinrestes in der unpolaren Region des Hybrids verhindert diese Dimerisierung und führt zu einer Reduktion der Hämolyseaktivität. Die Unterbindung der Dimerisierung steigert die Fähigkeit des Peptides sich in mikrobielle Membranen einlagern zu können (Chen *et al.* 2005). Diese Experimente zeigen die Bedeutung der Löslichkeit und den Nutzen für strukturelle Optimierungen. In jüngster Zeit zeigte sich allerdings, dass synthetische Peptide wie A3-APO eine erhöhte Wirkung durch die Bildung von Dimeren aufweisen können (Li *et al.* 2017).

AMP – Modifizierungen

Natürliche AMPs besitzen eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierung (Goumon *et al.* 1996), Methylierung (Hancock und Chapple 1999), Amidierung (Rifflet *et al.* 2012), Glykosylierung (Biswas *et al.* 2017), Disulfidbrücken (Mangoni *et al.* 1996) oder zusätzliche D-Aminosäuren (Kreil 1997). Diese sind für ihre Aktivität von essentieller Bedeutung. In einigen Fällen können diese Modifikationen für das Design neuer AMPs interessant sein, zumal in rekombinanten Zellsystemen die Herstellung dieser modifizierten AMPs ohne weiteres möglich ist. Die Substitution mit D-Aminosäuren hingegen kann in der Regel nur mittels chemischer Synthese realisiert werden.

- *Modifizierungen der AMPs durch kovalente Bindungen*

Kovalente Modifikationen können tiefgreifende Effekte auf die Struktur und die Funktion antimikrobieller Peptide haben. Das Einfügen einer einzelnen Disulfidbrücke kann eine Änderung der Aktivität nach sich ziehen. So führt das Fehlen einer Disulfidbrücke bei Protegrin zum Verlust jeglicher Aktivität (Yasin *et al.* 2000), wohingegen das Einfügen von Disulfidbrücken in Sakacin P eine Steigerung der Aktivität zeigt (Uteng *et al.* 2003). In einer anderen Studie wurde eine Trp-Trp-Bindung in Indolicidin eingefügt (Osapay *et al.* 2000). Diese Modifikation führte zu einer erhöhten Proteasestabilität bei gleichbleibender antimikrobieller Aktivität (AMA). Das Einfügen neuer kovalenter Bindungen zwischen Gln und Lys unter Ausbildung einer Lactambindung in Melittin und Cecropin führte zwar zu einer höheren proteolytischen Stabilität, dies zog aber eine Verringerung der Aktivität beider Peptide nach sich (Houston *et al.* 1998).

- **Modifizierungen der AMPs durch Änderungen der Aminosäurezusammensetzung**

Variationen und Substitutionen in der Aminosäurezusammensetzung ist eine der häufigsten Strategien der AMP-Modifizierungen. In vielen Studien, deren Fokus auf den physiologischen Eigenschaften bestimmter Aminosäuren liegt, konnte gezeigt werden, dass die Aminosäurezusammensetzung eine große Rolle bzgl. der antimikrobiellen Aktivität und des Erregerspektrums spielt. Eine dieser Aminosäuren ist das Prolin. Der Prolinanteil eines AMPs wird in Zusammenhang mit einer erfolgreichen Membrantranslokation gebracht. Ein zu hoher Prolinanteil scheint sich negativ auf die Fähigkeit der Membranpenetration auszuwirken, da die Ausbildung α -helikaler Strukturen erschwert wird (Zhang et al. 1999). In einer weiteren Studie von Nell *et al.* (Nell et al. 2006) wurden im humanen LL-37 neutrale Aminosäuren wie Asparagin und Glutamin durch positive geladene Argininreste ersetzt. Das so erzeugte neue Peptid zeigte eine geringere Zytotoxizität gegenüber eukaryotischen Zellen und konnte erfolgreich bei nasalen MRSA-Infektionen eingesetzt werden (Göblyös et al. 2013).

- **Modifizierungen der AMPs durch Amidierung**

Fortschritte innerhalb der Peptidsynthese machten den Einbau spezieller chemischer Gruppen oder nicht-proteinogener Aminosäuren möglich. Eine dieser Modifikationen ist die C-terminale Addition einer zusätzlichen Amidgruppe. Im Jahr 2011 modifizierten Kim *et al.* das Peptid PMAP-23 durch Amidierung des C-Terminus und zeigten, dass das neue Derivat senkrecht in die Membran einwandert, wohingegen das native PMAP-23 sich parallel zur Membran bewegt. Diese Modifikation führte zu einer zehnfach gesteigerten zellulären Aufnahme, schnelleren Interaktion mit gramnegativen Bakterienmembranen und einem tieferen Eindringen in die Membran. Ebenso wies es bessere Permeabilitätseigenschaften an Liposomen auf (Kim et al. 2011).

C-terminale Modifikationen können auch Einfluss auf die Stabilität eines AMPs nehmen. In einer Studie von Berthold *et al.* wurde die C-terminale Amidgruppe von Api88 durch eine freie Säurefunktion ausgetauscht (Berthold et al. 2013). Dieser Austausch ergab eine Änderung in der AMA, resultierte allerdings in einer 15-fachen Erhöhung der Serumstabilität, eine weitere Substitution von Arg-17 durch L-Ornithin oder L-Homoarginin steigerte die Serumstabilität gegenüber dem ursprünglichen Api88 um das 35-fache. Allerdings führte der Einbau von L-Homoarginin zu einem hohen Verlust der antimikrobiellen Aktivität.

1.3.3 Der Blutegel als Bioressource in der Leitstruktursuche

Wie bereits erwähnt ist in der heutigen Zeit die Entwicklung neuer Substanzen zur Behandlung von bakteriellen Infektionen aufgrund der zunehmenden Anzahl multiresistenter Erreger unabdingbar. Insbesondere die Suche nach Substanzen aus biologischen Quellen spielt dabei eine wichtige Rolle. Eine solche hochinteressante potenzielle Ressource stellt der medizinische Blutegel dar. Er wird seit über 2000 Jahren zur Prophylaxe und Therapie bei vielfältigen Indikationen eingesetzt (Mory et al. 2000). Die ältesten Aufzeichnungen gehen auf den asiatischen Arzt Nicandros von Colophon (200-130 v. Chr.) zurück. Die systematische Therapie wurde bereits 100 v. Chr. von Themison von Laodice eingeführt.

Blutegel leben im Süßwasser und gehören zur Klasse der segmentierten, hermaphroditen, blutsaugenden Würmern. Sie reagieren äußerst empfindlich auf Vibration an der Wasseroberfläche,

sind sensibel gegenüber Berührungen, Lichtveränderungen, Änderungen der Umgebungstemperatur, Geräuschen und reagieren über Chemorezeptoren auf verschiedene chemische Verbindungen. Ihr Körper ist multisegmentiert und besitzt am vorderen Saugnapf auch Hirnareale. Jedes Körpersegment erfüllt unterschiedliche Organfunktionen wie beispielsweise die von Ganglien oder Testikeln. Der Blutegel besitzt zwei Saugnäpfe, welche an Land zur kriechenden Fortbewegung oder auch zum Anheften genutzt werden. Der vordere Saugnapf am Kopf des Egel beherbergt drei Kieferleisten, welche mit jeweils mit ca. 100 kleinen Kalkzähnen versehen sind. Durch Öffnungen in diesen Zähnen bringt der Egel seinen Speichel und damit die wirksamen Substanzen in die Wunde des Wirts ein. Gewöhnlich beißen Egel an eher wärmeren Körperstellen des Wirts und saugen das Blut über eine rhythmische Kontraktion ihres Körpers (Eldor et al. 1996; Singh 2010). Für die Aufnahme von durchschnittlich 10-15 mL einer Blutmahlzeit benötigt der Egel im Schnitt ca. 45 min. Der Verdauung des Blutes erfolgt im Magendarmtrakt mit Hilfe einer Vielzahl an Enzymen und symbiontischen Mikroorganismen wie *Aeromonas spp.* und *Pseudomonas hirudinia* (Herlin et al. 2017).



Abbildung 8: links: Unterschiedliche Färbung der beiden *Hirudo*-Spezies *verbana* und *medicinalis*, gut erkennbar das unterschiedliche Rückenmuster und die Bauchfärbung; rechts: *Hirudo verbana* im natürlichen Lebensraum (Elliott und Kutschera 2011)

Die Blutegeltherapie findet breiten Einsatz im Bereich der rekonstruktiven, plastischen Chirurgie, im Bereich kardiovaskulärer Erkrankungen, Thrombosen, Tinnitus, akuter und chronischer Gelenkentzündungen, insbesondere im Bereich der schmerztherapeutischen Behandlung von Arthrosen (Cherniack 2011; Abdulkader et al. 2013).

Während der Hirudotherapie werden ein oder mehrere Blutegel nach Möglichkeit direkt auf die betroffene Stelle gesetzt. Die pharmazeutisch wirksamen Substanzen werden während des Bisses des Egel über dessen Speichel, die Saliva, direkt in die Wunde appliziert.

Eine Vielzahl von Studien belegen das Vorhandensein mannigfaltiger bioaktiver Moleküle in der Saliva des Egel, allerdings konnten erst ca. zwanzig dieser Moleküle hinsichtlich ihrer Struktur und Wirkung identifiziert werden. Die bereits charakterisierten Moleküle besitzen analgetische, anti-inflammatorische Wirkungen, hemmen die Plättchenaggregation, wirken antikoagulativ und besitzen antimikrobielle Effekte oder degradieren die extrazelluläre Matrix (Abdullah et al. 2012; Singh 2010; Hildebrandt und Lemke 2011; Zaidi et al. 2011). Betrachtet man die Diversität an biologischen Wirkungen und die geringe Anzahl bisher identifizierter Moleküle, wird das enorme Potenzial der Bioressource Blutegel deutlich.

Die oben beschriebenen Wirkungen der Blutegeltherapie lassen sich auf sekretorisch Proteine, welche der Egel nach seinem Biss in die Wunde des Wirts appliziert, zurückführen. Im Speichel des medizinischen Blutegels konnten bisher über proteombasierte Ansätze weit über 100 verschiedene

Proteine nachgewiesen werden, von denen bisher nur wenige in Struktur und Wirkung aufgeklärt sind (Baskova et al. 2008b; Nolte 2011). Die einzelnen Mechanismen können in sechs Kategorien unterteilt werden, welche bezüglich der Hirudotherapie allerdings im Zusammenhang gesehen werden können. Nach dem Biss des Egels muss zunächst durch den Abbau der extrazellulären Matrix ein *Sucking Pathway* generiert werden. Daran schließt sich eine erste Wirkung auf das Blutgerinnungssystem durch die Hemmung der Thrombozytenaggregation und antikoagulative Wirkung einzelner Speichelsubstanzen an. Weitere Wirksubstanzen führen zu einem Anstieg des Blutflusses. Abschließend wirkt sich das Einbringen der Salivakomponenten auf das Immunsystem sowie auf analgetische und antiinflammatorische Effektoren aus.

Tabelle 3: Potentiell bioaktive sekretorische Speichelsubstanzen des medizinischen Blutegels

Wirkmechanismus	Substanz
Analgetische und antiinflammatorische Effekte	Hirustasin, Eglin C, LDTI, Complement C1 Inhibitor, Carboxypeptidase Inhibitor, Bdelline und Bdellastasin
Abbau der extrazellulären Matrix	Hyaluronidase, Collagenase
Vasodilatation	Acetylcholine, Histamin-like-Substance
Thrombozytenaggregations-Hemmung	Saratin, Calin, Apyrase, Decorsin
Antikoagulatorische Effekte	Hirudin, Eglin, Faktor Xa-Inhibitor, Destabilase,
Antimikrobielle Effekte	Destabilase, Peptid B

Bis heute wurde erst eine antimikrobiell wirkende Substanz in der Saliva des medizinischen Blutegels identifiziert, die Destabilase (Abdullah et al. 2012; Zaidi et al. 2011). Das Enzym besitzt neben einer fibrinolytischen Aktivität eine Glykosidase-Aktivität, welche die 1,4-glykosidischen Bindungen in der Peptidoglykanschicht in der bakteriellen Zellwand hydrolysiert und somit die Zellwandsynthese inhibieren kann (Zavalova et al. 2003; Baskova et al. 2011). Diese Aktivität ähnelt der Muramidase-Aktivität, welche sich auch im humanen Speichel und in der Tränenflüssigkeit findet (Franken et al. 1989). Weitere Studien zeigten, dass die antimikrobielle Aktivität nicht alleine auf die enzymatische Aktivität der Destabilase zurückzuführen ist, sondern auch eine nicht-enzymatische Komponenten eine Rolle spielen muss (Zavalova et al. 2006). So zeigten Zavalova et al., dass auch denaturierte Formen des Enzyms eine dosisabhängige bakteriostatische Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* besitzen.

Tasiemski *et al.* identifizierten zwei neue antimikrobielle Peptide in einer der *Hirudinae* verwandten Spezies, dem Enteneigel *Theromyzon tessulatum*. Theromacin und Theromyzin, welche aus dem Coelom der Tiere isoliert und in dessen Flüssigkeit identifiziert wurden (Tasiemski *et al.* 2004).

Theromacin ist ein 75-Aminosäuren langes kationisches AMP. Es besitzt zehn Cysteinreste, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und somit die Ausbildung einer Sekundärstruktur ermöglichen. Theromyzin ist ein 86-Aminosäurereste langes, anionisches, lineares AMP. Beide Peptide zeigen Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien. Ebenso konnten das so genannte Peptid B identifiziert werden, ein weiteres anionisches Peptid, welches aus einem Neuropeptid-Precursor freigesetzt wird und nicht in Körperflüssigkeiten des Egels vorliegt, sondern Teil des Neuroimmunsystems ist.

Aufgrund der Notwendigkeit neuer Leitstrukturen und Substanzklasse im Bereich der antimikrobiellen Chemotherapie und angesichts der große Erfolge der Blutegeltherapie bei der bakterielle Infektionen praktisch nie vorkommen, steht der medizinische Blutegel, beziehungsweise dessen Saliva, als biologische Ressource zur Identifizierung neuer antimikrobiellen Peptide im Fokus unserer Arbeitsgruppe.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung eines neuen antimikrobiellen Peptids (AMP) aus dem Speichel des medizinischen Blutegels *Hirudo verbana*. Nach dessen *De-novo*-Sequenzierung wurde die gefundene Sequenz chemisch synthetisiert und als Leitstruktur für die Entwicklung eines neuen Antibiotikums definiert. Das AMP wurde auf dessen antimikrobielle Wirkung untersucht und außerdem auf sein zytotoxisches Potential an bereits etablierten Zellkulturmodellen getestet. Zur Untersuchung der proteolytischen Stabilität wurde das Peptid mit verschiedenen Proteasen in wässriger Lösung inkubiert. Die für die Wirkstoffentwicklung besonders wichtige Serumstabilität wurde ebenso wie die Resistenz gegenüber künstlichem Magensaft analysiert. Abgeschlossen wurden die Untersuchungen zur Leitstruktur mit einer Testung der antibakteriellen Aktivität in einem *In-vivo*-Gallerienmodell.

In einem zweiten Schritt sollten, nach Verifizierung der Aktivität des synthetischen Peptids, mit Hilfe rationaler Designkonzepte Derivate hergestellt und diese hinsichtlich ihrer antibakteriellen Aktivität optimiert werden. Hierzu sollten zuerst die für die Wirkung kritischen Aminosäurepositionen identifiziert werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden Modifizierungen der N-terminalen sowie der C-terminalen Region durchgeführt. Im Zuge dessen erfolgte die Auswahl neuer Sequenzen durch Änderungen der für AMPs wichtigen physikochemischen Parameter wie Hydrophobizität, hydrophobes Moment und Helizität. Die so modellierten Peptide wurden wiederum mittels Festphasensynthese hergestellt und deren Aktivität überprüft. Diese Ergebnisse sollten erste Daten zu Struktur-Wirkungsbeziehungen liefern. Abgeschlossen wurde dieser zweite Teil mit einer weiteren Studie zur Zytotoxizität der Peptidderivate.

Im letzten Abschnitt der Arbeit sollten erste Daten zum möglichen Wirkmechanismus und zur Targetidentifizierung der Peptide erzeugt werden. Hierzu wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz die Affinität zu möglichen Targets wie den 70S Ribosomen aus *E. coli* untersucht. In weiteren Experimenten wurde die zelluläre Aufnahme der Peptide in lebende Bakterien und die Lokalisation innerhalb der Bakterien untersucht. Hierzu wurden die Leitstruktur sowie ausgewählte Derivate fluoreszenzmarkiert, mit Bakterienzellen inkubiert und mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie untersucht.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Extraktion und Probenvorbereitung der Saliva aus *Hirudo verbana*

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller und Spezifikation
Ultrafreezer	Binder, Serial NR: 20170000011257
Zentrifuge	Sigma, Typ: 2-16 PK
Mikroplate-Reader	Infinite M200Pro, Tecan

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Lösungen

Reagenzien	Hersteller und Spezifikation
Speichel	<i>Hirudo verbana</i> ; Chargen 3-2014; 4-2015, Biebertaler Blutegelzucht GmbH
Natriumchlorid	≥99,5 %, p.a., ACS, ISO, Roth
L-Arginin	≥98,5 %, USP, für die Biochemie, Roth
PBS-Lösung	ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , steril, Biochrom AG
Ultrafiltrationseinheiten	Amicon® Ultra-4 3kDa
	Amicon® Ultra-4 10kDa:
	Amicon® Ultra-4 30kDa
BCA-Assay	Thermo Scintific, Lot: LD143404

3.1.2 Festphasensynthese

Tabelle 6: Verwendete Geräte für die Peptidsynthese

Gerät	Hersteller
Peptidsynthesizer	Liberty Blue™, CEM Liberty Blue Application Software
Zentrifuge	Sigma 2 – 16 PK
Gefriertrocknungsanlage	Christ Alpha 1-4 LD plus
Pumpe	EDWARDS RV12
Kühlfalle	Thermos
Schüttler	Serono Diagnostics, Vibrax
HPLC	Agilent Technologies 1100 Series Software: Chemstation Version Rev. B.04.01 [481]
RP-HPLC Säulen	Phenomenex®: -Aeris™ 2,6 µm Peptide XB-C18 100 Å LC Column 150 x 2,1 mm -Synergi™ 2,5 µm Max-RP 100 Å LC Colum 100 x 2 mm
FPLC mit Fraktionssammler	Äkta pure Software: Unicorn 7.2
FPLC-Säule	Resource™ RPC
Waagen	Mettler Toledo, XP404S, d = 0,1 mg Mettler Toledo, XP56, d = 0,001 mg
Glasfritte	Schott
Gefrierschrank	Binder (-80 °C)

Tabelle 7: Verwendete Reagenzien und Lösungen für die Peptidsynthese

Reagenzien	Hersteller und Spezifikation
N,N-Dimethylformamid (DMF)	≥99,8 %, für die Peptidsynthese, Carl Roth GmbH+Co. KG
Piperidin	≥99,5 %, für die Peptidsynthese, Carl Roth GmbH+Co. KG
N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC)	≥99 %, Carl Roth GmbH+Co. KG
Hydroxyiminocyanoessigsäureethylester - Oxyma Pure	Novabiochem®, Merck KGaA
Trifluoressigsäure (TFA)	≥99,9 % zur (Peptid-)Synthese, Carl Roth GmbH+Co. KG
Triisopropylsilan (TIS)	zur Synthese, Merck
Diethylether	≥99,5 % zur Synthese, Carl Roth GmbH+Co. KG
Acetonitril	ROTISOLV® Ultra Gradient Grade >99,9 %, Roth

Tabelle 8: Verwendete Aminosäuremonomere

Aminosäuren	Hersteller und Spezifikation
Alanin (A)	Fmoc-Ala-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Arginin (R)	Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
D-Arginin (r)	Fmoc-D-Arg(PBF)-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Asparaginsäure (D)	Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Cystein (C)	Fmoc-Cys(Trt)-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Glutamin (Q)	Fmoc-Gln(Trt)-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Glutaminsäure (E)	Fmoc-Glu(otBu)-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Glycin (G)	Fmoc-Gly-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Histidin (H)	Fmoc-His(Trt)-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Isoleucin (I)	Fmoc-Ile-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Leucin (L)	Fmoc-Leu-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Lysin (K)	Fmoc-Lys(Boc)-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Methionin (M)	Fmoc-Met-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Phenylalanin (F)	Fmoc-Phe-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Prolin (P)	Fmoc-Pro-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Tryptophan (W)	Fmoc-Trp(Boc)-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Tyrosin (Y)	Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Novabiochem®, Merck KGaA
Valin (V)	Fmoc-Val-OH, Novabiochem®, Merck KGaA

Tabelle 9: Eingesetzte Harze für die Synthese aller Peptide

Harz mit Aminosäure	Hersteller und Spezifikation
Alanin	Fmoc-Ala-Wang resin, Novabiochem®, Merck KGaA
Arginin	Fmoc-Arg(Pbf)-Wang resin, Novabiochem®, Merck KGaA
Cystein	Fmoc-Cys(Trt)-Wang resin, Novabiochem®, Merck KGaA
Glutamin	Fmoc-Gln(Trt)-Wang resin, Novabiochem®, Merck KGaA
Glutaminsäure	Fmoc-Glu(OtBu)-Wang resin, Novabiochem®, Merck KGaA
Leucin	Fmoc-Leu-Wang resin, Novabiochem®, Merck KGaA
Lysin	Fmoc-Lys(Boc)-Wang resin, Novabiochem®, Merck KGaA
Prolin	Fmoc-Pro-Wang resin, Novabiochem®, Merck KGaA
Rink Amide resin	Novabiochem®, Merck KGaA

3.1.3 Rationale Designkonzepte

Tabelle 10: Eingesetzte Softwaretools für das rationale Design neuer Derivate von HP01

Software	Hersteller und Spezifikation
HeliQuest	HeliQuest v1.2, http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/
CellPPD	https://webs.iitd.edu.in/raghava/cellppd/index.html

3.1.4 LC-MS/MS und De-novo-Peptidsequenzierung

Tabelle 11: Genutzte Geräte für die LC-MS/MS-Messungen und die De-novo-Peptidsequenzierung

Gerät	Hersteller und Spezifikation
nanoLC	Proxeon easy nLC 800
Säule:	L= 15 cm, ID= 75 µm, resin: Reprosil-Pur C18-AQ, 3 µm
MS/MS	LTQ Orbitrap Velos

Tabelle 12: Eingesetzte Software

Software	Hersteller und Spezifikation
AndromedaConfig	MPI Martinsried, Version 1.2.2.9
Blast+	NCBI, Version 2.2.25
MaxQuant	MPI Martinsried, Version 1.2.2.9
MaxQuant Viewer	MPI Martinsried, Version 1.2.2.9

Tabelle 13: Genutzte Chemikalien

Reagenzien	Hersteller und Spezifikation
Eisessig	ROTIPURAN®, 100 % p.a., Roth
Methanol	HPLC-Grade, Sigma Aldrich
Acetonitril	ROTISOLV® Ultra Gradient Grade >99,9 %, Roth

3.1.5 Oberflächenplasmonresonanzspektrometrie

Tabelle 14: Eingesetzte Geräte der SPR-Versuche

Gerät	Hersteller und Spezifikation
SPR System	Reichert Technologies, Serialnr: 00144-0209
SR7500DC	Refractive Index Range: 1.33 to 1.42 (@ 780 nm)
	Refractive Index Resolution: < 0.3 μ RIU
	Temperature Control Range: 10 °C below ambient to 70 °C (with resolution \pm 0.01 °C)
SR8500	Syringe Pump; 250 μ L Syringe
	Flowrate accuracy: +/- 1.0 % at 0.1 to 125 μ L/min
	> +/- 1.0 % at > 125 μ L
SR8300	Semi Automatic Valve
SR8600	Diverter Valve
SR7120	Autosampler

Tabelle 15: Chemikalien und Lösungen für die Oberflächenplasmonresonanz

Reagenzien	Hersteller und Spezifikation
Desorb 1	0,5 % SDS, XanTec bioanalytics GmbH
Desorb 2	50 mM Glycin-HCl, XanTec bioanalytics GmbH
EDC	≥ 99,0 % (AT), Sigma, Lot: BCBW1437
NHS	Pierce, Rockford, Illinois, Lot: 97052767
Na-Acetat	≥99 %, wasserfrei, Roth, Lot:034209050
Ethanolamin	≥99 %, zur Synthese, Roth
HEPES	PUFFERAN® >99,5 %, Buffer Grade, Roth, Lot: 043185959
KCl	>99,8 %, Roth
MgCl ₂	≥98,5 %, wasserfrei, Roth
HCl	2 M, Roth, Lot: 311175162
NaOH	2 M, Roth, Lot: 1791737
Glycin	Roth, Lot: 086240456
Ethanol	ROTIPURAN®, 100 % p.a., Roth
Sensorchips	CMD500M, 12 x 12 x 0,3 mm 500 nm carboxymethyldextran hydrogel, medium density for medium and low MW analysts; Lot: CMD500M1218.a

Tabelle 16: Software zur SPR

Software	Hersteller und Spezifikation
Integrated SPRAutolink	Reichert Inc., Version 1.1.8-0
Scrubber™	Biologic Software, Version 2.0

3.1.6 Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)

Tabelle 17: Geräteliste für die Untersuchungen zur zellulären Aufnahme der FITC-Peptide

Gerät	Hersteller und Spezifikation
HPLC	Agilent Technologies 1100 Series
	Software: Chemstation Version Rev. B.04.01 [481]
Säulen	Phenomenex®:
	-Aeris™ 2,6 µm Peptide XB-C18 100 Å LC Column 150 x 2,1 mm
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf
Zentrifuge	Eppendorf, 5424
Sicherheitswerkbank	Steril-VBH, VBH Compact
CLSM	Konfokales Laserscanning Microscope LSM 700, Zeiss
	Laser: 488 nm
	Detektor: variable secondary dichroic (VSD) Beamsplitter

Tabelle 18: Reagenzien für die CLSM-Versuche

Reagenzien	Hersteller und Spezifikation
Na ₂ HPO ₄	≥99 %, p.a. ACS, wasserfrei, Roth, Lot: 2321174784
NaH ₂ PO ₄	≥98 %, p.a. ACS, Roth, Lot: 244215280
NH ₄ Cl	≥99,7 %, p.a., Ultra Qualität
DMSO	ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a., Roth
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanate (FITC 'Isomer I'), Invitrogen
LB Medium	Roth, Lot: 086240456
PFA	Paraformaldehyd, reinst, Roth
PBS	ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , steril, Biochrom AG
Objektträger	Mikroskopobjektträger, geschliffen aus optischem Glas, Brand
Deckgläser	für Mikroskop-Objektträger, Borosilikatglas, Brand

3.1.7 Proteolytische Stabilitätsuntersuchungen

Tabelle 19: Eingesetzte Geräte

Gerät	Hersteller und Spezifikation
HPLC	Agilent Technologies 1100 Series
	Software: Chemstation Version Rev. B.04.01 [481]
Säulen	EC 125/3 Nucleodur 100-3 C18ec, Macherey&Nagel
Vorsäule	EC 4/3 Nucleodur 300-5 C18 ec
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf
Zentrifuge	Eppendorf, 5424
pH Meter	Seven Excellence Multiparameter, Mettler Toledo
Waage	XP 205 Excellence Plus, d=0,01 mg, Mettler-Toledo
Waage	XP 56 Excellence Plus, d=0,001 mg, Mettler-Toledo
SpeedVac	RVC 2-25 CD plus, Christ

Tabelle 20: Chemikalien und Enzyme für die Stabilitätsuntersuchungen

Reagenzien	Hersteller und Spezifikation
Aceton	≥99,5 % p.A., Roth
Acetonitril	ROTISOLV® HPLC Grade, Roth
Ammoniak	28 %, VWR
NH ₄ HCO ₃	ReagentPlus®, ≥99 %, Sigma-Aldrich
CaCl ₂	anhydrous granular, Merck
Chymotrypsin	>1000 USP-U/mg, Roth
Collagenase	from <i>Clostridium histolyticum</i> , ≥10 U/mg, Sigma-Aldrich
DMSO	ROTIPURAN® ≥99,8 % p.a., Roth
Na ₂ HPO ₄	≥99 %, p.a. ACS, wasserfrei, Roth
DTT	Dithiothreitol, ≥99 %, p.a., Roth
Essigsäure	ROTIPURAN® 100 % p.a., Roth
EDTA	≥99 %, Fluka
KCl	≥99,5 %, p.a. ACS, ISO, Roth
KH ₂ PO ₄	≥99 %, p.a.ACS, Roth

Na-Acetat	krist., zur Analyse, Merck
NaCl	≥99,8 % Merck
Papain	from Papaya latex, 23 U/mg, Sigma-Aldrich
Pepsin	from Porcine gastric mucosa, ≥2500 U/mg, Sigma-Aldrich
Proteinase K	≥30 U/mg; Roth
HCl	32 %, reinst, Roth
Thrombin	63 U/mg, solid 125 U/mg protein, Sigma-Aldrich
TCA	Trichloressigsäure, ≥99 %, reinst, Roth
TFA	Trifluoressigsäure, ≥99,9 % zur (Peptid)Synthese, Roth
TRIS	PUFFERAN®, ≥99,9 % p.a., Roth
Trypsin	≥2500 USP-U/mg, krist., Roth
Urokinase	from human urine, 395 U/mg, Sigma-Aldrich
Vollblut	

3.1.8 Antimikrobielle Aktivität mittels Mikrodilution

Tabelle 21: Geräteliste zur Bestimmung der Antimikrobiellen Aktivität

Gerät	Hersteller und Spezifikation
Kulturschüttler	IKA® KS4000 i-control, FIRMA
Mikroplattenreader	Infinite M200Pro, Tecan
Sicherheitswerkbank	Steril-VBH, VBH Compact
Autoclav	VX-150, Systec GmbH Linden

Tabelle 22: Chemikalien und Reagenzienliste

Reagenzien	Hersteller und Spezifikation
PBS	ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , steril, Biochrom AG
MHB	Müller-Hinton-Boullion, Roth
Vancomycin	Vancomycin-Hydrochlorid, CELLPURE® ≥900 U/mg, Roth
Gentamycin	Gentamycinsulfat, ≥590 I.U./mg, für die Biochemie, Roth
MT-Plates	Rotilabo®-Mikrotestplatten, 96-well, U-Form, Roth

Tabelle 23: Liste der getesteten Mikroorganismen

Stämme	Lieferant und Spezifikation
<i>E. coli</i> K12	ATCC 25404
<i>E. coli</i> BL21	New England Biolabs, <i>E. coli</i> BL21(D3)
<i>M. luteus</i>	ATCC 4698
IHIT 19222	<i>K. pneumoniae</i> , humanpathogen, KPC-2, SHV-11
IHIT 19255	<i>K. pneumoniae</i> , humanpathogen, OXA-48, CTX-M15

3.1.9 *In-vivo*-Galerienmodell

Tabelle 24: Eingesetzte Geräte

Gerät	Hersteller und Spezifikation
Inkubator	Hereaus B6060, Hereaus Instruments Hanau
Vortexer	Vortex-GENIE 2 Scintific Industries
Schüttelinkubator	IKA KS4000 I controlled, IKA-Werke
Zentrifuge	Eppendorf, 5424
Spektrometer	Ultraspec 10 Cell density meter, Biochrom AG
Mikroapplikator	Manual Syringe Pump Subassy, WPI
Injektionsnadel	D=0,2 mm, 1 mL, Braun

Tabelle 25: Chemikalien und Lösungen zur Durchführung der in vivo Experimente

Reagenzien	Hersteller und Spezifikation
LB Medium	Roth, Lot: 086240456
Cefotaxim	Cefotaxmin-Sodium salt, plant cell culture tested, BioReagent, Sigma-Aldrich
0,9% NaCl	steril, Braun
Galerien	<i>Galleria mellonella</i> von Galleria food, Fauna topics GmbH
Petrischalen	145x20 mm, Greiner bio-One international

3.1.10 Methoden der Zellkulturtechnik

Tabelle 26: Genutzte Geräte in der Zellkultur

Gerät	Hersteller und Spezifikation
Zentrifuge	Eppendorf, 5804R
Rotor	A-4-44
Pipetus	Accu-jet pro, Brand
CO ₂ Inkubator	CO2 Cell, MMM
Laminar Flow	Heto-Holton A/S LaminAir, Typ: S-2010 1.2
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved: Bright line, Assistent Germany
Mikroplatten-Reader	Infinite M200Pro, Tecan

Tabelle 27: Chemikalien, Reagenzien und Lösungen für die Zellkultur

Reagenzien	Hersteller und Spezifikation
HeLa Zellline	ATCC CCC-2.1 Lot: 700 127 10
FKS	Fetals Kälberserum, hitzeinaktiviert, Sigma-Aldrich
Glutamin	Glutamin 200 mM, PAA-the Cell Culture Company, Lot: M00411-3428
DMSO	ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a., Roth
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin, flüssig, 10.000 U/mL / 10.000 µg/mL, Biochrom AG
PBS	ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , steril, Biochrom AG
DMEM	DMEM Flüssigmedium ohne L-Glutamin, mit 3,7 g/L NaHCO ₃ , mit 4,5 g/L D-Glukose, Biochrom AG
Trypanblau	Trypanblaulösung, Biochrom AG
Trypsin/EDTA	Trypsin (1:250)/EDTA (0,25 %/0,02 %), in PBS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Biochrom AG
Testplatten	24-Well-Platten, flacher Boden, behandelt für verbesserte Zellhaftung, VWR
MTT	Thiazolylblau, ≥98 %, für die Biochemie, Roth
DOX	Doxorubicin hydrochloride, Merck
SDS	Sodiumdodecylsulfat, ≥99 %, für die Biochemie, Roth

Tabelle 28: Zusammensetzung des Mediums

Reagenz	Konzentration / Volumen (für 500 mL)
FKS hitzeinaktiviert	10 % / 50 mL
200mM Glutamin	4 mM / 10 mL
Pen/Strep	1 % / 5 mL
DMEM	add 100 % / 435 mL

3.2 Methoden

3.2.1 Extraktion und Probenvorbereitung der Saliva aus *Hirudo verbana*

Der Speichel (Saliva) von Blutegeln wurde von der Biebertaler Blutegelzucht GmbH zur Verfügung gestellt. Es wurde lediglich Speichel von Tieren mit einer Quarantänezeit von mindestens acht Monaten genutzt, um den vollständigen Verdau der letzten Blutmahlzeit gewährleisten zu können. Die Saliva von insgesamt 100 Tieren wurden gepoolt, sterilfiltriert und schließlich zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

- Ultrafiltration

Zur Aufreinigung und Auftrennung der sterilen Saliva in insgesamt vier Molekulargewichtsfractionen wurden 300 mL der Saliva lyophilisiert und anschließend in 20 mL steriler PBS-Lösung resuspendiert. 16 mL des so aufkonzentrierten Speichels wurden nun über Amicon® Ultra-4 Zentrifugeneinheiten aufgetrennt. Genutzt wurden insgesamt drei unterschiedliche Zentrifugeneinheiten mit einem nominellen Cutoff von 3 kDa, 10 kDa und 30 kDa. Das Fraktionierungsschema ist in Abbildung 9 dargestellt.

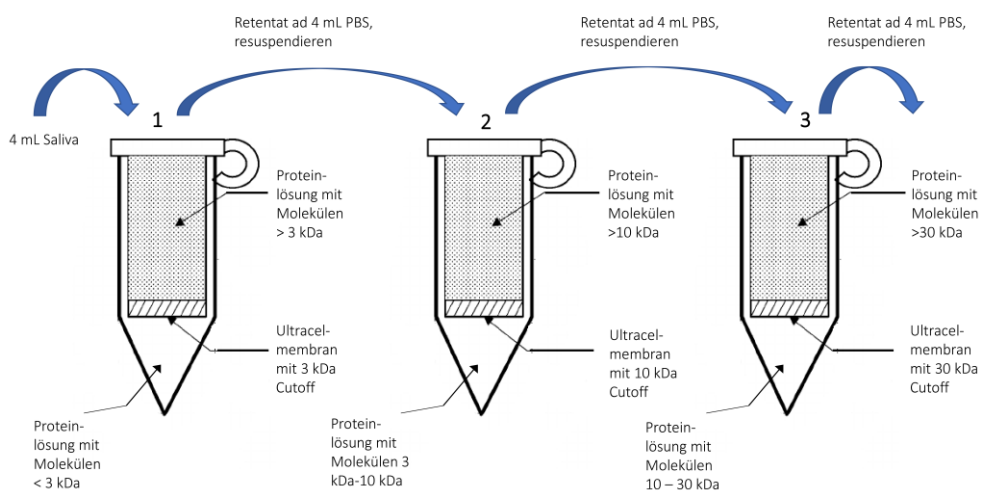


Abbildung 9: Schema zur Gewinnung der Molekulargewichtsfractionen der Saliva über Amico® Ultra-4 Zentrifugeneinheiten.

Es wurden 4 mL Saliva in die Filtereinheit pipettiert und für 20 min bei 4.000*g zentrifugiert. Das Filtrat wurde entnommen, auf Eis gelagert und das Retentat mit PBS auf 4 mL aufgefüllt. Abschließend wurde das Retentat gut auf der Zellulosemembran resuspendiert und in die nächste Filtereinheit überführt. Dieses Verfahren wurde bei allen Proben von 3 kDa bis 30 kDa angewendet. Die erhaltenen Fraktionen wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

- **Proteinbestimmung mittels Bicinchonin Acid Assay (BCA)**

Der Bicinchonin acid Assay (BCA) wurde entsprechend der Anleitung von Thermo Fisher für das Kit BCA Test (Lot. LD143404 Thermo Scientific) durchgeführt. Die Reagenzien für die Arbeitslösung wurden in einem A:B:C-Verhältnis (vol/vol/vol) von 12/12,5/0,5 angesetzt. Die Kalibriergerade wurde mit acht Standards aus bovinem Serumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 0,1-100 µg/mL als Dreifachbestimmung erstellt. Die Extinktionswerte der Standards und Proben wurden mit einem Tecan Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge $\lambda=551$ nm vermessen. Aus der linearen Regressionsrechnung erfolgte die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Salivaproben.

3.2.2 Synthesechemie

3.2.2.1 Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Theorie:

Das Prinzip der SPPS wurde 1963 von Bruce Merrifield etabliert und beruht auf einem schrittweisen Anknüpfen von Aminosäuren (AS) an einen polymeren Träger zu einer gewünschten Aminosäuresequenz. Synthetisiert wird bei der SPPS, entgegen der biologischen Synthese, vom C- zum N-Terminus. Alle verwendeten AS sind sowohl mit einer temporären α -Amino- als auch mit Seitenkettenschutzgruppen versehen, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden. Die am häufigsten verwendeten α -Aminoschutzgruppen in der SPPS sind die Boc- (t-Butyloxycarbonyl) und die Fmoc-(9-Fluoromethyloxycarbonyl)-Gruppe. Die Boc-Schutzgruppe kann unter sauren Bedingungen abgespalten werden, während Fmoc-Gruppe basenlabil ist (Palomo 2014a).

Die erste Aminosäure wird hierbei kovalent mittels Linker an einen unlöslichen polymeren Träger (üblicherweise aus Polystyrol (PS)) gebunden. Nach Entfernung der α -Aminoschutzgruppe der ersten polymergebundenen AS wird die nächste geschützte AS hinzugegeben. Aktivierungsreagenzien werden der Reaktionsmischung zugeführt, damit sich eine Peptidbindung zwischen den beiden AS ausbilden kann (El-Faham und Albericio 2011). Dieser Additionszyklus wird bis zur gewünschten Kettenlänge fortgesetzt. Überschüssige, lösliche Reagenzien werden nach jedem Kopplungsschritt durch einfaches Waschen und Filtrieren entfernt, während die wachsende Peptidkette im Reaktionsgefäß verbleibt. Sobald die Kettenverlängerung abgeschlossen ist, wird das Peptid durch Zugabe von Spaltungsreagenzien vom Harz gelöst und die Seitenkettenschutzgruppen abgespalten. Das allgemeine Schema einer Fmoc-SPPS ist im Folgenden graphisch dargestellt (Abbildung 10).

Im Jahr 1970 führte Carpino die Fmoc-Gruppe als α -Aminoschutzgruppe für die SPPS ein. Im Gegensatz zur säurelabilen Boc-Gruppe lässt sich diese Schutzgruppe durch die Zugabe von Basen abspalten. Dieses wird in der Regel mit Piperidin realisiert (Palomo 2014b). Piperidin führt einen nucleophilen Angriff auf das Wasserstoffatom am α -Kohlenstoff der Fmoc-Gruppe durch. Der nachfolgende β -

Eliminierungsschritt führt unter Decarboxylierung zu einer Entschützung der Aminogruppe. Als Nebenprodukt entsteht ein reaktives Dibenzofulven, welches in unerwünschter Weise wieder zur Verkappung von entschützten Aminogruppen führen kann. Um dies möglichst zu vermeiden, wird das Piperidin im Überschuss eingesetzt, da dieses die reaktiven in nicht-reaktive Dibenzofulvene überführt. Das bei so genannten Verkappung entstehende Produkt wird bei den Waschschrritten ausgespült und kann zusätzlich durch Messung der UV-Absorption bei 301 nm nachgewiesen werden (Abbildung 12). Dies stellt einen nützlichen Indikator für den Syntheserfolg dar (Behrendt et al. 2016; Palomo 2014a). Der beschriebene Entschützungsmechanismus der Fmoc-Gruppe ist in Abbildung 11 dargestellt.

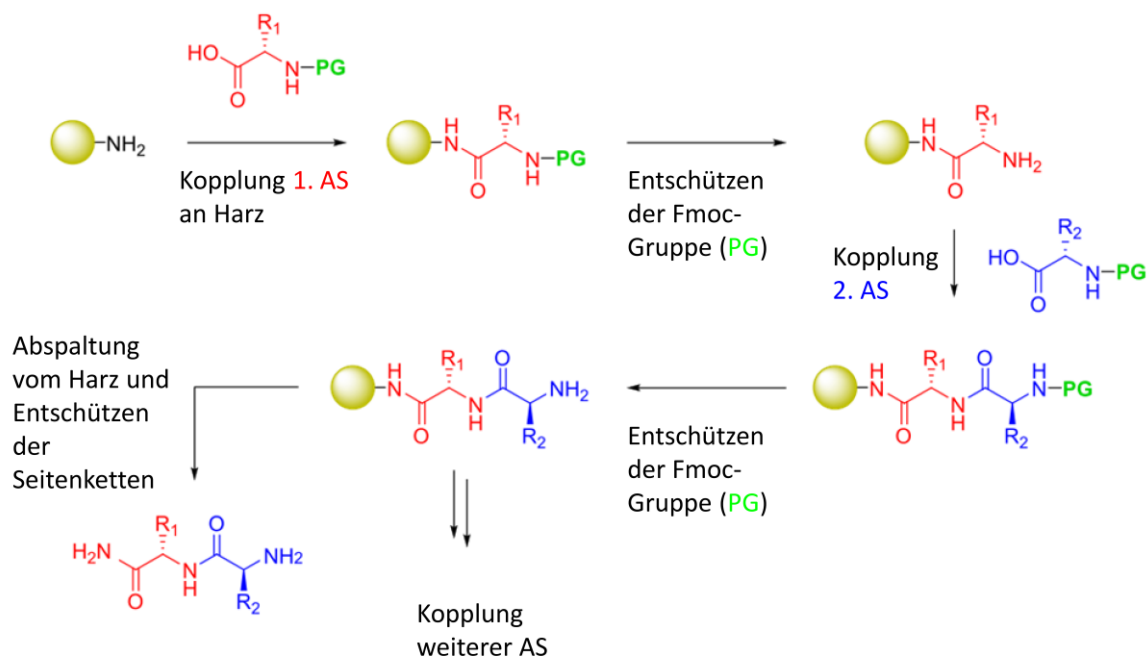


Abbildung 10: Schema der Festphasenpeptidsynthese

Ein großer Unterschied zur Boc-SPPS ist, dass der Entschützungsmechanismus bei der Fmoc-SPPS orthogonal erfolgen kann. Bei der Fmoc-SPPS werden oftmals *tert*-Butyl(tBu)-Seitenkettenschutzgruppen und Hydroxymethylphenoxy-Linker eingesetzt. Somit kann die Entfernung der Fmoc-Gruppe durch Basen erfolgen, wohingegen zur Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und zur Freisetzung des Peptids vom Harz eine Säure (Trifluoressigsäure; TFA) verwendet wird. Durch diese milderen Entschützungsbedingungen ist die Synthese von posttranslational modifizierten Peptiden (z.B. Glykosylierung oder Phosphorylierung) möglich, denn viele Modifikationen sind labil gegenüber HF-Spaltungsbedingungen (Behrendt et al. 2016).

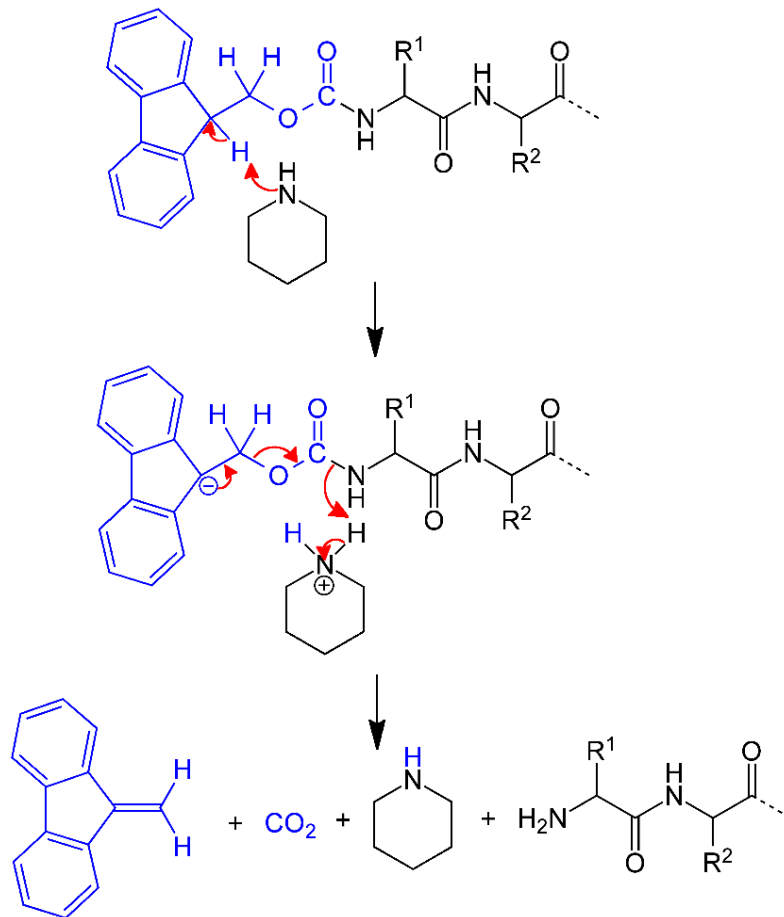


Abbildung 11: Entschützungsmechanismus der Fmoc α-Aminoschutzgruppe

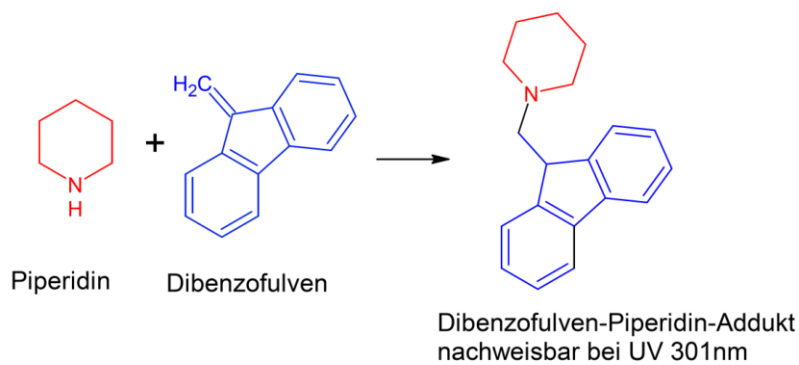


Abbildung 12: Bildung des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts während der Entschützungsreaktion der Fmoc-Gruppe

- Seitenkettenschutzgruppen

Die Auswahl der richtigen Seitenkettenschutzgruppe ist ein wichtiger Schritt für eine hohe Ausbeute bei der Peptidsynthese. Um eine orthogonale Abspaltung der Schutzgruppen zu ermöglichen, werden bei der Fmoc SPPS häufig säurelabile Seitenkettenschutzgruppen wie zum Beispiel tert-Butyl (tBu)

eingesetzt (Palomo 2014b). Doch nicht für alle AS stellt die tBu-Seitenkettenschutzgruppe eine optimale Schutzgruppe dar. Beispielsweise eignet sich die 2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)-Gruppe besser als Schutzgruppe für Arg und die Trityl(Trt)-Gruppe für Cys, Asn, Gln und His (Pedersen et al. 2012), wobei für jede einzelne AS ein Repertoire an verschiedenen Seitenkettenschutzgruppen existiert (Palomo 2014a). Nach Beenden der Synthese werden die Seitenkettenschutzgruppe durch eine *Cleavage*-Lösung abgespalten. Dabei sind die Spaltungsbedingungen von der jeweiligen AS und der entsprechenden Seitenkettenschutzgruppe abhängig (Isidro-Llobet et al. 2009).

- **Peptidkopplung –Aktivierungsreagentien**

Die Bildung einer Peptidbindung bzw. Amidbindung zwischen zwei AS wird als Kopplung bezeichnet. In der Natur wird diese Peptidbindungsbildung von Enzymen katalysiert. Damit in der SPPS eine Kopplung zwischen zwei AS stattfinden kann, werden Aktivierungsreagenzien benötigt, die eine Aktivierung der Carboxylgruppe einer AS gewährleisten. Durch einen nucleophilen Angriff der Aminogruppe einer zweiten AS auf die Carboxylgruppe der aktivierten AS entsteht die Peptidbindung (Palomo 2014b). Die in der Peptidsynthese am häufigsten verwendeten Aktivierungsreagenzien sind Carbodiimide, wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und das verwandte N,N-Diisopropylcarbodiimid (DIC). DIC weist jedoch vorteilhaftere Eigenschaften auf und ist somit das am häufigsten verwendete Aktivierungsreagenz. Carbodiimide enthalten zwei leicht basische Stickstoffatome, welche mit der Carboxylgruppe einer AS reagieren und so einen O-Acylisoharnstoff bilden. Dieser ist sehr reaktiv und reagiert somit leicht mit der Aminogruppe einer anderen AS zu einer Peptidbindung (El-Faham und Albericio 2011). In der nachfolgenden Abbildung 13 ist die Peptidbindungsbildung unter Verwendung von Carbodiimiden dargestellt.

Durch die hohe Reaktivität des O-Acylisoharnstoffs können neben der direkten Peptidbindungsbildung auch andere Reaktionen, wie in Abbildung 13 gezeigt, stattfinden. Diese können, über die Entstehung von Zwischenprodukten, ebenfalls zur Peptidbindung oder aber auch in eine Sackgasse führen. Ein nicht nutzbares Nebenprodukt stellt der N-Acylharnstoff dar. Diese Umlagerung findet, bedingt durch die hohe Reaktivität des O-Acylisoharnstoffs, statt. Dieser entsteht durch eine Umlagerung des O-Acylisoharnstoffs, bedingt durch dessen hohe Reaktivität. Die Oxazolombildung geschieht durch Cyclisierung des O-Acylisoharnstoffs. Dieses Zwischenprodukt führt trotz allem zu einer Peptidbindung, ist aber weniger reaktiv als die direkte Kopplung. Liegen AS im Überschuss vor, so fördert dies die symmetrische Anhydridbildung. Auch diese führt zur Ausbildung einer Peptidbindung, allerdings wird hier ein zusätzliches AS-Äquivalent verbraucht (El-Faham und Albericio 2011).

Eine signifikante Effizienzsteigerung der Carbodiimide kann durch die Zugabe von Aktivatorbasen wie z.B. 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) oder Hydroxyiminocyanoessigsäureethylester wie Oxyma erreicht werden. Eine Zugabe dieser Additive kann die Racemisierung unterdrücken und beschleunigt zudem die Kopplung. Beispielsweise führt HOBt zur Protonierung des O-Acylisoharnstoffs, was die Entstehung des N-Acylisoharnstoffs verhindert und zur Entstehung eines aktiven Esters führt (El-Faham und Albericio 2011).

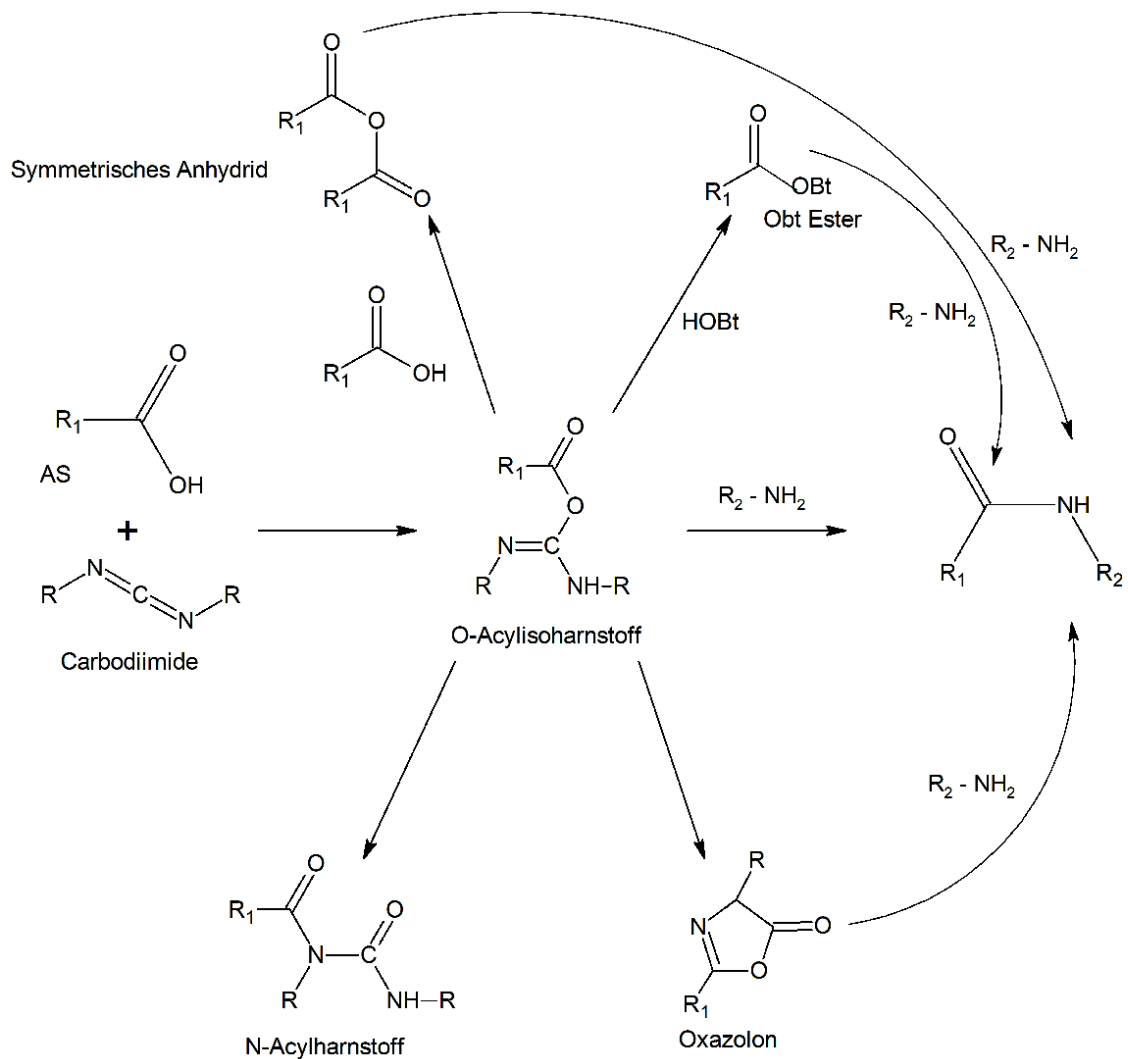


Abbildung 13: Mechanismus der Aktivierung der Carboxylgruppe einer Aminosäure durch Carbodiimide zur Ausbildung einer Peptidbindung

Neben den Carbodiimiden können auch andere Aktivierungsreagenzien, wie Phosphonium- oder Uroniumsalze eingesetzt werden. Beispiele solcher Substanzen sind Benzotriazol-1-yl-oxypyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) und O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU). El-Faham und Albericio postulieren für diese Stoffe eine noch schnellere Kopplungskinetik verglichen mit den konventionellen Aktivierungsreagenzien.

- **Cleavage – Seitenkettenabspaltung und Peptidfreisetzung**

Die erfolgreiche Synthese der Peptide stellt nur einen Teil der Herausforderung der SPPS dar. Nach dem Beenden der Synthese gilt es das Peptid vom Harz und von den Seitenkettenschutzgruppen zu trennen. Da bei der Fmoc-SPPS überwiegend Linker und Seitenkettenschutzgruppen eingesetzt werden, die säurelabil sind, kann die Abspaltung der Schutzgruppen der Seitenketten und die Freisetzung des Peptids vom Harz durch einen einzigen Schritt erfolgen. Als Spaltungsreagenz wird üblicherweise Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Zusätzlich werden verschiedene Carbokationenfänger (*Scavenger*)

zugesetzt, um das Wiedereinbringen der gespaltenen Schutzgruppen in die Reaktion zu verhindern (Guillier et al. 2000). Je nach Sequenz bzw. Seitenkettenschutzgruppen variieren die zugesetzten Carbokationenfänger. Beispiele für Carbokationenfänger sind Wasser, Triisopropylsilan (TIS), Ethandithiol (EDT) und Thiosanisol. Die Inkubationszeit der *Cleavage*-Reaktion ist abhängig von der Sequenzlänge, den verwendeten Seitenkettenschutzgruppen sowie den eingesetzten Harzen.

Die Entfernung des abgespaltenen Harzes erfolgt über Filtration. Die Carbokationenfänger sowie die abgespaltenen Schutzgruppen werden durch Etherpräzipitation des Peptids von diesem abgetrennt.

- **Aufreinigung und Analyse von synthetischen Peptiden**

Die Peptidaufreinigung wird standardmäßig mit der Umkehrphasen – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: *Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC)) durchgeführt. Alternativ gegebenenfalls auch in Kombination kann eine Ionenaustausch- oder Gelfiltrationschromatographie eingesetzt werden, um die gewünschten Peptidprodukte zu isolieren. Die molekulare Masse der Produkte kann mit Hilfe der Matrixunterstützten Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion (MALDI-TOF-MS) schnell und genau untersucht werden (Stawikowski und Fields 2012).

Durchführung:

Die Synthese der Leitstruktur sowie aller Derivate wurde mittels vollautomatischer, mikrowellengestützter Festphasenpeptidsynthese im Peptid-Synthesizer Liberty Blue™ der Firma CEM durchgeführt.

Dafür wurde zunächst die gewünschte AS-Sequenz, die Art und Funktionalität des eingesetzten Harzes und der Ablauf der Synthese manuell in die Software eingegeben. Der Synthesemaßstab wurde auf 0,1 mM festgelegt, die AS wurden in einer Konzentration von 0,2 M eingesetzt. Das Standardprotokoll zur Kopplung von Aminosäuren ist in Tabelle 29 zu sehen, das Protokoll zur Kopplung der Aminosäure Arginin ist in Tabelle 30 aufgeführt.

Über die manuellen Eingaben wurden von der Software der Liberty Blue™ die benötigten Mengen an AS, Aktivatoren, Deprotection-Lösung, Harz und Lösungsmittel berechnet. Anhand dieser Angaben wurden die benötigten Lösungen hergestellt. Die AS sowie die Aktivatoren (DIC/Oxyma) wurden in Dimethylformamid (DMF) (wasserfrei) gelöst. Die Deprotection-Lösung bestand aus 20 % Piperidin in DMF und als Lösungsmittel für die Waschschrte wurde ebenfalls DMF verwendet. Das mit der ersten AS vorgekoppelte Harz wurde abgewogen und in das Reaktionsgefäß des Peptid-Synthesizers überführt. Alle hergestellten Lösungen wurden in den dafür vorgesehenen Behältnissen am Gerät angebracht und die vollautomatische Synthese gestartet. Nach Ende der Synthese wurde das Reaktionsgefäß, in dem sich das an das Harz gekoppelte Peptid befand, aus der Anlage entnommen und zweimal mit DMF und dreimal mit Dichlormethan (DCM) gespült. Das Syntheseprodukt wurde in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und über Nacht durch Lyophilisation getrocknet.

Tabelle 29: Allgemeines Kopplungsprotokoll für Aminosäuren des Peptidsynthesizers Liberty Blue™

Schritt	Syntheseablauf	Wichtige Parameter
1	Quellen des Harzes	10 mL DMF, 300 s
2*	Deprotection	3 mL 20 % Piperidin in DMF, 90 °C, 65 s, 30 W
3*	3x Waschen	je 4 mL DMF
4*	Deprotection	3 mL 20 % Piperidin in DMF, 90 °C, 65 s, 30 W
5*	3x Waschen	2 mL, 2 mL, 3 mL DMF
6*	Kopplung	2,5 mL AS (0,2 M)
		+ 1 mL DIC (0,5 M)
		+ 0,5 mL Oxyma (1 M)
		90 °C, 125 s
7*	2x Waschen	je 4 mL DMF
8	Final Deprotection	4 mL 20 % Piperidin in DMF, 90 °C, 65 s
		3x Waschen mit je 3 mL DMF
		4 mL 20 % Piperidin in DMF, 90 °C, 65 s
		3x Waschen mit 2 mL, 2 mL und 3 mL DMF

*Die Schritte 2-7 werden zyklisch gefahren, bis die gewünschte AS-Sequenz an das Harz synthetisiert wurde.

Tabelle 30: Kopplungsparameter für die Aminosäure Arginin

Schritt	Syntheseablauf	Wichtige Parameter
1	Quellen des Harzes	10 mL DMF, 300 s
2	Deprotection	3 mL 20 % Piperidin in DMF, 90 °C, 65 s, 30 W
3	3x Waschen	je 4 mL DMF
4	Deprotection	3 mL 20 % Piperidin in DMF, 90 °C, 65 s, 30 W
5	3x Waschen	2 mL, 2 mL, 3 mL DMF
6	Kopplung	2,5 mL AS (0,2 M)
		+ 1 mL DIC (0,5 M)
		+ 0,5 mL Oxyma (1 M)
		25°C, 1500s, 75°C, 30W, 120s
7	1x Waschen	4 mL DMF
8	Kopplung	2,5 mL AS (0,2 M)
		+ 1 mL DIC (0,5 M)
		+ 0,5 mL Oxyma (1 M)
		75°C, 170W, 15 s 90°C, 30W, 110 s
9	2x Waschen	je 4 mL DMF

10	Final Deprotection	4 mL 20 % Piperidin in DMF, 90 °C, 65 s
		3x Waschen mit je 3 mL DMF
		4 mL 20 % Piperidin in DMF, 90 °C, 65 s
		3x Waschen mit 2 mL, 2 mL und 3 mL DMF

- **Abspaltung der Peptide vom Trägerharz**

Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde das getrocknete Syntheseprodukt mit 4 mL *Cleavage*-Lösung (95 % TFA, 2,5 % H₂O, 2,5 % TIS) versetzt und bei Raumtemperatur vier Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das unlösliche Harz durch Filtration vom in der Lösung befindlichen Peptid getrennt. Das Peptid wurde aufgefangen und präzipitiert. Dazu wurde etwa das 5-fache Volumen an eiskaltem Diethylether (-80 °C) auf die *Cleavage*-Lösung gegeben. Die entstandene Suspension wurde 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zugabe von eiskaltem Diethylether wurde wiederholt, das Pellet resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet nach Abdampfen des Diethylethers in Reinstwasser gelöst. Das Peptid wurde im Anschluss mittels lyophilisiert und bei -80 °C gelagert.

- **Analyse der Peptide**

Die Peptide wurden durch eine RP-HPLC (Agilent 1100 System, Phenomenex®-Aeris™ 2,6 µm Peptide XB-C18 100 Å LC Column 150 x 2,1 mm) mit einem 40 min Gradienten aufgetrennt. Die Laufmittel 0,08 % TFA-H₂O (A) und 0,08 % TFA-Acetonitril (B) wurden vorab entgast. Der Gradient verläuft in 30 min von 5 % B bis auf 95 % B linear, wird für 5 min 95 % B gehalten und 5 min bei 5 % B equilibriert. Die Bestimmung der molaren Masse der Syntheseprodukte erfolgte über MALDI-TOF mit einer Dihydroxybenzoesäure-Matrix. In dieser Arbeit wurden die Analysen am Biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität in der Arbeitsgruppe Proteinanalytik von Prof. Dr. Günter Lochnit durchgeführt.

3.2.2.2 Rationale Designkonzepte und Modifizierungen der Leitstruktur

- **Alanin Scan**

Theorie:

Ausgangspunkt für das Design von neuen Peptid-basierten Wirkstoffen ist die Identifizierung der für die biologische Aktivität des Peptids verantwortlichen Aminosäuren. Dies erfolgt häufig in einem ersten Schritt durch die sukzessive Substitution aller Aminosäuren durch Alanin. Alanin ist die kleinste chirale Aminosäure und wird aufgrund ihrer geringen Möglichkeit Wechselwirkungen einzugehen, als neutrale AS genutzt. Ändert sich durch Substitution der ursprünglichen Aminosäure mit Alanin die biologische Aktivität des Moleküls, kann dies ein Hinweis darauf sein, dass die substituierte AS essentiell für die

Wirkung ist. Man erhält somit eine erste Aussage über Struktur-Wirkungsbeziehungen und identifiziert daher kritische Strukturpunkte, welche nun im Rahmen weiterer QSAR-Studien nicht verändert werden sollten.

Neben der Aminosäure Alanin können im rationalen Design sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, sowie deren D-Enantiomere genutzt werden. Ebenso können die Seitenketten einzelner Aminosäuren modifiziert werden. Voraussetzung für rationale Designkonzepte eines Wirkstoffes ist in der Regel die Identifikation des Targets und der Bindestelle. Nur so können gezielte Änderung der Struktur und damit der Wechselwirkung mit dem Zielmolekül herbeigeführt werden.

Durchführung:

Zur Identifizierung kritischer Aminosäurepositionen wurden im Dekamer der gegebenen Leitstruktur jede Position nacheinander durch den Einbau von Alanin ersetzt. Diese Sequenzen wurden über Festphasensynthese wie oben beschrieben hergestellt und analysiert.

- **Softwaretools für physikochemische Parameter**

Zur Charakterisierung physikochemischer Parameter einzelner Substanzen können Softwaretools genutzt werden. Innerhalb der Arbeit wurde auf zwei öffentlich-zugängliche Analysetools zurückgegriffen, deren Funktion und Berechnungsgrundlagen im Folgenden kurz erklärt werden sollen:

- I. **HeliQuest® (*heliquest.ipmc.cnrs.fr*)**

HeliQuest berechnet aus der Aminosäuresequenz einer Helix ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie ihre Aminosäurezusammensetzung. In einer Datenbank werden anschließend die so gewonnenen Ergebnisse mit Proteinsegmente ähnlicher Eigenschaften verglichen. Zur Berechnung der physikochemischen Parameter greift dieses Tool auf Arbeiten von Fauchère & Pliska und auf Veröffentlichungen der Forschergruppe um Eisenberg zurück (Zhu et al. 2016; Eisenberg et al. 1982).

- **Mittlere Hydrophobizität**

Die mittlere Hydrophobizität $\langle H \rangle$ lässt sich aus der Sequenzlänge N und der Summe der Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren H_n bestimmen:

$$\langle H \rangle = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N H_n \quad (1)$$

Dieser Parameter kann Werte zwischen -1.01 und 2.25 annehmen.

- **Das hydrophobe Moment $\langle \mu_H \rangle$**

Dieser Parameter gilt als Maß für die Amphiphilie einer Helix. Die Länge und die Richtung des Vektors $\langle \mu_H \rangle$ hängen von der Hydrophobie und der Position der Seitenkette entlang der Helixachse ab. Ein großer $\langle \mu_H \rangle$ Wert bedeutet, dass die Helix senkrecht zu ihrer Achse amphipatisch ist.

Das hydrophobe Moment lässt sich durch die Sequenzlänge N , die Hydrophobie der n -ten Aminosäure und dem Winkel δ , der den Abstand der Seitenketten voneinander entlang des Rückgrates angibt:

$$\langle \mu_H \rangle = \frac{1}{N} * \sqrt{\left[\sum_{n=1}^N H_n \sin(n\delta) \right]^2 + \left[\sum_{n=1}^N H_n \cos(n\delta) \right]^2} \quad (2)$$

Werte für diesen Parameter liegen zwischen 0 bis 3.26.

II. CellPPD (<http://crdd.osdd.net/raghava/cellppd/index.html>)

CellPPD ist eine *in silico* Methode, die entwickelt wurde, um effiziente zellpenetrierende Peptide (*Cell Penetrating Peptides* - CPPs) vorherzusagen zu können. Diese Methode basiert auf 708 experimentell validierten CPPs.

CellPPD besitzt vier interessante Designfunktionen:

Methode „**Design-Peptid**“: Dieses Modul ermöglicht es dem Benutzer, alle möglichen Analoga eines Peptids zu generieren und eine Vorhersage treffen zu können, ob das Analogon zelldurchdringend wirken kann.

Methode „**Mehrere Peptide**“: Dieses Modul von CellPPD ermöglicht dem Benutzer, die Anzahl der CPPs in Peptiden vorherzusagen, die eingegeben wurden.

Methode „**Protein-Scanning**“: Dieses Modul erzeugt alle möglichen überlappenden Peptide und deren einzelne mutierte Analoga von Proteinen. Es wird auch vorhergesagt, ob ein überlappendes Peptid/Analogon CPP-Eigenschaften besitzt oder nicht.

Methode „**Motiv-Scan**“: Ermöglicht dem Benutzer, mögliche CPP-Motive in seinen Sequenzen zu identifizieren.

Mit Hilfe dieser Tools können verschiedene physikalisch-chemische Eigenschaften berechnet werden und die Peptidanaloga können in Sortierreihenfolge basierend auf den gewünschten Eigenschaften angezeigt werden.

3.2.3 Bioanalytische Methoden

3.2.3.1 LC-MS/MS und De-novo-Peptidsequenzierung

Theorie:

Per Definition besteht ein Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator, der Masse-Ladungs-Verhältnisse (m/z) der ionisierten Analyten bestimmt und einem Detektor, der die Anzahl der Ionen bei jedem m/z -Wert registriert. Elektrospray-Ionisation (ESI) und matrixgestützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI) sind die beiden Techniken der Wahl, wenn es sich um die Analyse von Peptiden/Proteinen handelt.

ESI ionisiert die Analyten aus einer Lösung heraus und ist daher leicht an flüssigkeitsbasierte (z.B. chromatographische und elektrophoretische) Trennverfahren zu koppeln. MALDI sublimiert und ionisiert die Proben aus einer trockenen, kristallinen Matrix durch Absorption von Laserpulsenergien.

Der Massenanalysator ist von zentraler Bedeutung für die Technologie, wobei die Schlüsselparameter für *Proteomics-Untersuchungen* Sensitivität, Auflösung und Massengenauigkeit sind. Zurzeit werden vier Grundtypen von Massenanalysatoren in der Proteomikforschung eingesetzt. Hierzu zählen die Ionenfalle, Time-of-Flight (TOF)-, Quadrupol- und Fourier-Transformation-Ionenzyklotron (FT-MS)-Analysatoren.

Die **Orbitrap** gehört zu den jüngsten Entwicklungen im Bereich der Ionenfallen. Sie besitzt eine zentrale, spindelförmige Elektrode.

Die Ionen werden in der Orbitrap durch ein elektrisches Feld im Massenanalysator gefangen. Der Einschuss der Ionen geschieht hier radial zur Elektrode und die Ionen bewegen sich aufgrund einer elektrostatischen Anziehungskraft auf spiralförmigen Bahnen. Durch das dezentrale Einbringen der Ionen in die Kammer, schwingen diese gleichzeitig entlang einer Achse der zentralen Elektrode. Durch diese Schwingungen werden Frequenzen erzeugt, die am Detektor mittel Fouriertransformation in ein entsprechendes m/z -Verhältnis überführt werden. Sie gehört damit zur Gruppe der FT-MS-Analysatoren mit hoher Auflösung.

Die Massenspektrometrie hat sich zur Methode der Wahl für die qualitative und quantitative Charakterisierung von Protein- bzw. Peptidmischungen entwickelt. Das *Peptide Mass Fingerprinting* war hier eine der ersten Methoden, die große Popularität erlangten. Dabei wird mit hoher Genauigkeit die Masse von Peptiden bestimmt, die durch proteolytischen Verdau eines Proteins produziert wurden. Die ermittelten Peptidmassen werden dann mit einer Datenbank von Proteinen abgeglichen, die *in silico* proteolytisch verdaut wurden.

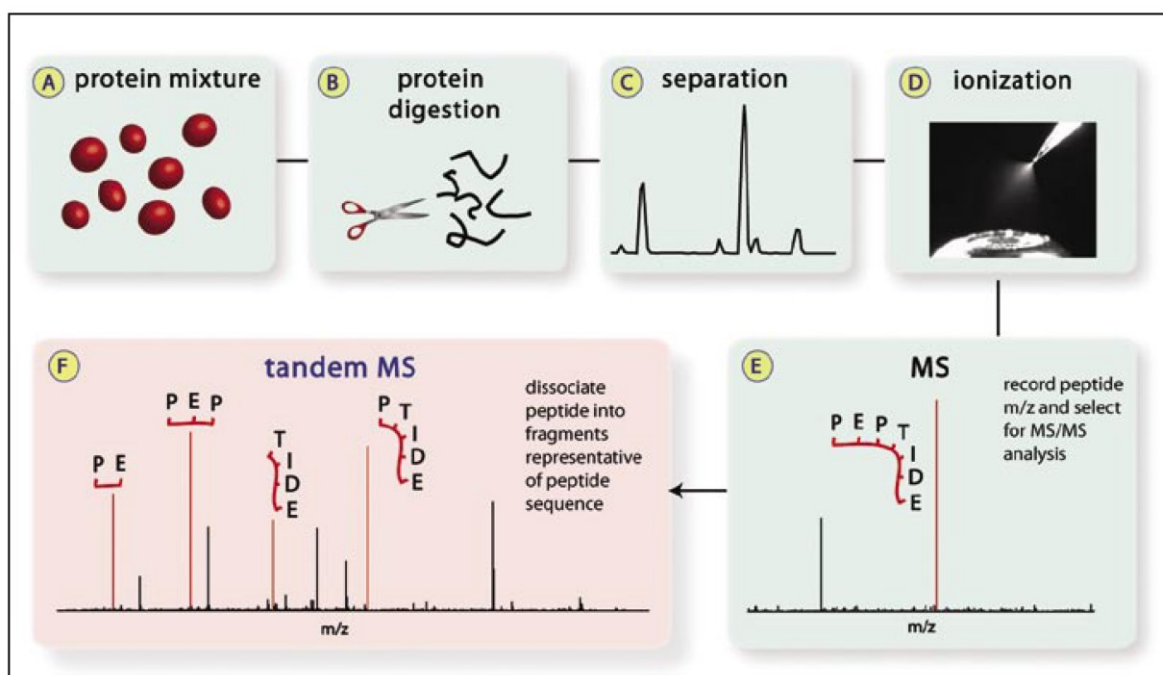


Abbildung 14: Ablauf einer massenspektrometrisch-(MS) basierten Proteomanalyse (Coon et al. 2005)

Im Verlauf einer typischen *Shotgun*-Proteomuntersuchung wird die Probe zunächst mittels enzymatischer Proteolyse verdaut, um so eine Vielzahl an Peptiden zu generieren. Im zweiten Schritt wird diese verdaute Probe chromatographisch getrennt. Dies kann sowohl eindimensional als auch mehrdimensional geschehen. Technologischer Standard für die Auftrennung der Peptide ist ein nanoflow-HPLC-System mit einer durchschnittlichen Flussrate von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Hieran schließt direkt eine ESI-Massenspektrometrie an. Die Ionisierung über Elektronenspray wandelt die im HPLC-Laufmittel gelösten Moleküle in mehrfach protonierte Ionen um. Die Anzahl der Protonen hängt hierbei von der Anzahl der basischen Seitenketten des Peptids ab. Somit wird nun durch die erste MS-Analyse ein Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) für jedes Peptidion bestimmt. Im selben Experiment kann dann ein solches Peptidion selektiert und fragmentiert werden. Durch die Massenanalyse der Fragmente können so Informationen über die Sequenz dieses Peptids erhalten werden.

Bei der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS oder MS^2) werden bestimmte Molekül-Ionen gezielt zur Fragmentierung angeregt. Die Massenanalyse erfolgt in zwei Stufen. Zunächst werden die Ionen eines zu untersuchenden Analyten nach Isolation im ersten Analysator in einer Kollisionszelle mit Gasteilchen eines Inertgases wie Stickstoff, Argon oder Helium zur Fragmentierung durch Stöße mit dem Gas gebracht. Dieser Vorgang wird als stoßinduzierte Fragmentierung bzw. CID (*Collision-Induced Dissociation*) bezeichnet. Die dabei entstehenden leichteren Ionen werden anschließend in der zweiten Stufe massenspektrometrisch analysiert. Diese beiden Analysen können räumlich oder zeitlich getrennt stattfinden. Bei der räumlichen Tandem-MS (engl. *tandem-in-space*) befinden sich zwei Massenanalysatoren in Serie, wie das beispielsweise bei Triple-Quadrupol-, qTOF- oder TOF-TOF-Geräten der Fall ist. Bei Instrumenten mit Quadrupol-Ionenfallen oder FT-ICR-Analysatoren handelt es sich dagegen um zeitliche Tandem-Massenspektrometrie (engl. *tandem-in-time*), bei der die Analyse der Fragment-Ionen im gleichen Analysator durchgeführt wird. Bei diesen Instrumenten besteht die Möglichkeit, den gesamten Vorgang mehrmals zu wiederholen, so dass bereits erhaltene Fragmente isoliert und weiterfragmentiert werden können. Hierbei spricht man von Mehrfach-Massenspektrometrie oder MS^n , wobei n der Anzahl der Fragmentierungsschritte entspricht. Diese Möglichkeit ist insbesondere dann von Nutzen, wenn im ersten Fragmentierungsschritt nicht genügend aussagekräftige Fragmente entstehen.

Fragmentierungsexperimente haben in der Analytik eine große Bedeutung, da sich mit ihnen Informationen über die Struktur von Molekülen gewinnen lassen. So ist es möglich, aus Fragmentspektren die Sequenzen von linearen Peptiden zu rekonstruieren und die entsprechenden Peptid-/Proteinsequenzen zu identifizieren, aus denen die Peptide durch Hydrolyse hervorgegangen sind. Dabei nutzt man die Tatsache aus, dass Fragmentierungen, wie in Abbildung 15 dargestellt, überwiegend an den Peptidbindungen entlang der Peptidkette auftreten.

Die Nomenklatur der Fragment-Ionen geht auf Roepstorff und Fohlman sowie Biemann (Roepstorff und Fohlman 1984; Biemann 1988) zurück. Fragmente der N-terminalen Serie werden mit a , b und c , die der C-terminalen Serie hingegen mit x , y und z bezeichnet. Ein zusätzlicher Index gibt die Zahl der im jeweiligen Fragment-Ion enthaltenen Aminosäurereste an. Bei bestimmten Fragmentierungsarten, insbesondere bei Nutzung höherer Kollisionsenergien, können zudem Fragmente der Seitenketten der Aminosäuren entstehen. Diese mit d , v und w bezeichneten Fragment-Ionen können wichtige Informationen zur Interpretation der Spektren beitragen und zum Beispiel die Unterscheidung der isobaren Aminosäuren Leucin und Isoleucin ermöglichen.

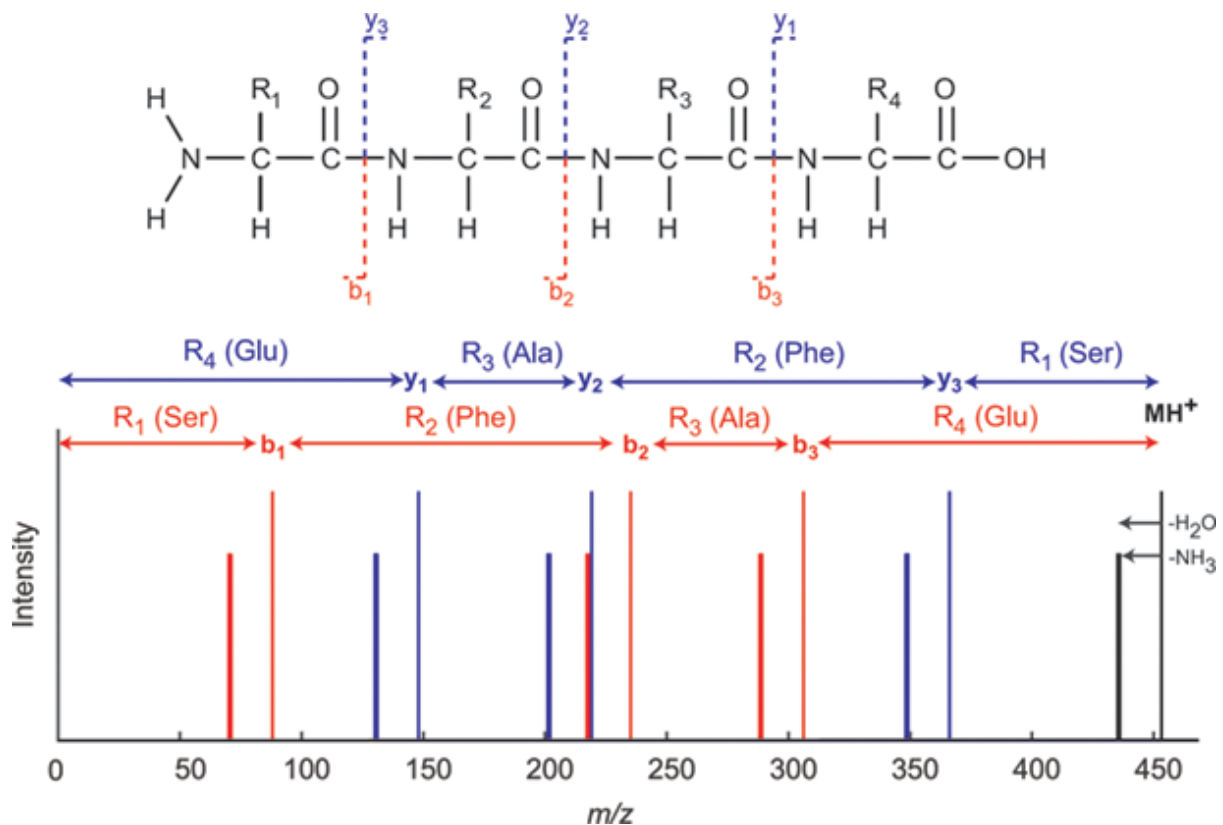


Abbildung 15: Fragmentierung des Peptides Ser-Phe-Ala-Glu; zu sehen sind die Positionen der erwarteten y und b Ionen sowie der Neutralverlust an H_2O und NH_3 (Baars und Perlman 2016)

Die so erhaltenen MS/MS-Spektren werden schließlich für die *De-novo*-Sequenzierung ausgewertet. Eine dieser Möglichkeiten stellt eine Kombination aus *Max Quant* und *Andromeda* dar (Cox et al. 2011). Einerseits werden mittels Daten aus dem *In-silico*-Verdau, unter Berücksichtigung der eingestellten möglichen und festen Modifikationen, die möglichen Massen der Peptide berechnet und dadurch ein theoretisches Spektrum erstellt, wobei die Gesamtheit einfach geladener b - und y -Ionen betrachtet wird.

Auf der anderen Seite erfolgt die Auswertung der Rohdaten der MS/MS-Messung. Für eine Filterung werden hier sogenannte q -Peaks mit der maximalen Intensität pro 100 Da ausgewählt und mit zuvor theoretisch ermittelten Peptiden auf Basis von m/z oder ppm innerhalb einer gegebenen Toleranz miteinander verglichen. Der Parameter q ist die Anzahl an erlaubten Peaks innerhalb eines Massenintervalls. Zur Bewertung des Parameters wird der *Andromeda*-Score verwendet.

Das Schema des Andromeda - Algorithmus ist in Abbildung 16 dargestellt.

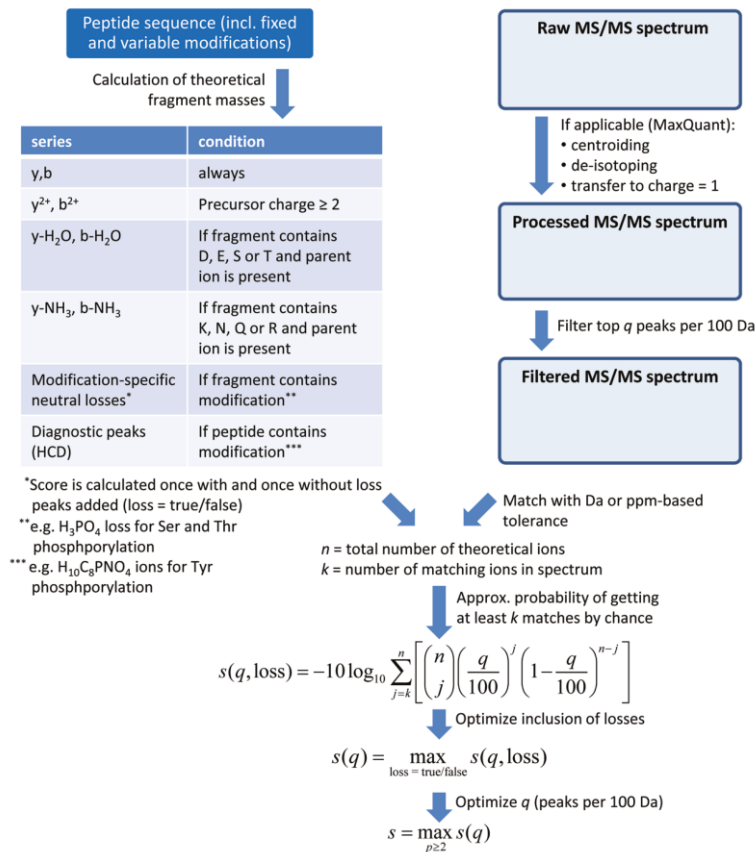


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Andromeda-Algorithmus (Cox et al. 2011)

Durchführung:

Die Proben für die LC-MS/MS-Analytik wurden zunächst über *StageTips* entsalzt und anschließend über ein nLC-MS/MS-System analysiert. Stage-Tips wurden zunächst mit Methanol (MeOH) aktiviert (200 µL), anschließend mit Elutionspuffer (80 % Acetonitril (AcN), 0,1 % (v/v) Essigsäure, 200 µL) gespült und mit Puffer A (H₂O, 0,1 % (v/v) Essigsäure, 200 µL) equilibriert. Die Proben wurden in einem Verhältnis 1:1 mit 0,2 % (v/v) Eisessigsäure angesäuert, auf die *StageTips* geladen und zweimal mit Puffer A gewaschen. Zum Eluieren wurden 30 µL Elutionspuffer auf die Tips pipettiert, für 30 min inkubiert und durch Herausdrücken mittels Spritze in eine 96-Well-Platte eluiert. Die Proben wurden für durchschnittlich 10 min in der *SpeedVac* eingengt und mit Puffer A auf 12 µL aufgefüllt.

Die Auftrennung der Proben erfolgte durch eine nanoLC (Proxeon, easy nLC 800, (Säulenparameter: Länge 15 cm; ID 75 µm; resin ReproSil-Pur C18-AQ, 3 µm)) mit einem 30 min Gradienten. Der Gradient verlief in 25 min von 5 % B bis auf 35 % B linear, in den restlichen 20 min wurde die Säule gereinigt (95 % B für 10 min) und für die nächste Probe äquilibriert (10 min 5 % B). Nach Akkumulierung von 30.000 Ionen in der linearen Ionenfallen wurde die Fragmentierung im *HCD mode* (Transfer in HCD collision octopole) durchgeführt. Die Auflösung im MS Spektrum betrug 42.500 und für die MS/MS Spektren 10.500. Diese Untersuchungen wurden extern in der Arbeitsgruppe von Dr. Markus Krüger am MPI, Bad Nauheim durchgeführt.

3.2.3.2 Oberflächenplasmonresonanz-Spektrometrie (SPR)

Theorie:

Im Bereich der molekularen Interaktionsanalytik zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen hat sich in den vergangenen Jahren die Anwendung der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (engl. *Surface plasmon resonance*, kurz SPR) als optische Methode zur Bestimmung von Bioaffinitäten durchgesetzt (Homola 2003). Hierbei wird die Änderung des Brechungsindex bei Bindung des Analyten an Liganden gemessen, die auf der Oberfläche eines Sensorchips immobilisiert sind. Der Begriff Ligand bezeichnet im Kontext der SPR das auf dem Chip immobilisierte Testmolekül. Die Ligand-Analyt-Bindung kann hier in Echtzeit analysiert werden. Zudem ist keine spezielle Markierung notwendig und wegen der hohen Nachweisempfindlichkeit werden nur sehr geringe Konzentrationen des Analyten benötigt (Thillaivinayagalingam et al. 2010).

Die Oberflächenplasmonresonanz ist ein Phänomen, welches bei dünnen leitenden Schichten an der Grenzfläche zwischen Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex auftritt. Im SPR-System sind diese Medien das Glas des Sensorchips und die Probenlösung, die leitende Schicht ist eine dünne Beschichtung aus Gold auf der Glasoberfläche. Unter der Voraussetzung des Vorliegens von Totalreflexion (TR) verliert das auf die reflektierende Fläche auftreffende Licht einen Teil seiner elektrischen Feldstärke durch Anregung von Elektronen im freien Leitungsband der Goldfolie, welche als evaneszentes Wellenfeld bezeichnet wird und über den gesamten Bereich der Grenzfläche in das Medium des niedrigeren Brechungsindex streut, ohne an Nettoenergie zu verlieren. Die Anregung solcher Oberflächenplasmonen wird in den meisten SPR-Sensoren durch Lichtwellen und eine Prismenkopplung in Verbindung mit abgeschwächter Totalreflektion (ATR) realisiert. Die Amplitude der evaneszenten Welle nimmt exponentiell mit dem Abstand der Oberfläche ab. Die effektive Eindringtiefe, welche von der Sensitivität des Brechungsindex abhängt, beträgt in solchen SPR-Systemen ca. 150 nm.

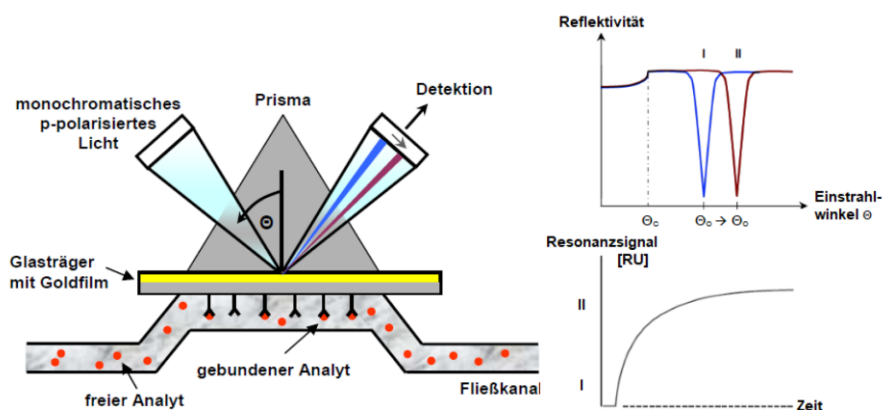


Abbildung 17: SPR-Aufbau zur molekularen Interaktionsanalyse und ihre Ergebnisse: Verschiebung des SPR-Winkels durch Bindung eines Analyten an den SPR-Sensorchip (rechts oben) und das resultierende Sensorgramm (rechts unten); modifiziert nach Bücken Petra 2007

Das Phänomen der SPR kann als Abfall der Intensität des reflektierten Lichts in einem bestimmten Winkel detektiert werden. Dieser Resonanzeffekt ist gegenüber dem Brechungsindex sehr empfindlich, so dass kleinste Änderungen in der Konzentration von Molekülen an der Oberfläche des Sensorchip

eine Änderung des Brechungsindex nach sich ziehen. Diese Änderungen können als SPR-Signal gemessen werden, wobei nur Änderungen innerhalb der effektiven Permeationstiefe das SPR-Signal beeinflussen können.

Bei der praktischen Durchführung eines solchen Experiments muss zuerst der gewünschte Ligand auf dem Sensorchip immobilisiert werden. Dafür nutzt man, je nach Eigenschaften des Liganden, unterschiedliche Methoden, jedoch beinhalten alle Strategien drei wesentliche Schritte: Die Aktivierung der Sensorchip-Oberfläche, die Kopplung des Liganden und die Deaktivierung der noch vorhandenen aktivierten Gruppen.

Die Immobilisierung der Liganden auf der Sensorchipoberfläche erfolgt häufig über eine kovalente Kopplung zwischen Amidgruppen des Liganden und Carboxylgruppen entsprechend modifizierter Dextranketten, die mittels SH-Gruppen auf die Goldfolie aufgebracht sind. Hierzu nutzt man eine Mischung aus wasserlöslichem Carbodiimid 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS), um an den Carboxylfunktionen eine reaktive NHS-Ester-Zwischenstufe zu erzeugen. Diese bildet spontan mit einem primären Amin eine Amidbindung aus und immobilisiert somit den Liganden kovalent. Die freien reaktiven NHS-Ester auf der Goldoberfläche werden abschließend mit einer Ethanolamin-Lösung geblockt, um mögliche Interaktionen während der darauffolgenden Bindungsstudien zu vermeiden. Abbildung 18 zeigt das typische Schema einer Ligandimmobilisierung mittels Amidkopplung.

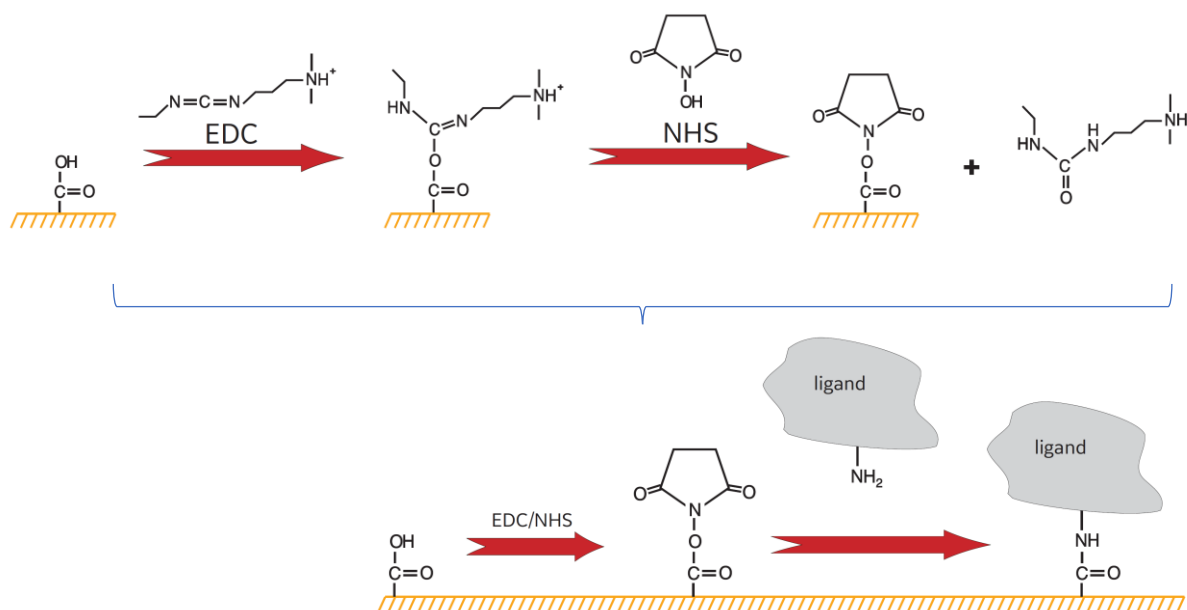


Abbildung 18: Reaktionsschema der Ligandimmobilisierung durch Aktivierung der Carboxylfunktion unter Bildung einer reaktiven NHS-Ester-Zwischenstufe und daraus resultierender kovalenter Amidbindung, modifiziert nach Fa. Biacore / GE 2016

Die eigentliche Interaktionsanalyse wird in Abbildung 19 dargestellt. Die Analytlösung wird mit konstantem Fluss über den Sensorchip bewegt, wo eine Interaktion mit dem Liganden stattfinden kann. Ist die Injektion beendet, wird der Sensorchip mit Laufpuffer gespült, wobei der Analyt vom Liganden dissoziiert. Je nach Affinität des Analyten findet eine mehr oder weniger vollständige Dissoziation statt.

Zur Wiederverwendung muss der Chip regeneriert werden, bei welcher alle Analyt-Moleküle vom Sensorchip eluiert werden.

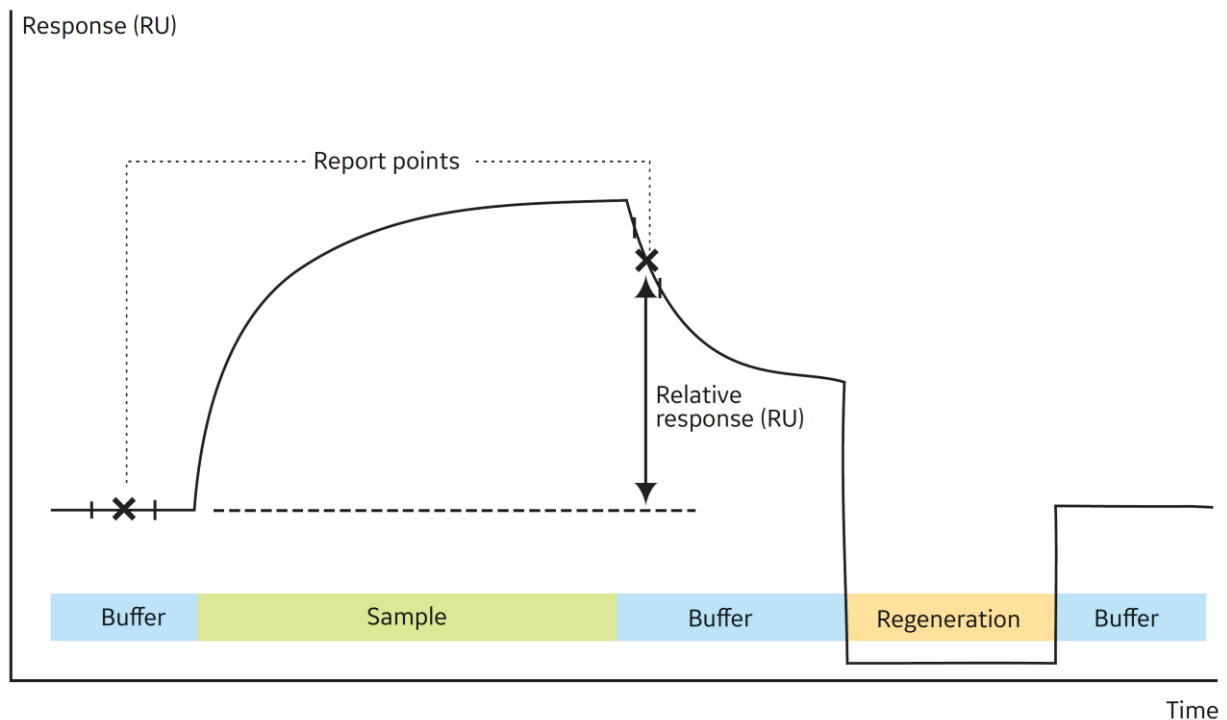


Abbildung 19: Schematische Darstellung eines Sensorgramms bei Analytbindung mit Assoziation, Dissoziation und Regenerationsphase, modifiziert nach Fa. Biacore / GE 2016

- **Bindungskinetik und wichtige Parameter in der Interaktionsanalyse**

Der Hauptvorteil des direkten Nachweises mit der SPR-Technologie ist die Bestimmung der Kinetik von (bio-)molekularen Wechselwirkungen. Die Reaktionsraten (k_a und k_d) und Gleichgewichtskonstanten (K_D) von Wechselwirkungen der allgemeinen Form $A+B \rightarrow AB$ können hierüber bestimmt werden.

Die Assoziationskonstante stellt die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung des Komplexes (AB) dar, die in der Anzahl der gebildeten Komplexe pro Zeiteinheit angegeben wird. Sobald die Bildung des Komplexes AB auf der Sensoroberfläche ausgebildet ist, kann seine Dissoziation beginnen. Die Dissoziationsratenkonstante (k_d) wird in der Anzahl der AB-Komplexe ausgedrückt, die sich pro Zeiteinheit dissoziieren. Ein Gleichgewicht ist vorhanden, wenn die Reaktionsgeschwindigkeiten der Assoziation und Dissoziation gleich sind. Die Gleichgewichtsassoziationskonstante K_A und die Dissoziationskonstante K_D stehen in reziproker Beziehung zu einander und beschreiben die Affinität einer Interaktion. Eine hohe K_A -Wert bedeutet hier eine hohe Affinität des Analyten A zum immobilisierten Liganden B. Der K_D -Wert kann hingegen als Maß für die Stabilität des Komplexes AB angesehen werden. Da diese beiden Werte in einem reziproken Verhältnis stehen, bedeutet hier ein niedriger K_D -Wert eine große Stabilität und starke Interaktion des [AB]-Komplexes. Im Fall einer Wirkstoff-Target-Interaktion ist daher ein möglichst niedriger K_D -Wert gewünscht.

Die Oberflächenplasmonresonanz bietet eine einfache Möglichkeit, die Kinetik der reversiblen Bindung eines Biomoleküls aus der Lösung an einen Liganden, der auf der Sensoroberfläche immobilisiert ist, in

Echtzeit zu verfolgen. Die klassische Methode geht von einer einfachen 1:1 Interaktion aus und entspricht einem einfachen Langmuir-Modell. Es basiert auf drei Annahmen:

1. Die Bindung zwischen Liganden und Analyt ist spezifisch.
2. Alle Flächen sind gleichwertig und die Liganden sind statistisch gleichmäßig verteilt.
3. Die Fähigkeit des Analyten an den Liganden zu binden, ist unabhängig vom Modifizierungsgrad der benachbarten Oberfläche.

Sind diese drei Bedingungen erfüllt, ist das dynamische Gleichgewicht gegeben durch



Unter der Annahme, dass der Analyt A aus der Lösung bindet, und B der Ligand ist, können folgende Prozesse beschrieben werden.

Der Assoziationsprozess - Bildung [AB]

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] \quad (4)$$

Der Dissoziationsprozess - Zerfall [AB]

$$-\frac{d[AB]}{dt} = k_d[AB] \quad (5)$$

Nach Einstellen des dynamischen Gleichgewichts gilt:

$$k_a[A][B] = k_d[AB] \quad (6)$$

$$K_A = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{k_d}{k_a} \quad (7)$$

$$K_D = \frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (8)$$

Das Signal der SPR-Methode wird als dimensionslose *resonance units* (RU) aufgezeichnet und ist proportional zur Menge des gebildeten Komplexes AB auf dem Sensorchip.

Das maximale Signal RU_{\max} bei dem alle Bindungsstellen auf dem Sensorchip besetzt sind, ist außerdem proportional zur eingesetzten Konzentration des Analyten, sodass Gleichung 8 wie folgt umgeschrieben werden kann:

$$\frac{dR}{dt} = k_a[A]R_{max} - (k_a[A] + k_d)R \quad (9)$$

Die Berechnung der Assoziationskonstante erfolgt über eine Linearisierung der Daten während der Assoziationsphase. Hierbei werden verschiedene unterschiedliche Analytkonzentrationen benötigt. Stellt man die Änderung des Signals mit der Zeit (dR/dt) über das absolute Signal (R) dar, erhält man innerhalb eines linearen Bereiches für jede Analytkonzentration eine Geradengleichung mit einer Steigung $-k_s$, welche $-(k_a[A]+k_d)$ entspricht. Anschließend werden die ermittelten k_s -Werte gegen die Analytkonzentration $[A]$ aufgetragen und ebenfalls eine lineare Regression durchgeführt. Die Steigung dieser Geraden entspricht der Assoziationskonstante k_a .

Da während der Dissoziationsphase $[A] = 0$ ist, kann Gleichung 9 zu folgender Funktion vereinfacht werden

$$\frac{dR}{dt} = -k_d R \quad (10)$$

Es wird die Dissoziationskonstante der höchsten Analytkonzentration $[A]$ ermittelt, indem $\ln(R_0/R)$ gegen die Zeit (t) aufgetragen wird und eine lineare Regression für die Werte der ca. ersten 100 s durchgeführt wird. Die Steigung der Geraden entspricht der Dissoziationskonstante K_D . Bei komplexeren Interaktionen mit einem Zwischenzustand oder mehreren konkurrierenden Analyten ist keine Linearisierung der Daten möglich. Die Bestimmung von Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante erfolgt dann über eine analytische oder numerische Integration dieser zeitlichen Verläufe.

Durchführung:

Mittels SPR soll die Affinität von Peptiden zu ribosomalen Strukturen, die als potentielle Targets in Frage kommen, bestimmt werden.

Vor Beginn der Immobilisierung der Ribosomen wurde das gesamte System zur Beseitigung von Proteinkontaminationen zunächst ohne Einsetzen des Chips gereinigt. Hierzu wurden zwei Reinigungslösungen genutzt. Im erste Reinigungsschritt erfolgte durch Anwendung der Desorb1-Lösung (0,5 % SDS) eine tensidbasierte Desorption von möglichen Proteinbestandteilen im System. Daran schloss ein zweiter Schritt mit einer basischen Desorb2-Lösung (50 mM Glycin; pH 8,5) an, um mögliche Tensidreste zu entfernen. Abschließend wurde das System mit ddH₂O gespült. Nach erfolgreicher Reinigung wurde nun ein neuer CMD500M Sensorchip auf das optische Prisma gelegt und die Chipoberfläche zunächst mit ddH₂O konditioniert, bis kein Basisliniendrift mehr erkennbar war.

Die Immobilisierung der Ribosomen erfolgte schließlich in sechs Teilschritten. Alle Parameter sowie die jeweiligen Bedingungen sind dem Basisprotokoll aus Tabelle 31 zu entnehmen.

Tabelle 31: Standardprotokoll zur EDC/NHS-Kopplung der Firma Xantec bioanalytics

	<i>Schritt</i>	<i>Lösung</i>	<i>Flussrate</i>	<i>Kontaktzeit</i>
Reinigung	1	Desorb 1 (0,5 % SDS)	100 µL/min	5 min
	2	Desorb 2 (50 mM Glycin, pH 8,5)	100 µL/min	10 min
Aktivierung	3	EDC/NHS - Lösung (0,2 M EDC; 0,1 M NHS, in 50 mM MES pH 5,0)	25 µL/min	7 min
Immobilisierung	4	5-100 µg/mL Ligand in 10 mM Acetatpuffer, 10 mM MgCl ₂ , pH 4,5	25 µL/min	5-30 min
	5	ddH ₂ O	25 µL/min	10-30 min
Blocken	6	1 M Ethanolamin-HCl, pH 8,5	25 µL/min	15 min
	7	ddH ₂ O	25 µL/min	3 min
Umpuffern	8	10 mM HEPES, pH 7,6, 30 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 0,005% Tween 20	25 µL/min	

Nach erfolgreicher Immobilisierung wurden schließlich die Bindungskinetiken der Leitstruktur und der einzelnen Derivate aufgenommen und die Affinität der Peptide zum Ribosom über die Berechnung des K_D -Wertes bestimmt. Die Teilschritte inklusive Parameter und Bedingungen zu den Bindungsstudien sind in Tabelle 32 aufgelistet.

Tabelle 32: Protokoll zur Aufnahme der Bindungskinetiken der Peptide

	<i>Lösung</i>	<i>Flussrate</i>	<i>Kontaktzeit</i>
Assoziation	Laufpuffer HEPES PrAMP; 250 µL über 3 min	25 µL/min	3 min
Dissoziation	Laufpuffer HEPES	25 µL/min	5 min
Regeneration	100 µL 10 mM Glycin, pH 3 über 30 sec	25 µL/min	30 sec
	Laufpuffer HEPES		1 min

3.2.3.3 Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)

Theorie:

Konfokale Laserscanning-Mikroskope (CLSM) besitzen, im Gegensatz zu konventionellen Mikroskopen, eine reale dreidimensionale Auflösung, welche es ermöglicht, kleine mikroskopische Strukturen wie bspw. Bakterienzellen räumlich abzubilden und zu vermessen.

Der Aufbau biologischer Strukturen und Objekte ist äußerst komplex, da sie auf mikroskopischer Ebene oftmals aus vielen sich überlagernder Strukturelemente bestehen. Diese Anordnung kann folglich einen

Einfluss auf die Auflösung haben, da beispielsweise fluoreszenzmarkierte Strukturen sehr eng gepackt zusammen liegen und daher einzeln nicht darstellbar sind. Ein weiterer Aspekt ist der hohe Streulichtanteil der durch solche Proben miteingebracht wird. Mit Hilfe des konfokalen Prinzips können kontrastreiche Bilder mit einer sehr hohen Auflösung dargestellt werden. LSM-Systeme wie das genutzte Zeiss LSM700 erzeugen in einem Scanverfahren dreidimensionale Aufnahmen und unterdrücken den Streulichtanteil von Abschnitten, die außerhalb der Brennebene liegen. Verbindet man diesen Vorgang nun mit Fluoreszenzanregung durch einen Laser, so können beispielsweise biochemische Vorgänge einer Zelle sichtbar gemacht werden oder aber auch die intrazelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Substanzen verfolgt werden (Engelhardt und Knebel 1993).

Der Scanvorgang im LSM geschieht nicht wie in einem herkömmlichen Lichtmikroskop für alle Objektpunkte parallel, sondern das konfokale LSM bestrahlt die Probe seriell, also punktwise und die physikalische Wechselwirkung, die das Laserlicht in der bestrahlten Objektstelle hervorruft wird somit auch nur punktwise gemessen. Da man ein Gesamtbild nur erhält, wenn sich der Laserstrahl über die gesamte Probe hinwegbewegt, bezeichnet man die konfokalen LSM-Systeme auch als sogenannte Punktscanner (Pawley 2006).

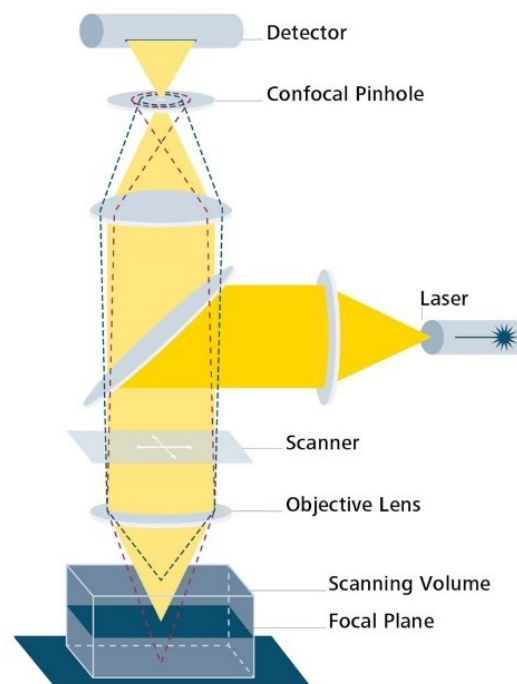


Abbildung 20: Prinzip des konfokalen LSM-Scanvorgangs (www.zeiss.com)

Diese punktförmige Beleuchtung der Probe wird in LSM-Geräten durch eine konfokale Blende, dem sogenannten *Pinhole* erzeugt. Diese Blende ist konjugiert zur Zwischenbildebene und somit auch zur Objektebene angebracht. Daraus resultiert, dass durch den Detektor nur Licht detektiert wird, welches zuvor die Blenden passiert hat.

Mit Hilfe der CLSM ist es somit möglich, aus einer mehrschichtigen Probe (typisch bis 100 μm) ausschließlich einen sogenannten optischen Schnitt abzubilden, der bei entsprechenden Aufnahmebedingungen eine z-Ausdehnung von weniger als 500 nm aufweisen kann.

Durchführung:

- **Fluoreszenzmarkierung**

Die Markierung der Peptide mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) erfolgte in Anlehnung an Park *et al.* (Park et al. 2000). Hierzu wurde der Fluoreszenzfarbstoff mit einer Konzentration von 1 mg/mL in DMSO gelöst. Ebenso wurden eine 1 mg/mL Peptidlösung in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 hergestellt. In ein 2 mL Reaktionsgefäß wurden nun die hergestellten Lösungen in einem molaren Verhältnis von 1 zu 10 durch Zugabe von 700 µL FITC-Lösung und 100 µL Peptidlösung vereinigt und für 16 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 400 µL 50 mM NH₄Cl nach einer Inkubation von 2 h abgestoppt. Abschließend wurden die markierten Peptide über RP-HPLC an einer C18-Säule aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

- **Probenvorbereitung und CLSM-Messung**

Es wurde zunächst eine Übernachtskultur des gramnegativen Stammes *E. coli* BL 21 in LB-Medium angesetzt und für 16-20 h bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Verdünnung der Übernachtskultur mit frischem LB-Medium auf eine OD₆₀₀=0,2. Von dieser Bakteriensuspension wurden 1 mL mit 100 µL FITC-Peptidlösung gemischt und in ein 2 mL Reaktionsgefäß pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 8 h bei 37 °C und 200 rpm in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die inkubierten Proben für 10 min bei 1000*g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µL PBS vorsichtig 3x gewaschen und wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µL sterilem PBS resuspendiert und die Bakterienzellen durch Zugabe von 400 µL 4 %igem Paraformaldehyd bei RT im Dunkeln für 30 min fixiert. Die Fixierung wurde durch Zugabe von 1,2 mL PBS gestoppt und die Bakteriensuspension für weitere 2 min bei 5000*g zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Bakterienpellet schließlich in 150 µL sterilem PBS resuspendiert.

Für die CLSM-Untersuchung wurden 10 µL Bakterienlösung auf einen hochreinen Objektträger aufgebracht, mit einem Deckglas versehen und die LSM-Aufnahmen der FITC-gelabelten Peptide mit einem 488 nm Laser durchgeführt.

3.2.3.4 Proteolytische Stabilitätsuntersuchungen

3.2.3.4.1 Kalibrierung

Zunächst wurde für die späteren Stabilitätsuntersuchungen eine Kalibrierung der RP-HPLC-Trennung mit verschiedenen Konzentrationen der Leitstruktur durchgeführt. Hierzu wurde die nachfolgend beschriebene Verdünnungsreihe angesetzt und mittels RP-HPLC analysiert.

Zur Analyse wurden 25 µL Probe in die Probenschleife injiziert und bei einem Fluss von 0,750 mL/min über eine C18 RP-HPLC-Säule (EC 125/3 Nucleodur 100-3 C18ec, Fa. Macherey&Nagel) aufgetrennt. Die Analyse erfolgte in Duplikaten.

Tabelle 33: Verdünnungsstufen und HP01 Konzentrationen zur Kalibrierung

<i>Probe</i>	<i>Konzentration [µg/mL]</i>
Stammlösung HP01	1000
Verdünnung 1:2	500
Verdünnung 1:5	200
Verdünnung 1:10	100
Verdünnung 1:50	20
Verdünnung 1:100	10
Verdünnung 1:200	5

Tabelle 34: Laufmittel-Gradient zur Analytik von HP01

Zeit [min]	Laufmittel A [%] (H₂O + 0,08 % TFA)	Laufmittel B [%] (ACN + 10 % H₂O + 0,08 % TFA)
0	95	5
0,25	95	5
10	70	30
12	30	70
12,5	5	95
15	5	95
15,5	95	5
17	95	5

3.2.3.4.2 Proteasestabilität der Leitstruktur HP01 in Puffersystemen

Es wurde die proteolytische Stabilität von HP01 gegenüber Serinproteasen, Cysteinproteasen, Aspartylproteasen und Matrixmetalloproteasen im jeweiligen Puffersystem untersucht.

Zunächst wurde eine 2 µM Stammlösung von HP01 in DMSO hergestellt. Für den Inkubationsansatz mit dem jeweiligen Enzym wurden 10 µL Peptidlösung (20 µM in DMSO), 30 µL H₂O, 50 µL des entsprechenden Puffers und 10 µL Enzym in ein Reaktionsgefäß überführt und bei entsprechendem Temperaturoptimum für 48 h inkubiert, wobei nach 1 h, 2 h, 5 h, 24 h und 48 h jeweils 10 µL Probe entnommen wurden und durch Zugabe von 90 µL der entsprechenden Quenching-Lösung abgestoppt wurde. 25 µL der Aliquote wurde schließlich mittels RP-HPLC aufgetrennt und analysiert.

Die exakte Zusammensetzung des jeweiligen Puffersystems und die Enzymkonzentration ist Tabelle 35 zu entnehmen.

Tabelle 35: Übersicht der Versuchsbedingungen und Reaktionsansätze zur Proteasestabilität von HP01 in wässriger Umgebung

Enzym	Konzentration _{Enzym} [mg/mL]	Puffer	pH-Wert	Temperatur [°C]	Quenching-Lösung
Chymotrypsin	0,1	10 mM Phosphatpuffer	7,4	30	H ₂ O + 0,08 % TFA
Trypsin	0,5	100 mM NH ₄ HCO ₃ + 0,1 mM CaCl ₂	8,0	37	H ₂ O + 0,08 % TFA
Urokinase	0,2	TBS-Puffer (20 mM Tris + 50 mM NaCl)	7,4	37	H ₂ O + 0,08 % TFA
Thrombin	0,1	TBS-Puffer (20 mM Tris + 50 mM NaCl)	7,4	37	H ₂ O + 0,08 % TFA
Pepsin	0,29	10 mM Acetatpuffer	4,0	30	2 % NH ₃
Papain	0,5	100 mM NH ₄ HCO ₃ + 1 mM DTT + 0,1 mM EDTA	7,5	37	H ₂ O + 0,08 % TFA
Collagenase	1,0	PBS-Puffer	7,4	37	H ₂ O + 0,08 % TFA

3.2.3.4.3 Stabilität der Leitstruktur HP01 in Humanserum

- **Serumgewinnung**

Zur Serumgewinnung wurden 10 mL humanes Vollblut nach Blutentnahme in einem Serumröhrchen zur Gerinnung für 50 min ruhen gelassen. Im Anschluss wurde das geronnene Blut zur Abtrennung der restlichen zellulären Bestandteile für 10 min bei 1400**g* zentrifugiert und das so gewonnene Serum bei -20 °C gelagert.

- **Serumstabilität von HP01**

Um die Proteasestabilität in Serum zu untersuchen wurde zunächst 1 mL des Serums aufgetaut und zur Entfernung der Lipide bei 15.000**g* für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden 800 µL des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, für 10 min bei 37 °C vortemperiert und schließlich mit 200 µL einer 10 mM HP01-Peptidlösung versetzt. Der Reaktionsansatz wurde nun für insgesamt 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach den Zeitpunkten 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, und 24 h wurde jeweils 100 µL Probe entnommen, mit 20 µL 15 %iger TCA versetzt und schließlich bei 4 °C für 15 min zur Fällung der Serumproteine inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (15.000**g*, 10 min), der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß dekantiert und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die so gewonnenen Proben wurden abschließend nach vollständigem Auftauen 1:8 mit ddH₂O verdünnt, sterilfiltriert und 25 µL mittels RP-HPLC wie unter 3.2.3.4.1 beschrieben analysiert.

3.2.3.4.4 Stabilität im künstlichen Magensaft (*Simulated Gastric Fluid*; SGF)

Für Untersuchungen zur proteolytische Stabilität von HP01 im künstlichen Magensaft wurde zunächst eine SGF-Lösung (0,2 % (m/v) NaCl, 0,32 % (m/v) Pepsin, 20 % (v/v) 0,1 M HCl, pH 1-1,2) und eine 20 µM HP01-Stammlösung in ddH₂O hergestellt. Von der SGF-Lösung wurden 450 µL in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 37 °C bei 300 rpm auf einem Thermoschüttler für 10 min preinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µL HP01-Peptidlösung und die Ansätze wurden für 2 h bzw. 24 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der pH-Wert mit 22 µL 2 M NaOH neutralisiert und 25 µL jedes Ansatzes mittels RP-HPLC analysiert.

3.2.4 Mikrobiologische Methoden

3.2.4.1 Antimikrobielle Aktivität mittels Mikrodilution

Theorie:

Der Test auf antibakterielle Aktivität erfolgte in Anlehnung an die CLSI Guideline M31-A2 (NCCLS 2002). Hierbei wird die wachstumshemmende Wirkung von Antibiotika auf eine Bakteriensuspension im Mikrotiterplattenformat untersucht. Ziel ist die Definition einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) engl. *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) eines Wirkstoffes zur Beurteilung hinsichtlich der Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber einer Testsubstanz. Durch serielle Verdünnung erfolgt die Substanzkonzentrationsbestimmung, bei der das Bakterienwachstum unter den gegebenen Bedingungen komplett unterdrückt ist. Die Auswertung dieses Tests erfolgt in der Regel durch visuelle Inspektion der durch die Bakteriensuspension verursachten Trübung, oder photometrisch über eine Messung bei 600 nm. Dies lässt somit eine quantitative Aussage über die MIC zu.

Durchführung:

Von den Testsubstanzen wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt und ein Konzentrationsbereich von 1000–31,25 µg/mL durch eine 2ⁿ- Verdünnungsreihe in sterilem PBS erzeugt. Für den Mikrodilutionsassay wurden 20 µL Testsubstanz pro *Well* in eine 96-*Well*-Mikrotiterplatte vorgelegt. Die so vorbereiteten Platten wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Von dem jeweiligen grampositiven oder gramnegativen Referenz- oder Teststamm wurde zunächst in Müller-Hinton-Boullion (MHB) eine Übernachtskultur angeimpft und für 18-20 Stunden bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden mit frischem MHB ein Inokulum mit 1-2x10⁷ CFU/mL hergestellt, jeweils 100 µL Bakteriensuspension zu den vorgelegten 20 µL Wirkstoff pipettiert und abgedeckt unter leichtem Schütteln bei 37 °C für weitere 18-24 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden 16 µg/mL Gentamycin mitgeführt.

Am dritten Tag der Inkubationsreihe wurden die Platten schließlich photometrisch bei 600 nm vermessen. Die prozentuale Wachstumsinhibition wurde mit folgender Gleichung (11) bestimmt:

$$\text{Wachstumshemmung (\%)} = 1 - \left(\frac{1}{OD600_{ungehemmt} - OD600_{blank}} * (OD600_{gehemmt} - OD600_{blank}) \right) \quad (11)$$

mit

$OD600_{blank}$ steriles Medium ohne Bakterien
 $OD600_{ungehemmt}$ ungehemmtes Bakterienwachstum ohne Testsubstanz nach 24 h
 $OD600_{gehemmt}$ durch jeweilige Substanz gehemmtes Bakterienwachstum nach 24 h

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Bakteriensuspension												
B	Bakteriensuspension	TC C1	TC C1	TC C1	Bakteriensuspension	TC C1	TC C1	TC C1	Bakteriensuspension	TC C1	TC C1	TC C1	
C		TC C2	TC C2	TC C2		TC C2	TC C2	TC C2		TC C2	TC C2	TC C2	TC C2
D		TC C3	TC C3	TC C3		TC C3	TC C3	TC C3		TC C3	TC C3	TC C3	TC C3
E		TC C4	TC C4	TC C4		TC C4	TC C4	TC C4		TC C4	TC C4	TC C4	TC C4
F		TC C5	TC C5	TC C5		TC C5	TC C5	TC C5		TC C5	TC C5	TC C5	TC C5
G		TC C6	TC C6	TC C6		TC C6	TC C6	TC C6		TC C6	TC C6	TC C6	TC C6
H	Bakteriensuspension									PK 1	PK 1	PK 1	

Abbildung 21: Plattenbelegungsplan für Mikrodilutionsassay nach CLSI M31-A2; mit TC= Testcompound, PK= Positivkontrolle, C= Konzentration

3.2.4.2 In-vivo-Aktivität im Gallerienmodell

Theorie:

Eines der am häufigsten eingesetzten Studienmodelle für mikrobielle Infektionen ist das murine Modell. Allerdings gibt es dort ethische, finanzielle und logistische Hürden, die mit dem Einsatz von Nagetieren als Infektionsmodell verbunden sind. Hierzu gehört unter anderem die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Anzahl von Tieren, die erforderlich ist, um statistisch relevante Daten zu erhalten. Ein weiterer Punkt ist hier auch die bei Säugetieren vergleichsweise lange Reproduktionszeit, die sich ungünstig auf die Dauer von Experimenten auswirkt. In jüngster Zeit hat sich der Einsatz von Larven der großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*) als alternatives Modell zur Untersuchung mikrobieller Infektionen etabliert. Die steigende Anzahl an wissenschaftlichen Publikationen zeigt die zunehmende Popularität dieses Infektionsmodells (Ramarao et al. 2012).

G. mellonella ist ein Insekt aus der Ordnung Lepidoptera und gehört der Familie *Pyralidae* (Schneckenmotten) an. Im Tiermodell werden die Raupenlarven und nicht die erwachsene Motte eingesetzt. Darüber hinaus bedarf die Verwendung von *G. mellonella* keiner ethischen Genehmigung und ihre kurze Lebensdauer von wenigen Tagen machen sie ideal für den Einsatz im Bereich der Hochdurchsatzstudien. Im Gegensatz zu anderen wirbellosen Tiermodellen wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* können *G. mellonella*-Larven bei 37 °C überleben und ermöglichen daher die Untersuchung von temperaturabhängigen mikrobielle Virulenzfaktoren (Konkel und Tilly 2000).

Die angeborene Immunantwort von Insekten besteht ebenfalls aus zwei Hauptelementen, dem zellulären und dem humorale Immunsystem. Die zelluläre Reaktion wird durch Phagozyten vermittelt. Im Hämolymphe der Insekten befinden sich Hämocyten, die analog zu Säugetieren-Blutzellen agieren. Diese Zellen sind nicht nur an der Phagozytose beteiligt, sondern greifen auch in der Blutgerinnung ein. Die humorale Reaktion wird durch einen löslichen Effektor gesteuert. Hierzu zählen Moleküle, die den Erreger immobilisieren oder abtöten, wie antimikrobielle Peptide und komplementähnliche Proteine (Boman und Hultmark 1987).

Für experimentelle Studien im Infektionsmodell werden Tiere, welche sich seit fünf Tagen im Larvenstadium befinden, eingesetzt. Sie haben eine Größe von 2 bis 2,5 cm und besitzen eine hellbeige Farbe. Die Larven können vor dem Einsatz bei 15 °C gelagert werden und es empfiehlt sich, die Larven 24 Stunden vor der Infektion auszuhungern. Der häufigste Infektionsweg ist die intrahämokoelische Injektion durch die Haut (Konkel und Tilly 2000).

Durchführung:

Für die Infektionsversuche im Gallerienmodell wurde zunächst eine Übernachtskultur des humanpathogenen *E. coli* Stammes H132 hergestellt. Hierzu wurde ein Inokulum von 10 mL LB-Medium mit 20 µg/mL Cefotaxim in einem 100 mL Erlenmeyerkolben angesetzt und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach 16-20 h Inkubationszeit wurde am darauffolgenden Tag die Übernachtskultur mit frischem Medium (LB-Medium ohne Cefotaxim) 1:40 verdünnt. Die so gewonnene Subkultur wurde bis zum Erreichen einer $OD_{600}=1$ für weiterer 2 h unter gleichbleibenden Bedingungen weiter inkubiert. Von dieser Subkultur wurden anschließend 1 mL Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 3100*g und RT abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet zweimal mit 0,9 % NaCl (steril) gewaschen und abermals abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,9 %iger steriler Kochsalzlösung resuspendiert und zur Herstellung der in Tabelle 36 aufgeführten Infektionslösungen genutzt.

Bis zum Start der Infektionsversuche wurden die Tiere täglich auf Vitalität überprüft und auf frischem Futter in einer Petrischale bei 23 °C im Dunkeln gelagert. Die Experimente wurden bei einem Larvengewicht von 200-250 mg gestartet. Für jedes Experiment wurden zehn Larven infiziert. Die Injektion von jeweils 10 µL der jeweiligen Lösungen erfolgte mittels eines Mikroapplikators in das Hämocoleum der Larven. Die infizierten Larven wurden auf frischem Futter in einer Petrischale bei 37°C im Brutschrank gelagert, täglich die Vitalität durch Überprüfen ihrer Reaktion auf Berührung kontrolliert und gezählt.

Tabelle 36: Zusammensetzungen der im Infektionslösungen im In-vivo-Gallerienmodell

Probenbezeichnung	Zusammensetzung
Positivkontrolle	Bakteriensuspension 1:2 verdünnt mit 0,9 %iger steriler Kochsalzlösung
Infektionslösungen mit HP01	Bakteriensuspension 1:2 verdünnt mit 0,9 %iger steriler Kochsalzlösung und HP01 in den Konzentrationen 500 µg/mL, 100 µg/mL und 20 µg/mL
Peptidlösungen für Tox-Test	HP01-Lösungen mit den Konzentrationen 500 µg/mL, 100 µg/mL und 20 µg/ mL in sterilen 0,9 %iger Kochsalzlösung
Negativkontrolle	0,9 %iger sterile Kochsalzlösung

Parallel zur Infektion der Larven wurden eine 10-fach-fortlaufende Verdünnungsreihe über insgesamt sechs Stufen der Bakteriensuspension hergestellt und von den beiden letzten Stufen jeweils 100 mL auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Ebenso wurde zur Berechnung der realen Infektionsdosis eine 10-fach-fortlaufende Verdünnungsreihe der Infektionslösung mit einer Konzentration von 500 µg/mL hergestellt und die Verdünnungsstufe 10^{-4} auf LB-Agar ausplattiert. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die koloniebildenden Einheiten durch Auszählung bestimmt.

3.2.5 Methoden der Zellkulturtechnik

3.2.5.1 Kultivierung von HeLa 229-Zellen

Epithelzellen, zu denen auch die Zelllinie HeLa 229 gehört, werden standardgemäß zur Testung der zytotoxischen Unbedenklichkeit eingesetzt und gehören heute zu den Routinemethoden in der präklinischen Wirkstoffforschung. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das zytotoxikologische Potential von HP01 und dessen Derivate an dieser Zelllinie getestet.

- **Auftauen der Zellen**

Das Auftauen der Zellen sollte schnell erfolgen. Die Kryoröhrchen mit je 10^7 HeLa 229- Zellen/mL wurden dem Behälter mit flüssigem Stickstoff entnommen und in ein Wasserbad mit 37 °C überführt. Hier wurden sie solange inkubiert, bis gerade die letzten Eiskristalle aufgelöst waren. Anschließend erfolgte eine rasche Überführung des gesamten Inhaltes in ein mit 20 mL frischem, vorgewärmten Medium gefülltes Zentrifugenröhrchen und eine kurze Zentrifugation bei 300*g. Schließlich wurden die Zellen in frischen Medium resuspendiert, ein Aliquot von 0,1 mL zur Vitalitätsprüfung mit Trypanblau entnommen und die restlichen Zellen in entsprechende Kulturgefäße ausgesäht. Der erste Mediumwechsel erfolgte aufgrund des DMSO-Frostschutzzusatzes im Einfriermedium bereits nach 24h.

- Vitalitätstestung mittels Trypanblau

Als Routineuntersuchung der Vitalität von Zellen bewähren sich seit langem Testsysteme, welche darauf beruhen, dass bei lebenden Zellen bestimmte Farbstoffe nicht in das Zellinnere gelangen, während sich tote Zellen mit den betreffenden Farbstoffen anfärben lassen. Für die Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau, einem sauren Farbstoff, welcher als Anion sehr leicht an Proteine bindet, wurde die Zellsuspension (0,1 mL) mit 3,6 mL sterilem PBS zunächst verdünnt und schließlich zu 2,7 mL einer bereits vorgewärmten 0,5 %igen Trypanblaulösung gegeben. Dieser Ansatz wurde durchmischt, für 2-5 min bei 37 °C inkubiert und in der Neubauerzählkammer ausgezählt. Hier erschienen lebende Zellen farblos, tote hingegen waren durchgängig blau angefärbt. Die Vitalität berechnet sich nun durch folgende Gleichung (12):

$$\text{lebende Zellen (\%)} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} * 100 \quad (12)$$

- Mediumwechsel

Der Mediumwechsel der adhärennten HeLa-Zellen erfolgte alle zwei Tage. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Kulturen auf mögliche mikrobielle Kontaminationen mit einem Mikroskop inspiziert und nur eindeutig sterile Kulturen wurden weiterbearbeitet.

Dazu wurde das verbrauchte Kulturmedium unter der *Laminar-Flow*-Bank abgesaugt oder abpipettiert, die Zellen mit sterilem vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend frisches, vorgewärmtes Medium unmittelbar wieder zugefügt. Das Volumen des Mediums richtete sich dabei nach der Kulturoberfläche und wurde üblicherweise in einem Verhältnis von 0,2 – 0,5 mL/cm² Kultivierungsfläche hinzugefügt.

- Passagieren mit Trypsin-EDTA-Lösung

Zunächst wurden auch hier die Kulturen auf mögliche Kontaminationen hin mikroskopiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend eine vortemperierte Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA, 37 °C) zugegeben. Das Volumen der Lösung wurde so gewählt, dass der Zellrasen gerade so vollständig bedeckt war. Die Zellen wurden nun für 3-10 min bis zur vollständigen Ablösung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. In einem sterilen Zentrifugenröhrchen wurde die doppelte Menge an frischem Medium mit Serumzusatz vorgelegt, die abgelöste Zellsuspension überführt und für 5 min bei 300*g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend dekantiert, die Zellen in frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der *Neubauer improved* Zellkammer bestimmt. Abschließend wurde die Zellen mit einer für das Kulturgefäß üblichen Zellzahl in neue Kulturflaschen ausgesät.

3.2.5.2 Zytotoxikologische Unbedenklichkeit mittels MTT-Assay

Mittels einfacher biochemischer Tests kann die Aktivität der mitochondrialen und cytosolischen Dehydrogenasen lebender Zellen bestimmt werden und somit auf eine mögliche zytotoxische Wirkung von Substanzen geschlossen werden.

Das schwach gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) lagert sich in den Zellen ein, wobei sein Tetrazoliumring durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System im Cytosol und auch von aktiven Mitochondrien gespalten werden kann, wobei wasserunlösliche, dunkelblaue Formazankristalle entstehen (Tominaga et al. 1999; Mosmann 1983). Diese Formazankristalle können nach erfolgter Zellyse photometrisch bestimmt werden.

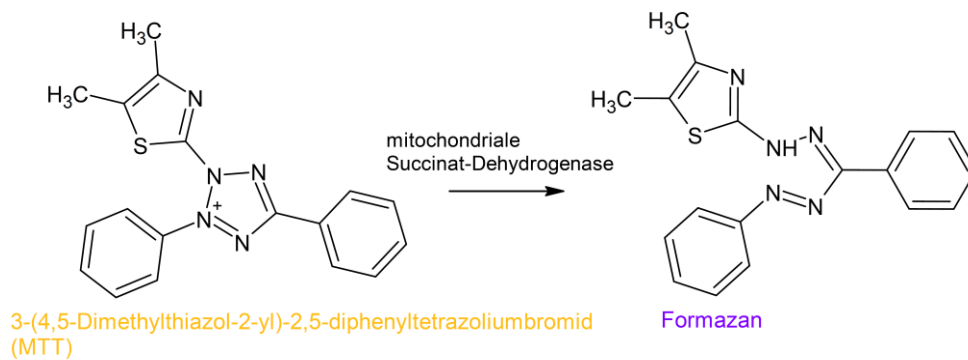


Abbildung 22: Prinzip des MTT-Tests: Die Umwandlung von MTT (gelb) in Formazan (violett) durch NADH-abhängige Reduktasen

Für die Zytotox-Studien wurden konfluent gewachsene HeLa229-Zellen wie oben beschrieben passagiert und je 400 µL mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen/mL in 24-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden nun für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden zunächst sterile Verdünnungen der Testsubstanzen sowie der Kontrollsubstanzen in Medium hergestellt, das Medium aus allen Wells abpipettiert und je 400 µL der zu testenden Substanzen wie in Abbildung 23 gezeigt zugefügt. Es erfolgte wiederum eine Inkubation für 25 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Am dritten Tag wurde zunächst eine Thiazolylblau-Lösung (1 mg/mL MTT) in PBS angesetzt und sterilgefiltert, das Medium aus den Wells abgenommen und jeweils 50 µL der Thiazolyl-Lösung zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation von 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂, das Medium wurde anschließend entfernt und zur Solubilisierung der Zellen 100 mL DMSO-Lösung zugefügt. Nach 5min wurde die 24-Well-Platte photometrisch bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm vermessen. Als Negativkontrolle wurde PBS, als Positivkontrolle 2,5 mg/mL SDS bzw. 10 µM Doxorubicin eingesetzt.

	1	2	3	4	5	6
A	Medium	Medium	Medium	Medium und Zellen	Medium und Zellen	Medium und Zellen
B	Substanz C1	Substanz C1	Substanz C1	PK SDS	PK SDS	PK SDS
C	Substanz C2	Substanz C2	Substanz C2	PK Dox	PK Dox	PK Dox
D	Substanz C3	Substanz C3	Substanz C3	NK PBS	NK PBS	NK PBS

Abbildung 23: Pipettierschema zur Plattenbelegung der 24-Well-Platten für die Zytotox-Studie

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Identifizierung und Isolierung eines neuen antimikrobiellen Peptides aus *Hirudo verbana*

4.1.1 Extraktion, Gewinnung und Fraktionierung des Speichels des medizinischen Blutegels

Die Gewinnung des Blutegelspeichels erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben mit einer NaCl-Arg-Lösung. Der von einzelnen Tieren gewonnene Speichel wurde zunächst vereinigt und für 2 h unter Rühren im Eisbad homogenisiert. Von 100 Egeln wurden insgesamt ca. 300 mL Egelsaliva wie beschrieben gewonnen. Die homogene Lösung wurde nun mittels 0,22 µm Spritzenaufsatzfilter sterilfiltriert, ein Aliquot von 500 µL zur Proteinbestimmung entnommen und der Rest in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gewonnene Aliquot wurde wie in 3.2.1 beschrieben über Nacht lyophilisiert. Anschließend wurde das Lyophilisat in 20 mL steriler PBS-Lösung resuspendiert. 16 mL dieser Lösung wurden mittels Ultrafiltration wie im Methodenteil 3.2.1 beschrieben fraktioniert, anschließend eine Proteinbestimmung mittels BCA-Assay für die Gesamtsaliva sowie für die durch Ultrafiltration gewonnenen Molekulargewichtsfractionen durchgeführt und die Gesamtsaliva sowie die Fraktionen auf ihre antimikrobielle Aktivität gegenüber grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen untersucht. Der optimierte Workflow zur Probengewinnung und -vorbereitung ist in Abbildung 24 dargestellt.

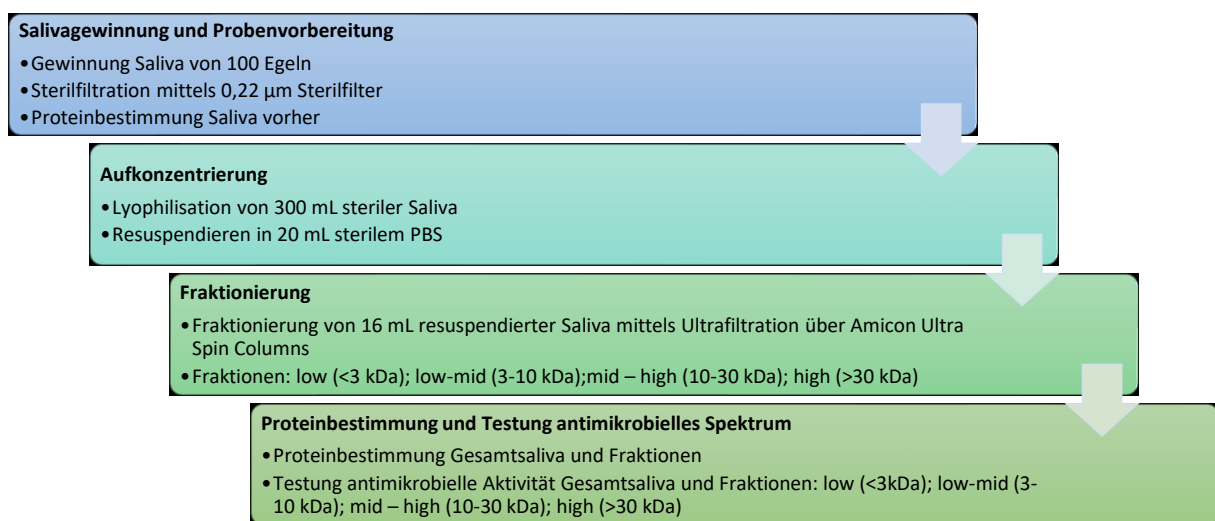


Abbildung 24: Flowchart zur optimierten Gewinnung der Saliva und deren Molekulargewichtsfractionen zur weiteren Bearbeitung

Die Ergebnisse der Protein-/Peptidbestimmung aller Fraktionen sowie der Gesamtsaliva ist nachfolgend in Abbildung 25 dargestellt.

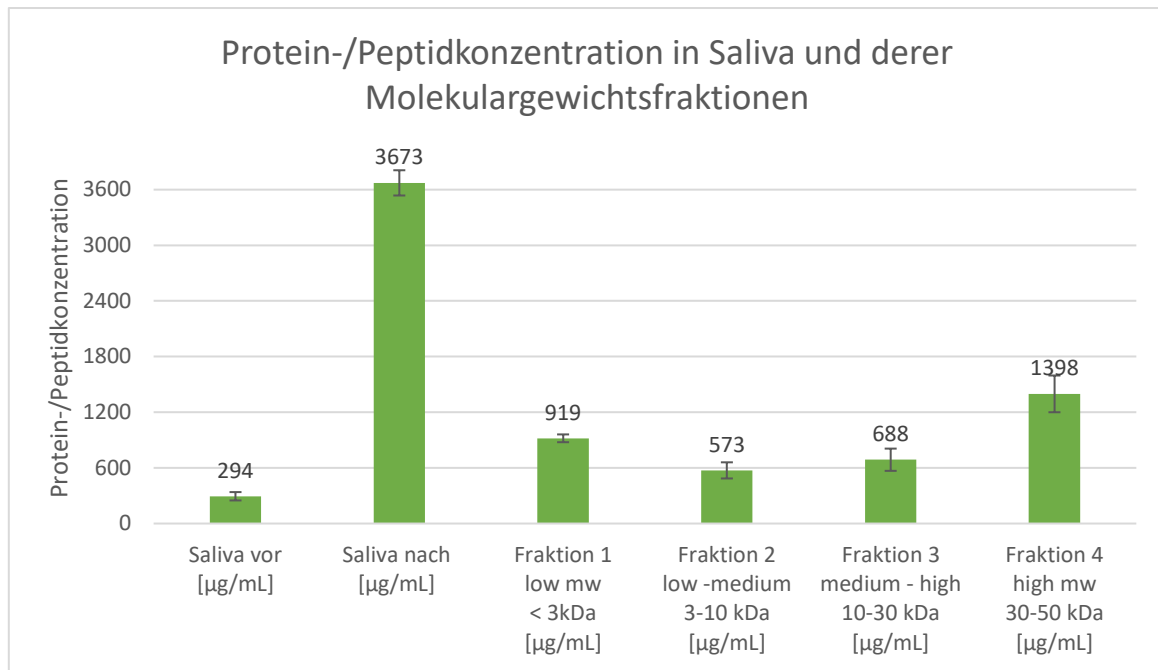


Abbildung 25: Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der einzelnen Ultrafiltrationsfraktionen sowie des gesamten Speichels vor als auch nach der Gefriertrocknung. Die Bestimmung der Protein-/Peptidkonzentration erfolgte mittels BCA-Assay in Triplikaten

Die Gesamtproteinkonzentration des Speichels vor Aufkonzentrierung durch Lyophilisation betrug 294 µg/mL. Untersuchungen zum Salivaproteom durch Baskova (Baskova et al. 2008a) und Nolte (Nolte 2011) postulieren das Vorhandensein von mehr als 200 verschiedenen Peptiden und Proteinen in diesem Material. Geht man von einer Gleichverteilung aus, entspräche dies einer Konzentration von ca. 1 µg/mL pro Substanz, was sehr wahrscheinlich unterhalb der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) für die antimikrobielle Aktivität liegt. Diese beträgt für hochpotente bekannte AMPs in der Regel zwischen 1-8 µg/mL. Daher wurde zunächst eine schonende Aufkonzentrierung durch Gefriertrocknung durchgeführt. Hier konnte die Gesamtproteinkonzentration mit 3673 µg/mL um den Faktor 12 gesteigert werden. 16 mL dieser aufkonzentrierten Saliva wurden schließlich mittels Ultrafiltration über *Spin columns* in vier unterschiedliche Molekulargewichtsfractionen aufgetrennt. Diese Fraktionen wurden ebenfalls mittels BCA-Assay auf die Gesamtproteinkonzentration hin untersucht. Fraktion vier mit einem Molekulargewichtsbereich von >30 kDa zeigte mit ca. 1400 µg/mL die höchste Proteinkonzentration. Vergleicht man dies mit Untersuchungen von Baskova (Baskova et al. 2008a) und Hildebrand (Hildebrandt und Lemke 2011), so entspricht dies den dort berichteten Ergebnissen. Ein Großteil der bereits bekannten Substanzen ebenso wie die durch Proteomuntersuchungen neu gefundenen Proteine im Speichel des medizinischen Blutegels finden sich im Molekulargewichtsbereich >30 kDa wieder, exemplarisch sind hier die Enzyme Collagenase (100 kDa) oder Apyrase (45 kDa) aber auch Modulatoren wie der Inhibitor des C1-Komplements (60-70 kDa) zu nennen. Im mittleren Molekulargewichtsbereich von 3-30 kDa finden sich in den beiden Fraktionen (3-10 kDa bzw. 10-30 kDa) insgesamt eine etwa ähnlich hohe Konzentration an Protein wie in der hochmolekularen Fraktion. In diesem Bereich findet sich der Großteil der bekannten Proteaseinhibitoren wie Hirudin (7,1 kDa), Eglin C (8,1 kDa), *Leech-derived tryptase inhibitor* (4,3 – 4,8 kDa) oder auch Enzyme wie die Hyaluronidase (27,5 kDa) oder Destabilase (12,6-12,9 kDa). Antimikrobielle Peptide und somit antimikrobielle Aktivität werden somit am wahrscheinlichsten in den beiden unteren Fraktionen erwartet. Die niedermolekulare

Fraktion <3 kDa weist einen Gehalt von ca. 920 µg/mL auf und spricht für das Vorhandensein vieler Peptide.

4.1.2 Antimikrobielle Effektivität der Gesamtsaliva und einzelner Fraktionen

Zunächst wurde die antimikrobielle Aktivität des gesamten Speichelsekrets des Blutegels gegenüber grampositiver sowie gramnegativer Bakterien getestet. Hierzu wurde *Escherichia coli* K12 als Referenzorganismus für gramnegative Erreger genutzt, *Mikrococcus luteus* diente als solcher für grampositive Bakterienspezies. Die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität erfolgte mittels Mikrodilutionsassay wie unter 3.2.4.1 beschrieben.

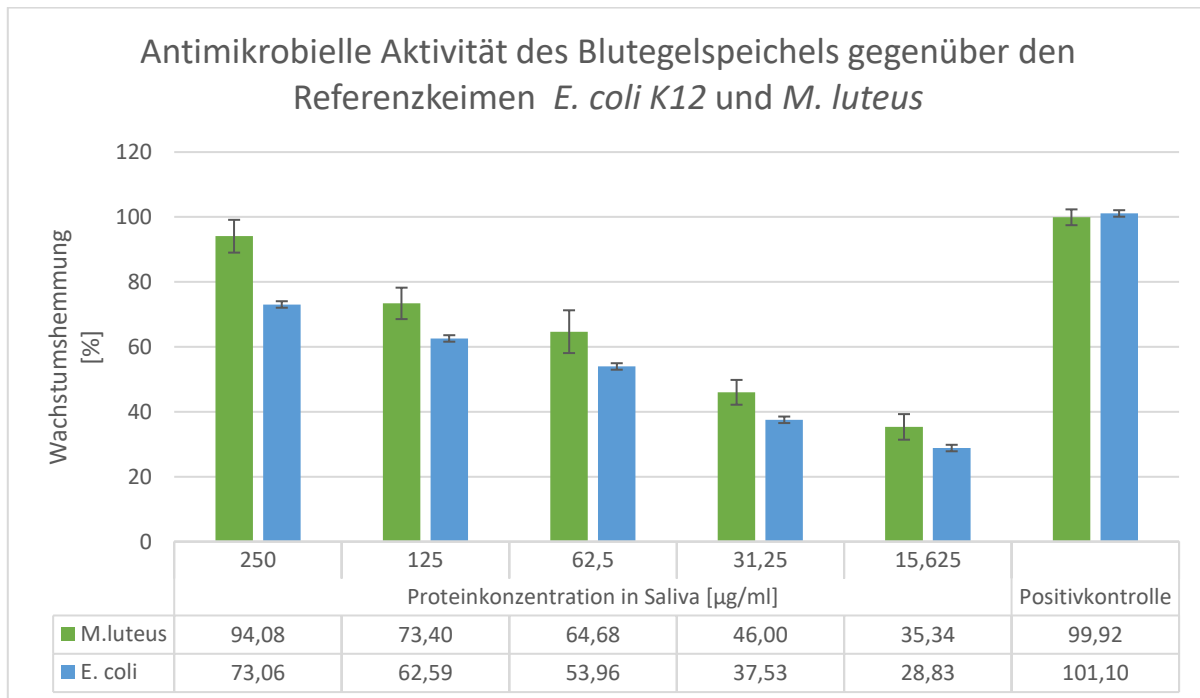


Abbildung 26: Untersuchung der antibakteriellen Wirkung der Gesamtsaliva gegenüber gramnegativen Erregern (*E. coli*; hellblau) und grampositiven Erregern (*M. luteus*; grün). Als positive Kontrollsubstanz wurde 16 µg/mL Gentamycin eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

Gegenüber grampositiven Bakterien wie *M. luteus* zeigte die Saliva des medizinischen Blutegels eine dosisabhängige Wachstumsreduktion (Abbildung 26). Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 250 µg/mL konnte eine Inhibition des Bakterienwachstums von 94 % erreicht werden. Verglichen mit der Positivkontrolle Gentamycin, einem Standardantibiotikum, welche bei einer Konzentration von 16 µg/mL ihre minimal inhibitorische Konzentration (MIC), erreicht, sind dies vielversprechende Ergebnisse für weitere Untersuchungen der Saliva. Diese bestätigen auch die Ergebnisse der antimikrobiellen Testung gegen gramnegative Erreger wie *E. coli* K12. Hier erreicht der Blutegelspeichel eine Inhibition des bakteriellen Wachstums von 73 % bei einer Konzentration von 250 µg/mL. In Abbildung 26 zeigt sich auch hier eine, für weitere Untersuchungen wichtige Dosisabhängigkeit.

Nach erfolgreicher Fraktionierung mit Hilfe der Ultrafiltrationseinheiten wurden auch die gewonnenen Fraktionen auf ihr antimikrobielles Potential gegenüber Erregern beider Gram-Gruppen im Mikrodilutionsassay getestet. Die Ergebnisse dieser Experimente finden sich in Abbildung 27.

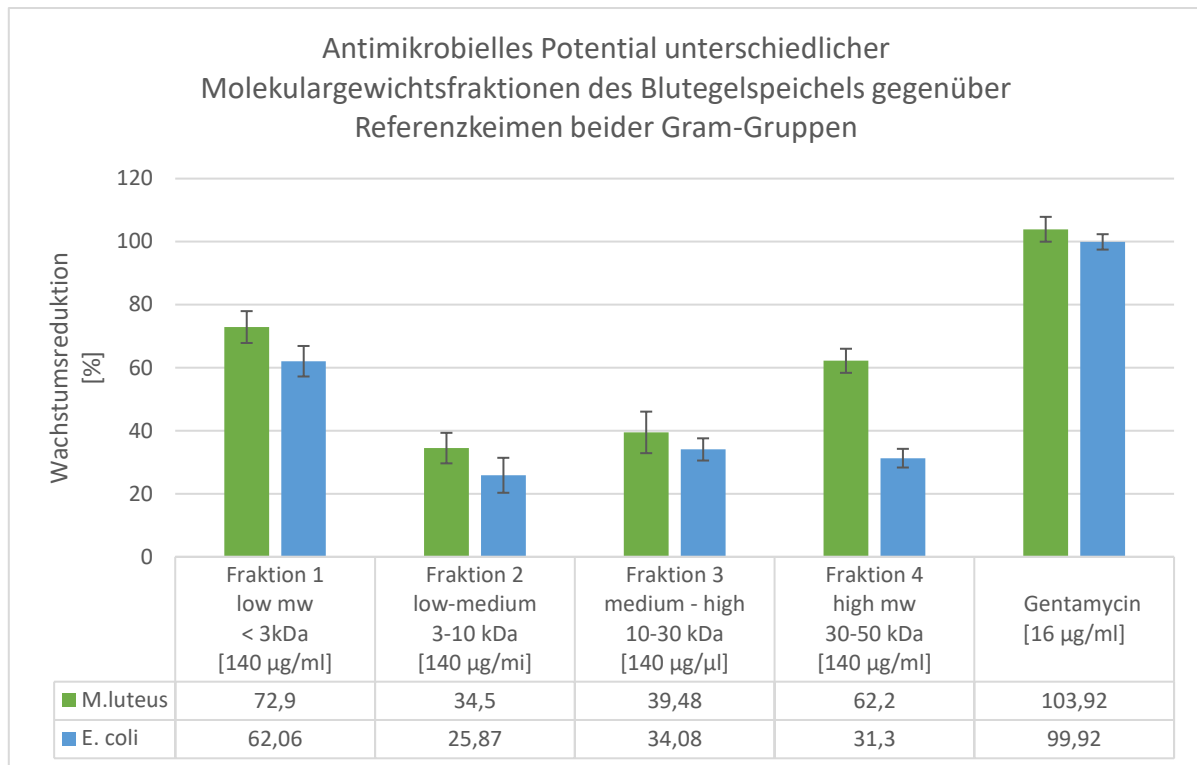


Abbildung 27: Wachstumshemmung einzelner Fraktionen des Blutegelspeichels gegenüber *E. coli* K12 und *M. luteus*. Als Positivkontrolle wurde Gentamycin eingesetzt, alle Messungen erfolgten in Triplikaten.

Betrachtet man zunächst die hochmolekulare Fraktion 4 mit Molekülen >30 kDa, so konnte bei einer eingesetzten Konzentration von 140 µg/mL eine Inhibition des bakteriellen Wachstums gegenüber dem grampositiven Erreger *M. luteus* von 73 % und gegenüber dem gramnegativen Erreger *E. coli* K12 von 62 % erreicht werden. Dies lässt auf das Vorhandensein von hochmolekularen Proteinen mit antimikrobieller Aktivität schließen.

Die mittelmolekularen Fraktionen 3 und 2 zeigten ein etwas schlechteres Ergebnis sowohl gegenüber *E. coli* K12 als auch *M. luteus*. Mit einer Wachstumshemmung von ca. 40 % gegenüber *M. luteus* und einer Hemmung von 35 % gegenüber *E. coli* K12 zeigte Fraktion 3 noch etwas höhere Aktivitäten verglichen mit Fraktion 2, welche gramnegative Erreger wie *E. coli* K12 mit 25 % im Wachstum hemmte und grampositive Erreger, hier *M. luteus*, mit 35 %. Diese antimikrobiellen Wirkungen könnten sich unter anderem auf bereits identifizierte Moleküle zurückführen lassen. So finden sich in diesen Fraktionen unter anderem das Enzym Destabilase, welche eine Lysozym-ähnliche Aktivität aufweist und somit die Hydrolyse der β-(1-4)-Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetyl-D-glucosaminresten in einem Peptidoglycan katalysiert. Auf diese Weise wird die Zellwandbiosynthese der Bakterien gehemmt. Ein bereits bekannter Wirkmechanismus antibakterieller Agenzien wie der des Lysozyms. Desweiteren ist dies ein Hinweis auf die bessere Wirksamkeit gegenüber dem grampositiven Erreger *M. luteus*, welche sich mit der Störung des Aufbaus der Zellwand erklären lässt.

Für die Identifizierung neuer antimikrobieller Leitstrukturen eignet sich insbesondere die niedermolekulare Fraktion 1. Die hierin befindlichen Substanzen mit einem Molekulargewicht <3 kDa könnten gute Kandidaten zur Entwicklung neuer Wirkstoffe darstellen. Diese Fraktion zeigte sowohl gegen *E. coli* K12 als auch gegen *M. luteus* die höchsten Wachstumsreduktionen aller vier Fraktionen.

Das bakterielle Wachstum von *E. coli* K12 konnte bei einer Gesamtproteinkonzentration von 140 µg/mL um 62 % gehemmt werden, gegenüber *M. luteus* sogar um 72 %. Dies lässt auf die Existenz von potenten antimikrobiell wirksamen Substanzen insbesondere antimikrobieller Peptide schließen. Diese Substanzgruppe wird als vielversprechende neue Molekülklasse seit einigen Jahren untersucht und rückt nun in Zeiten wachsender Antibiotikaresistenzen wieder in den Fokus der Forschung. Die in diesen ersten Versuchen erzielten Ergebnisse legen eine genauere Untersuchung der niedermolekularen Fraktion nahe.

4.1.3 Identifizierung des neuen antimikrobiellen Peptides aus *Hirudo verbana*

Auf Grund der positiven Ergebnisse aus 4.1.2 hinsichtlich der antimikrobiellen Aktivität der <3 kDa Fraktion sollte diese nun einem zweiten Aufreinigungsschritt unterzogen werden. Hierzu wurden insgesamt 200 µL der Fraktion mittels RP-HPLC über eine C18 Säule aufgereinigt und eine Peakfraktionierung durchgeführt

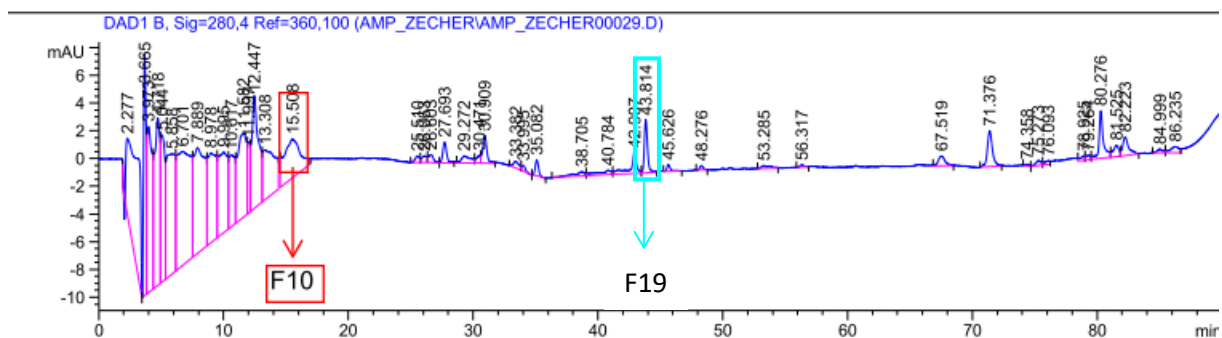


Abbildung 28: RP-HPLC Trennung von der <3 kDa-UF-Fraktion der Saliva aus *H. verbana* (Absorption bei 280 nm) Hier: F10-Fraktion, die das prolinereiche Peptid enthielt (RT=15,5 min; 10 % ACN)

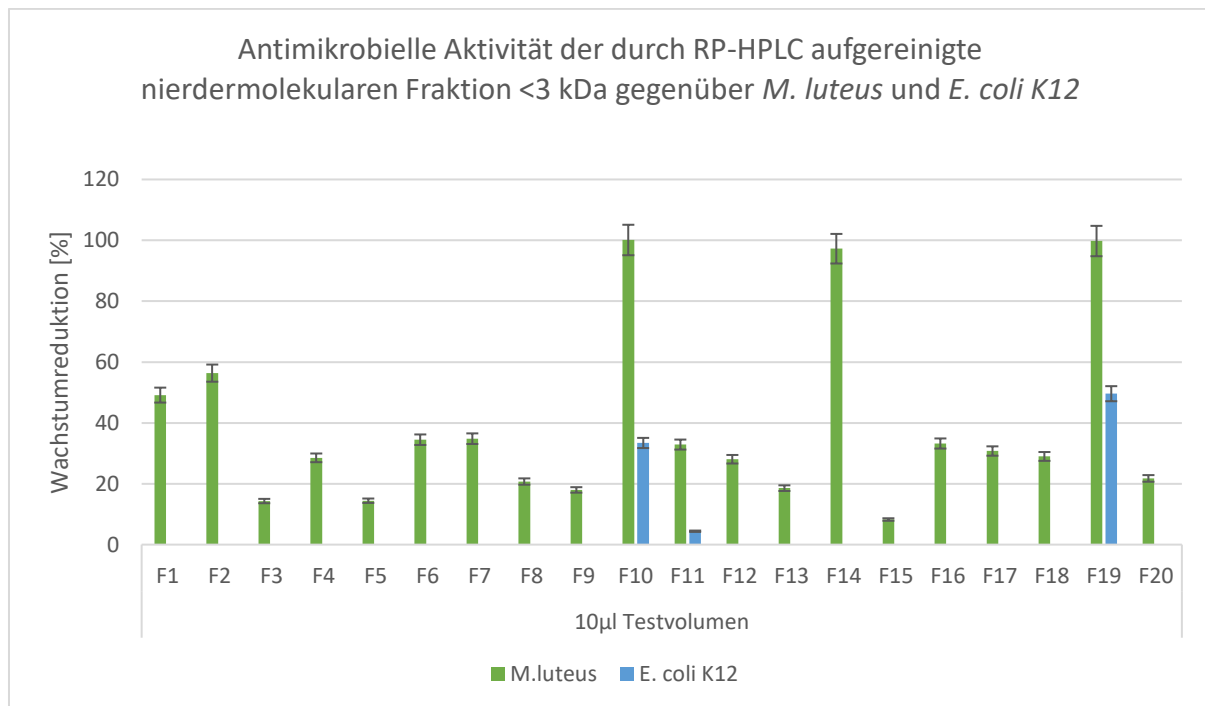


Abbildung 29: Wachstumsreduktion von *E. coli* K12 (blau) und *B. subtilis* (grün) durch die mittels RP-HPLC fraktionierten low mw <3 kDa UF Fraktion der Saliva aus *H. verbana* (n=3), Fraktion 10 und Fraktion 19 wurden weiter betrachtet.

Insgesamt konnten so zwanzig HPLC-Fractionen erzeugt werden, welche anschließend auf ihre antimikrobielle Aktivität gegenüber gramnegativen und grampositiven Bakterien untersucht wurden. Als Referenzkeim für die gramnegativen Bakterien diente wiederum *E. coli* K12 und für grampositive Bakterien *M. luteus*. Für den Einsatz im Mikrodilutionsassay musste das in den einzelnen HPLC-Fractionen vorhandene Acetonitril zunächst mittels eines Rotationsverdampfers bei einer Temperatur von 40 °C evaporiert werden, um einen etwaigen Effekt durch das Lösungsmittel Acetonitril ausschließen zu können. Die evaporierten HPLC-Proben wurden in Reinstwasser resuspendiert und 10 µL jeder Fraktion wurden auf mögliche antimikrobielle Aktivität untersucht.

In Abbildung 29 sind die Daten der Aktivitätstestung dargestellt.

Alle zwanzig HPLC-Fractionen zeigten gegenüber *M. luteus* teils signifikante Wachstumsreduktionen, wobei drei Fraktionen sogar eine 100 % Wachstumshemmung aufwiesen. Antimikrobielle Aktivität gegenüber dem gramnegativen Referenzkeim *E. coli* K12 zeigten allerdings nur zwei Fraktionen. Die Fraktion 10 wies ca. 40 % Wachstumsreduktion und Fraktion 19 sogar 50 % Wachstumshemmung auf. Diese beiden Fraktionen konnten interessanterweise auch gegen *M. luteus* die bereits angesprochenen MIC erreichen, was auf das Vorhandensein potenter antimikrobieller Peptide schließen ließ.

Beide Fraktionen wurden in einem nächsten Schritt massenspektrometrisch untersucht. Hierzu wurden die Proben zunächst über *StageTips* entsalzt, wie unter 3.2.3.1 beschrieben vorbereitet und anschließend über nLC-MS/MS mittels *Orbitrap Velos* analysiert. Die bioinformatische Auswertung erfolgte über *MaxQuant* und der *Andromeda Search Engine*. Hier wurden pro Fraktion mehrere interessante Peptide identifiziert.

Aufgrund ihres antimikrobiellen Profils wurde zunächst Fraktion 19 näher untersucht. In Abbildung 30 sind das nLC-Chromatogramm und das zugehörige Massenspektrum dargestellt.

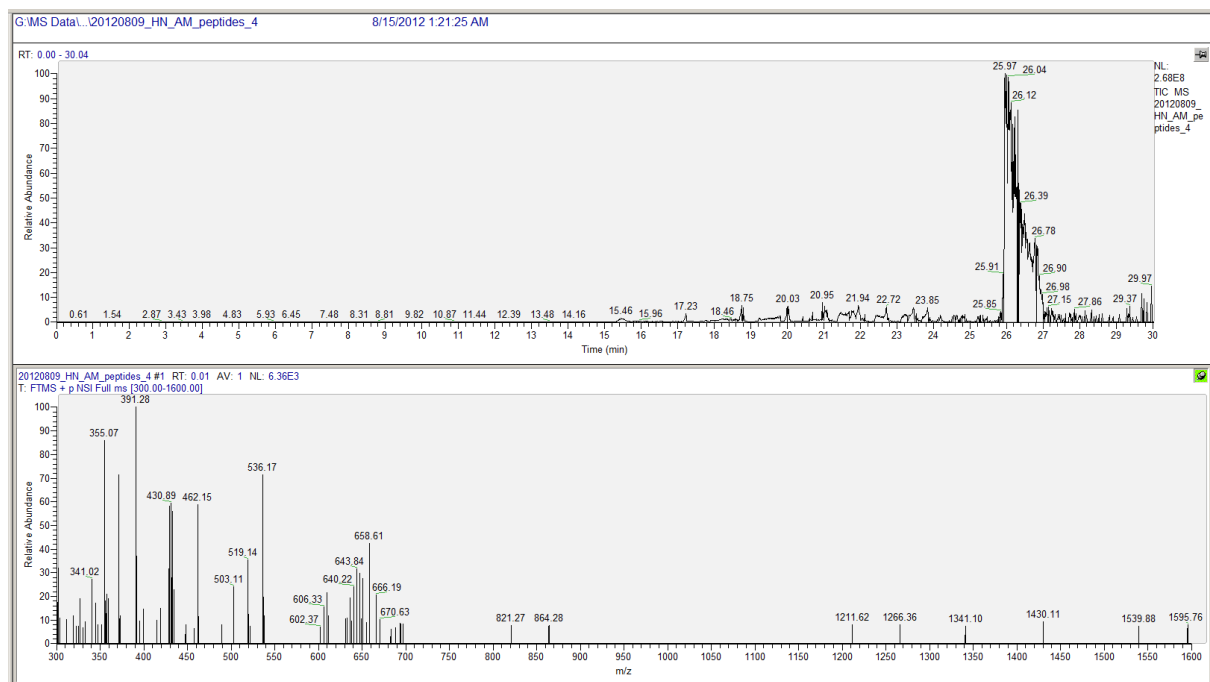


Abbildung 30: nLC-Chromatogramm (oben) und MS-Spektrum (unten) der RP-HPLC-Fraktion 19

Die in Tabelle 37 aufgeführten Sequenzen wurden mittels Web-basierten BLAST Algorithmus (Homepage NCBI) mit der Uniprot-Datenbank abgeglichen. Wie Tabelle 37 zeigt, konnten in Fraktion 19 Fragmente des humanen Dermicidin (>gi|16751921|ref|NP_444513.1| dermicidin preproprotein [Homo sapiens], Sequenz: MRFMTLLFLT ALAGALVCAY DPEAASAPGS GNPCHASAA QKENAGEDPG LARQAPKPRK QRSSLEKGL DGAKKAVGGL GKLKDAVED LESVGKGAVH DVKDAVLDSVL), einem antimikrobiell wirksamen Protein der menschlichen Haut, identifiziert werden (Schittek et al. 2001). Diese Fragmente könnten für die antimikrobielle Wirkung von Fraktion 19 verantwortlich sein und könnte während der Speichelgewinnung als Kontamination eingebracht worden sein.

Tabelle 37: LC-MS-Daten der aktiven RP-HPLC-Fraktion 19

Retention Time	m/z	Mass	Charge	DN Sequence	DN Score
18,998	653,36	1304,71	2	H{I L}VDEPQN{I L}{I L}	184,75
16,667	395,24	788,46	2	{I L}VTDTK{I L}	102,62
15,74	510,24	1018,47	2	AD[DG]KPAGAA{M(Ox) F}	125,23
15,716	521,28	1040,55	2	KSPVQPSAD{I L}	108,9
27,37	453,34	904,67	2	{I L}N{I L}{I L}{I L}	91,601
13,374	550,76	1099,51	2	GAGEDGP{I L}A	107,43
16,707	562,30	1122,58	2	AGTVN{I L}GGVAHQ	109,36
17,724	637,32	1272,62	2	EEVEEEKR{I L}	122,37
13,059	500,25	998,48	2	NAGEDPG{I L}AR	95,413

Weiterhin wurde HPLC-Fraktion 10 analysiert. Die aus dieser Analyse resultierenden Sequenzen sind in Tabelle 38 dargestellt. Ein hier ebenfalls durchgeführter Scan mittels NCBI Web-basierten BLAST Algorithmus konnte eine bisher unbekanntes prolinreiches Peptid mit der Sequenz [PG]PPPPGKPKQ identifizieren.

Tabelle 38: LC-MS-Daten zur aktiven Fraktion 10

Retention Time	m/z	Mass	Charge	DN Sequence	DN Score
17,748	637,32	1272,62	2	A(Ac)EEVEEEKR{I L}	161,24
17,239	385,25	768,48	2	{I L}PEAV{I L}K	93,774
18,973	653,36	1304,71	2	{I L}VDEPQN{I L}{I L}K	154,09
12,024	486,27	970,52	2	[PG]PPPPGKPKQ	103,29
14,223	599,81	1197,60	2	QEAEK{I L}G{[QG] [NA]}	124,87
14,002	437,26	872,51	2	NRVTQK	89,078
13,962	660,80	1319,59	2	KEDPD{M(Ox) F}AE{I L}{[EQ] [WA] [EK] [RT]}	133,34
13,366	550,76	1099,51	2	{[VA] [I L]G}[NS]GAEDGP{I L}A	106,36
16,579	395,24	788,46	2	{I L}VTDT{I L}K	75,993

Nachfolgend sind hierfür das LC-Chromatogramm (Abbildung 31), ein Ausschnitt des MS-Spektrums, (Abbildung 32) sowie das MS/MS-Spektrum (Abbildung 33) dargestellt. Das MS/MS Spektrums wurde über *MaxQuant* analysiert und das oben genannte prolinreiche Peptid mit einem DN Score von 113 *de novo* sequenziert. Die eckigen Klammern bei der Sequenzangabe zeigen, dass die Reihenfolge der Aminosäuresequenz am N-Terminus nicht eindeutig bestimmbar war, da keine Detektion des b1 bzw. y9 Ions möglich war. Dies wird aus dem MS/MS-Spektrum ersichtlich. Hier wurden ausschließlich die b und y Ionen nach der N-terminalen Sequenz PG detektiert. Aus einer Überlappung von b4 und b5 mit y6 und y5 folgt die detektierte Sequenz (Abbildung 33).

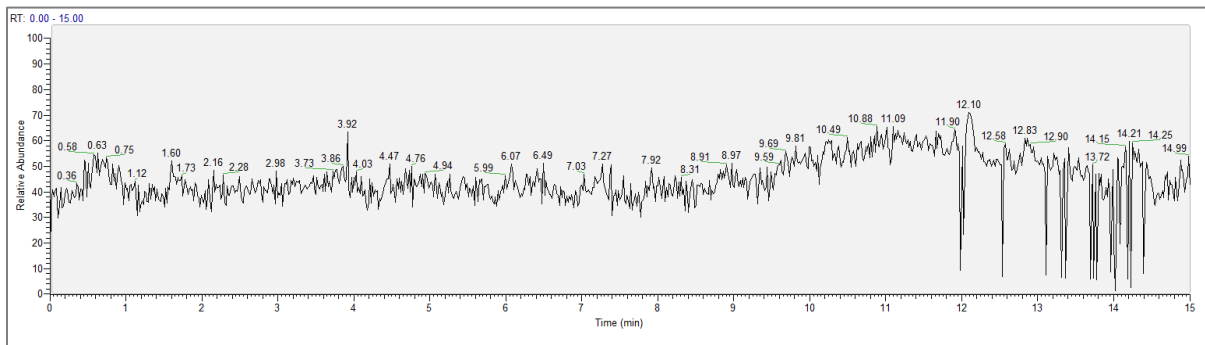


Abbildung 31: nLC Chromatogramm, relative Abundance (TIC 100 % 1E06) gegen die Zeit aufgetragen, exportiert aus Xcalibur 2.2.42 (Thermo Scientific Qual Browser), das Peptid [PG]PPPPGKPQ eluiert nach ca. 12.10 Minuten

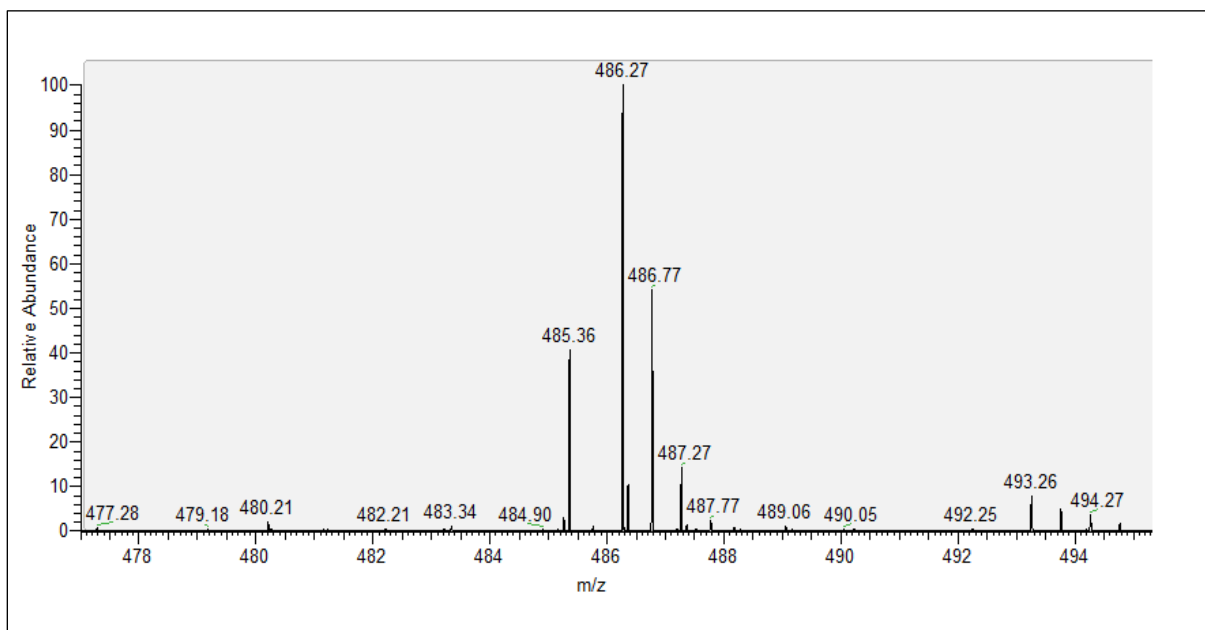


Abbildung 32: MS-Spektrum, Ausschnitt zwischen 475 und 500 m/z, hier gut zu erkennen: zweifach geladenes Peptid bei 486,27 m/z

Zur Überprüfung wurde hier noch eine Datenbanksuche mit dieser Sequenz durchgeführt, wobei die Ionen in dem MS/MS-Spektrum annotiert wurden. Hierzu wurde die neue Sequenz in eine mit in allen sechs Leseraster übersetzte *EST* Datenbank von *Hirudo verbana* implementiert. Die Validierung der Sequenz erfolgte über eine statistische Auswertung mittels *Andromeda Search Engine*.

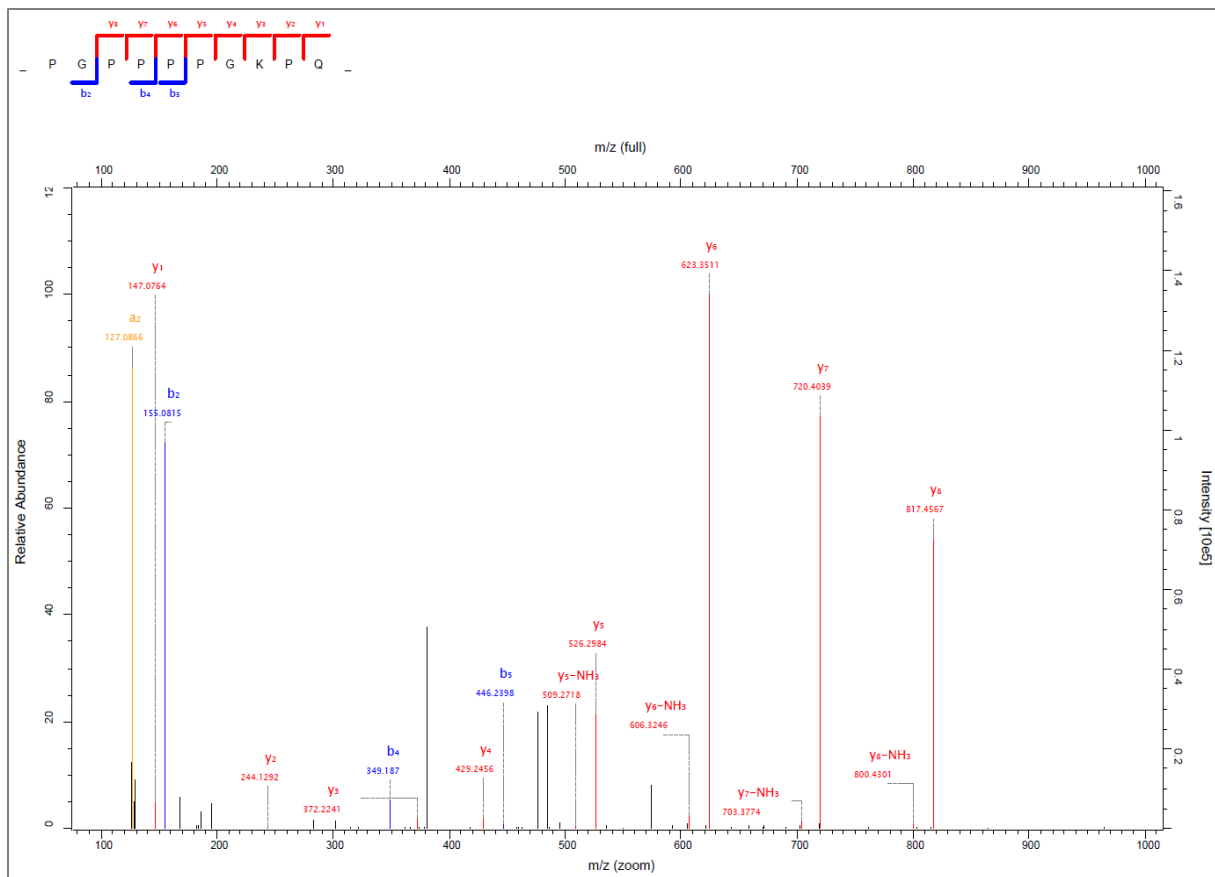


Abbildung 33: MS/MS Spektrum, identifiziert mit MaxQuant De-novo-Sequenzierung, DN Score 113

Die validierte Sequenz enthielt eine besonders hohe Anzahl an Prolinen (60 %) und konnte somit der Untergruppe der prolinreichen AMPs zugeordnet werden. Im Verhältnis zu anderen prolinreichen antimikrobiell wirksamen Peptiden, handelt es sich bei dem neu identifizierten Dekamer um ein vergleichsweise kurzes Peptid. Dies ist hinsichtlich der eingangs erwähnten Trends in der Wirkstoffentwicklung sehr interessant. Hier werden hauptsächlich niedermolekulare Substanzen gesucht, da sich diese in Bezug auf die Bioverfügbarkeit als sehr geeignet erwiesen (Böhm et al. 2002). Daher wurde das identifizierte Peptid [PG]PPPPGKQP mit einem Molekulargewicht von 970,52 Da als Leitstruktur für eine Weiterentwicklung ausgewählt.

Aufgrund der nicht eindeutigen Identifizierung der N-terminalen Sequenzfolge wurden im weiteren Verlauf der Arbeit beide Sequenzen PGPPPPGKQP (HP01) und GPPPPPGKQP (HP02) mittels Festphasensynthese chemisch synthetisiert und deren antimikrobielle Aktivität überprüft.

4.2 Synthese und Charakterisierung antimikrobieller Peptide

4.2.1 Chemische Synthese HP01/HP02

Die chemische Synthese beider Peptidvarianten HP 01 (PGPPPPGKQP) und HP02 (GPPPPPGKQP) aus der De-novo-Sequenzierung erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben über eine mikrowellenunterstützte Festphasensynthese mittels Fmoc-Chemie an *preloaded* Wang-Resins. Durch den Einsatz der *preloaded*

Resins kann die Ausbeute der Peptide gesteigert werden, da die Kopplung des ersten Aminosäuremonomers an das Trägerharz meist einen problembehafteten Schritt in der Peptidsynthese darstellt. Das Harz ist bereits mit der ersten C-terminalen α -aminogeschützten AS beladen. Dadurch werden die Schwierigkeiten bei der Kopplung der ersten AS umgangen, denn hierbei kommt es des Öfteren zur Epimerisierung, Dipeptidbildung und zu geringen Substitutionsraten (Amblard et al. 2006). Alle verwendeten AS sind sowohl mit einer temporären α -Amino- als auch mit Seitenkettenschutzgruppen versehen, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden.

Schon seit dem Beginn der SPPS wurde während der Synthese dem System Wärme zugeführt, um die Peptidbindungsbildung zu beschleunigen und die Kopplungseffizienz zu steigern (Behrendt et al. 2016). Im Jahr 1992 wurde erstmals von der Verwendung von Photonen im Mikrowellenbereich für die Peptidsynthese berichtet (Yu et al. 1992). Durch die Zuführung von Wärme bei der Synthese konnte die Kopplungszeit von 2-3 h bei Raumtemperatur (RT) auf 30 min bei einer Temperatur von 60 °C verkürzt werden. Die Einführung der Mikrowellenstrahlung verkürzte die Kopplungszeit noch einmal enorm auf weniger als 6 min und liegt heute bei ca. 3 min. Die Mikrowellenbestrahlung stellt, insbesondere durch das Einführen der Temperaturüberwachung, eine schnelle und gleichförmige Methode zur Erwärmung dar. Dies macht sich in einer verbesserten Reproduzierbarkeit in der SPPS bemerkbar (Pedersen et al. 2012). Mittlerweile geht der Trend jedoch dazu über, insbesondere bei einfachen Kopplungsreaktionen, auf die Erwärmung zu verzichten, denn durch die Erwärmung wird beispielsweise der Racemisierungsgrad erhöht

Eine weitere Möglichkeit, den Syntheserfolg zu erhöhen, besteht im *Capping* von freien Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid nach jedem Kopplungsschritt, um so den Einbau eines falschen Monomers im nächsten Kopplungsschritt zu verhindern.

Wie bereits erwähnt, werden bei der SPPS für eine Kopplung zweier Aminosäuren Aktivierungsreagenzien benötigt, die eine Aktivierung der Carboxylgruppe einer AS hervorrufen. Durch einen nucleophilen Angriff einer Aminogruppe einer anderen AS auf die Carboxylgruppe der aktivierten AS entsteht eine Peptidbindung. Die in der Peptidsynthese am häufigsten verwendeten Aktivierungsreagenzien sind Carbodiimide, wie N, N-Diisopropylcarbodiimid (DIC), welches in dieser Arbeit zum Einsatz kam. Carbodiimide enthalten zwei leicht basische Stickstoffatome, welche mit der Carboxylgruppe einer AS reagieren und so ein O-Acylisoharnstoff bilden. Dieser ist sehr reaktiv und reagiert leicht mit der Aminogruppe weiteren AS zu einer Peptidbindung (El-Faham und Albericio 2011).

Eine signifikante Verbesserung in der Effizienz von Carbodiimiden kann durch die Zugabe von Aktivator Basen wie Oxyma erreicht werden. Eine Zugabe dieser Additive kann die Racemisierung unterdrücken und beschleunigt zudem die Kopplung. Wie Abbildung 13 im Methodenteil zeigt, führt der Einsatz von Oxyma zur Protonierung des O-Acylisoharnstoffs, was die Entstehung des N-Acylisoharnstoffs verhindert und die Ausbildung eines aktiven Esters zur Folge hat.

Nach erfolgreicher Synthese wurden die Peptide mittels einer Spaltungsreaktion vom Harz abgespalten und die Seitenkettenschutzgruppen wurden ebenfalls entfernt. Die Abspaltung der Schutzgruppen der Seitenketten und die Freisetzung des Peptids vom Harz konnte durch einen einzigen Schritt erfolgen (Palomo 2014a). Als Spaltungsreagenz wurde hier wie üblich TFA eingesetzt. Zusätzlich wurden Wasser und Triisopropylsilan (TIS) als Carbokationenfänger („Scavenger“) zugesetzt, um das Wiedereinbringen der gespaltenen Schutzgruppen zu verhindern. Die Durchführung der Spaltung erfolgte nach der unter

3.2.2.1 beschriebenen Methode. Die Entfernung des abgespaltenen Harzes aus dem Synthesegemisch erfolgte über Filtration und die Carbokationenfänger sowie die abgespaltenen Schutzgruppen wurden durch Etherpräzipitation des Peptids von diesem abgetrennt. Das erhaltene Präzipitat wurde unter Stickstoffatmosphäre getrocknet und anschließend in H₂O solubilisiert. Nach erfolgter Lyophilisation wurde das in H₂O gelöste Peptid zunächst mittels RP-HPLC analysiert, die Masse mittels MALDI-TOF-MS überprüft und schließlich der gesamte Ansatz mittels präparativer FPLC über eine C18-Säule aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Exemplarisch sind ein Massenspektrum sowie ein analytisches HPLC-Chromatogramm von HP01 in der nachfolgenden Abbildung 34 dargestellt.

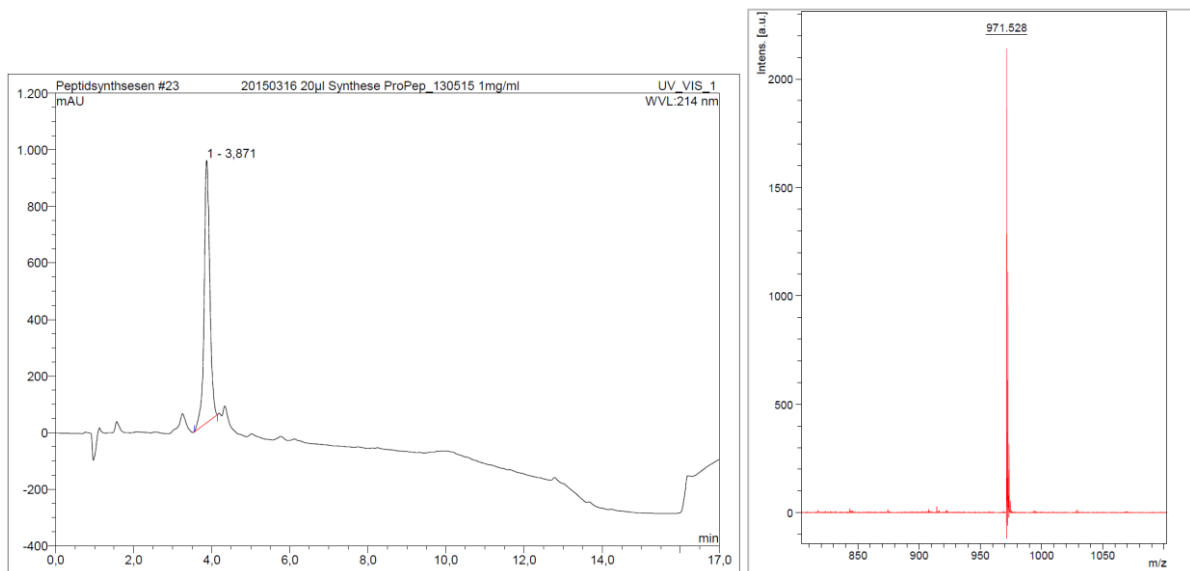


Abbildung 34: Links: Analytisches RP-HPLC Chromatogramm des Syntheseansatzes von HP01 mit einem Hauptpeak bei 3,87 min. re: MALDI-TOF-MS des fraktionierten HPLC-Peaks zeigt die eindeutige Identifizierung des Peptides mit einem MW von 971 Da.

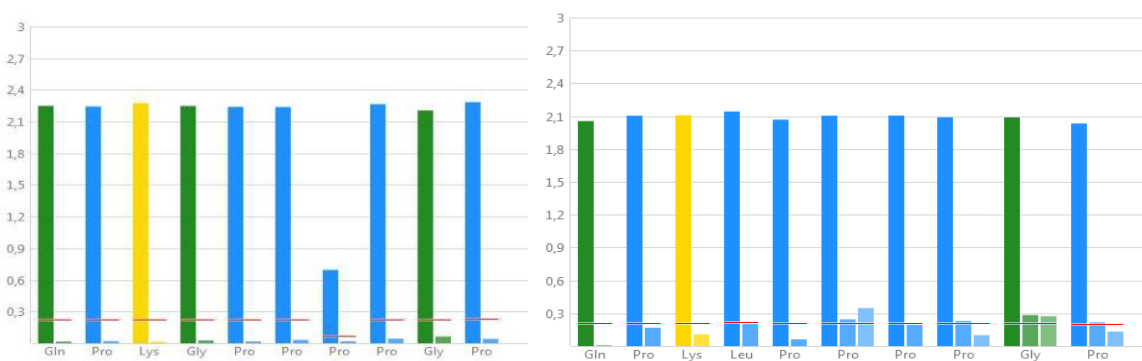


Abbildung 35: UV-Kontrolle während der Peptidsynthese: links: Synthese HP01 mit ungenügender Kupplung des Prolins an Position 4, erkennbar durch den schlechten UV-Verlauf; rechts: Vergleich einer optimierten Synthese mit Prolin-Doppelkupplungen mit konstantem UV-Verlauf

So konnte für die Synthese von HP01 nach einer gravimetrischen Messung von 87,15 mg eine Ausbeute von ca. 90 % bestimmt werden, für HP02 nach gravimetrischer Bestimmung von 84,97 mg eine Ausbeute von 88 %. Der Hauptverlust lässt sich anhand der oben gezeigten UV-Spektren der Kopplungen im (PPPP)-Motiv der Sequenz erkennen. Die leicht geringere Ausbeute von HP02 lässt sich mit der Verlängerung des Motives auf fünf Proline erklären. Für die meisten Synthesen scheint

insbesondere die Kopplung von Prolin2 und Prolin3 problematisch zu sein. Dennoch ist die Syntheseausbeute beider Sequenzen als gut zu beurteilen.

4.2.2 Verifizierung der antimikrobiellen Aktivität von HP01/HP02

Nach erfolgreicher Synthese und Aufreinigung beider Peptidvarianten wurden diese zunächst hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität gegenüber gramnegativen und grampositiven Referenzerregern getestet. In einer anschließenden Studie erfolgte die Testung der Peptide bezüglich ihres antimikrobiellen Potentials gegenüber gramnegativen multiresistenten Keimen.

4.2.2.1 Antimikrobielle Profil gegenüber Referenzkeimen

Als Referenzkeime wurden für die grampositiven Erreger wieder *M. luteus* und für gramnegative Bakterien *E. coli K12* eingesetzt. Die antimikrobielle Aktivität beider Peptide wurde wiederum im Mikrodilutionsassay bestimmt. Sowohl für *M. luteus* als auch für *E. coli K12* zeigten sich wie in Abbildung 36 und Abbildung 37 ersichtlich für beide Peptide eine dosisabhängige Wirkung gegenüber dem bakteriellen Wachstum.

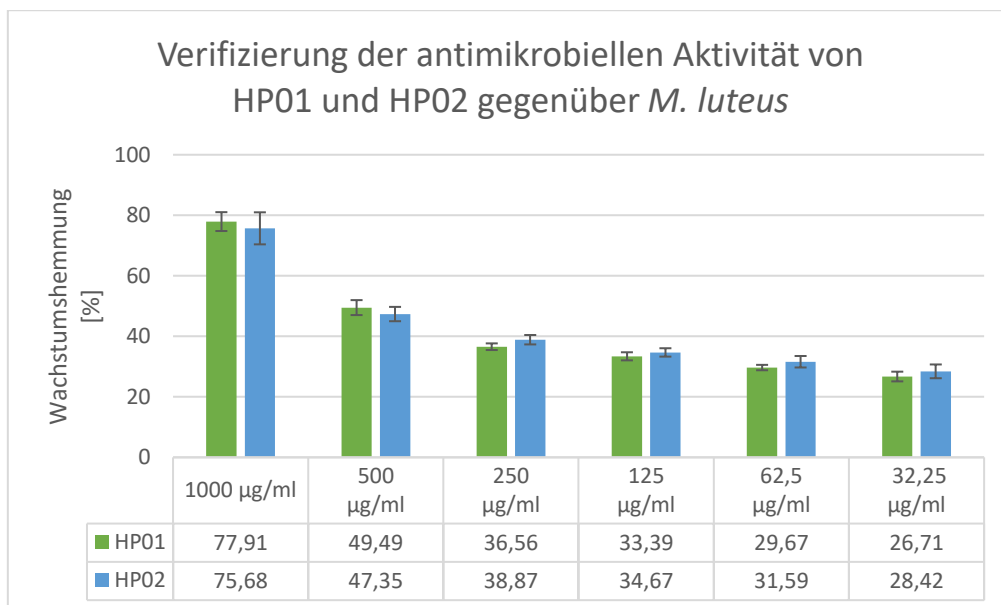


Abbildung 36: Antimikrobielles Potential der beiden Peptide gegenüber *M. luteus*. Die Messung erfolgte in Triplikaten

Getestet wurden beide Varianten, um einen eventuellen Einfluss der Reihenfolge der N-terminalen Aminosäuresequenz identifizieren zu können. Betreffend ihrer Hemmungswirkung gegenüber dem grampositiven Bakterium *M. luteus* verhielten sich die beiden Peptidvarianten nahezu vollständig identisch. Für beide Sequenzvarianten ließ sich mit den im Test eingesetzten Konzentrationen die MIC, also die vollständige Hemmung des bakteriellen Wachstums noch nicht erreichen. Hier konnte mit einer Konzentration von 1 mg/mL eine Wachstumsreduktion von ca. 78 % durch HP01 und um ca. 76 % durch HP02 erzeugt werden. Die Reihenfolge der Aminosäuren an Position 1 und 2 scheint also keinen wesentlichen Einfluss auf die Wirksamkeit des Peptides zu haben.

Im Bereich der gramnegativen Erreger zeigen sich deutlichere Unterschiede innerhalb der beiden Varianten. Hier ist HP01 (PGPPPPGKPO) bzgl. der Wirkung der Variante HP02 (GPPPPPGKPO) überlegen. Für HP01 konnte in den eingesetzten Konzentrationen mit 95 % Hemmung in der höchsten Peptidkonzentration die MIC₉₀ erreicht werden, HP02 wies hier noch 85 % Hemmung gegenüber dem bakteriellen Wachstum auf.

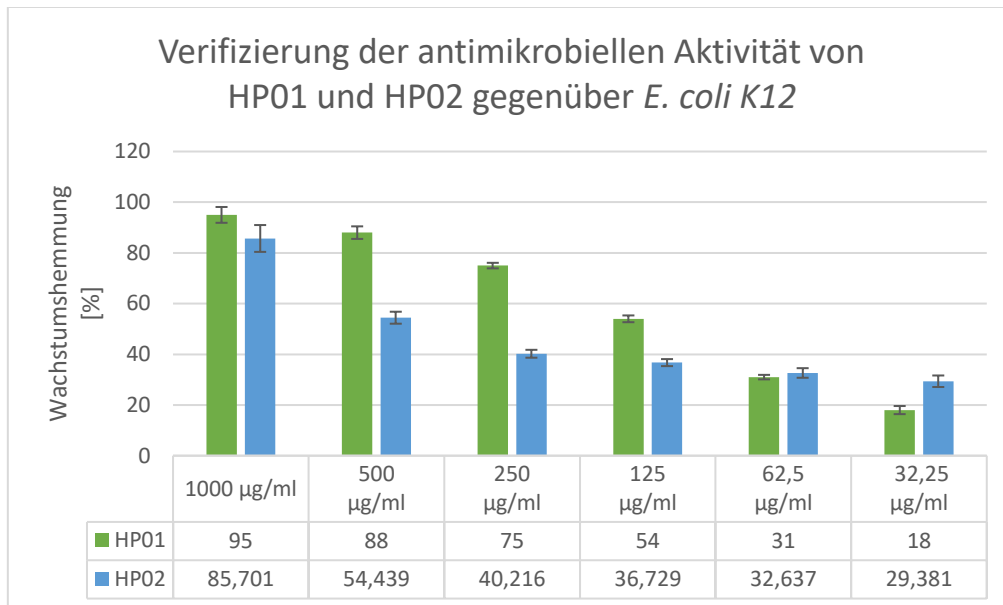


Abbildung 37: Antimikrobielle Wirkung der Hirudopeptide HP01 und HP02 gegenüber dem gramnegativen Bakterium *E. coli* K12. Die Messungen erfolgten auch hier in Triplikaten.

Interessant werden die Ergebnisse beider Varianten bei Betrachtung ihrer MIC₅₀-Werte. HP02 zeigte bei einer Konzentration von ca. 500 µg/mL eine 50 %ige Wachstumshemmung, bei HP01 hingegen wurde die MIC₅₀ bereits bei einer Wirkstoffkonzentration von 125 µg/mL erreicht. Diese MIC₅₀, in der Wirkstoffentwicklung ein Äquivalent des IC₅₀-Wertes, ist für eine erfolgreiche Weiterentwicklung wichtig und einer der Parameter, an dem sich hinsichtlich der *Hit*-Optimierung orientieren kann. Eine mögliche Erklärung für die bessere Wirkung könnte der Wirkmechanismus einiger prolinreicher Peptide (PrAMPs) gegenüber gramnegativen Keimen sein. Tossi *et al.* (2006) zeigten in Untersuchungen mit dem prolinreichen Peptid Bac7, dass neben der Länge der Peptide insbesondere die N-terminale Aminosäure wichtig für das antimikrobielle Spektrum des prolinreichen Peptides zu sein scheint. Das N-terminale Ende der Sequenz von HP01 besetzt die Aminosäure Prolin, eine heterocyclische, α -Aminosäure mit hydrophober Seitenkette. Das Stickstoffatom im Ringsystem liegt allerdings im physiologischen Milieu protoniert vor und besitzt im Vergleich zur primären α -Aminogruppe im Glycin eine höhere Basizität. Dies erhöht die Wechselwirkung mit der Membran. Ebenso können über die hydrophobe Seitenkette die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen, verglichen mit Glycin, erhöht werden. HP01 besitzt durch die Reihenfolge PGPPPPGKPO eine andere Amphiphilie wie HP02. Diese stellt einen wichtigen Parameter hinsichtlich der Aktivität von PrAMPs dar. In weiteren Experimenten zur Verifizierung des antimikrobiellen Potentials wurden beide Varianten des Peptides nun gegen multiresistente Erreger der ESKAPE-Gruppe getestet.

4.2.2.2 Antimikrobielle Wirkung der Peptide HP01 und HP02 auf multiresistente Erreger der ESKAPE-Gruppe

Erreger der ESKAPE-Gruppe stellen insbesondere im Bereich nosokomialer Infektionen eine der Hauptprobleme bei Antibiotikaresistenzen im klinischen Alltag dar. Zu dieser Gruppe zählen die folgenden Bakterienspezies: *Enterokokken*, Vancomycin-resistent (VRE); *Staphylokokkus aureus*, Methicillin-resistent (MRSA); *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenem-resistent (Metallo-betalaktamase-Bildner/MBL); *Acinetobacter baumannii* (häufig intrinsisch resistent gegen verschiedene Antibiotika); *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacteriaceae* (Extended-Spectrum-Betalaktamase-Bildner/ESBL) (Pendleton et al. 2013). Gerade die gramnegativen Vertreter stehen seit einiger Zeit aufgrund der rasanten Resistenzentwicklungen besonders im Fokus. Aus diesem Grund wurde die antimikrobielle Wirkung der beiden Peptide HP01 und HP02 auf multiresistente Vertreter der Gattung *K. pneumoniae* spp. getestet.

In dieser Testreihe wurden zwei Vertreter der Spezies *Klebsiella pneumoniae* mit ausgeprägten Multiresistenzen getestet. Der isolierte humanpathogene Stamm *K. pneumoniae* IHIT 19222 trägt zwei Resistenzgene für KPC-2 sowie SHV-11 und gehört zu den sogenannten ESBL-produzierenden Enterobakterien (Tada et al. 2017). KPC-2 ist eine Carbapenemase und führt im Bakterium zu Resistenzen gegenüber Antibiotika der Klasse der Cephalosporine, der Monobaktame und der Carbapeneme. Diese Enzyme hydrolysieren unter Ringöffnung mit anschließender Decarboxylierung den β -Lactamring dieser Antibiotika und führen so zu einer Resistenz gegen diese Substanzklassen. SHV-11 ist ebenfalls eine sogenannte *extended-spectrum*- β -Laktamase und hydrolysiert ebenfalls eine Vielzahl von Antibiotika mit β -Lactamringen und findet sich im Gegensatz zur KPC in einer Vielzahl von Enterobakterien wieder.

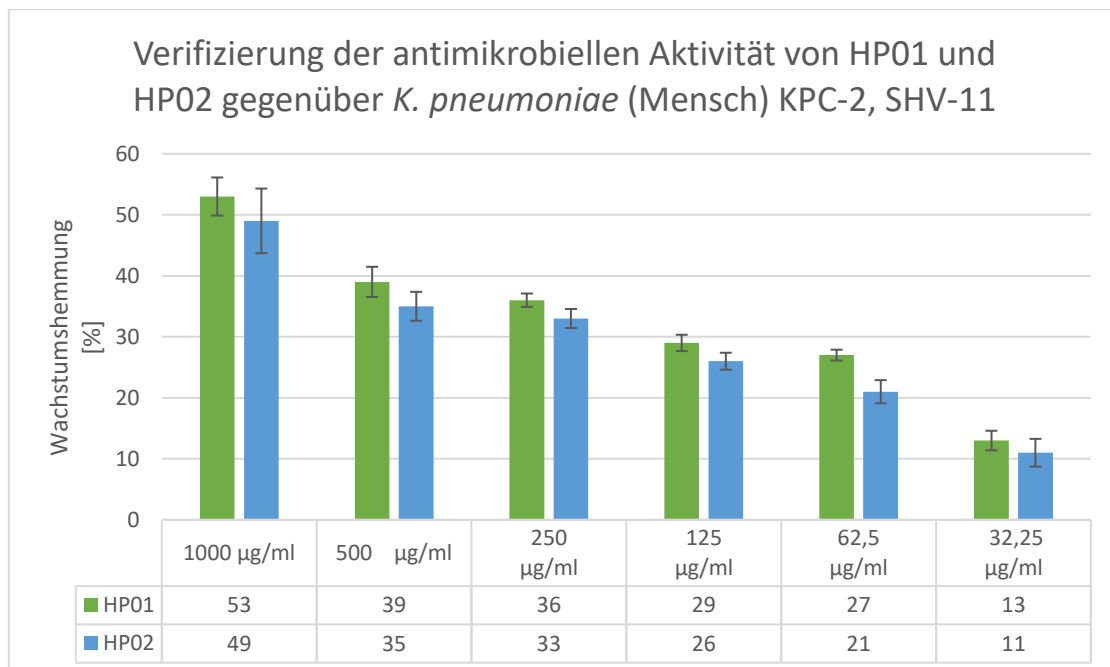


Abbildung 38: Antimikrobielle Wirkung der Peptide HP01 und HP02 auf das Wachstum eines multiresistenten Klebsiellenstammes mit den Resistenzgenen KPC-2 und SHV-11. Die Messungen erfolgten in Triplikaten.

Bei diesem isolierten Erreger konnte durch die Peptide HP01 und HP02 in der höchsten eingesetzten Konzentration eine Wachstumsreduktion von 53 % bzw. 49 % erreicht werden und somit die für die Weiterentwicklung wichtige IC₅₀ erreicht werden. Das Kontrollsubstanzen Vancomycin erreichte die MIC bei einer Konzentration von 4 µg/mL wie von der EUCAST vorgeschrieben. Die Ergebnisse des Mikrodilutionsassays sind in Abbildung 38 grafisch dargestellt.

Desweiteren wurde ein zweiter humanpathogener Stamm der Spezies *Klebsiella pneumoniae* im Mikrodilutionsassay wie unter 3.2.4.1 beschrieben getestet. *Klebsiella pneumoniae* IHIT 19225 trägt Resistenzgene für die beiden Beta-Laktamasen OXA-48 und CTX-M-15 (Tada et al. 2017). OXA-48 ist ebenso wie KPC eine Carbapenemase und wird der Untergruppe der Oxacillinasen zugeordnet, was bedeutet, dass dieses Enzym primär das Antibiotikum Oxacillin hydrolysiert. CTX-M-15 ist eine *extended-spectrum*-β-Laktamase und hydrolysiert wie auch SHV-11 eine Vielzahl von Substanzen aus der Reihe der β-Laktamantibiotika. Beide stellen, wie alle EBSL-produzierenden Enterobakterien, eines der größten Probleme unserer Zeit in der Behandlung von bakteriell bedingten Infektionskrankheiten dar.

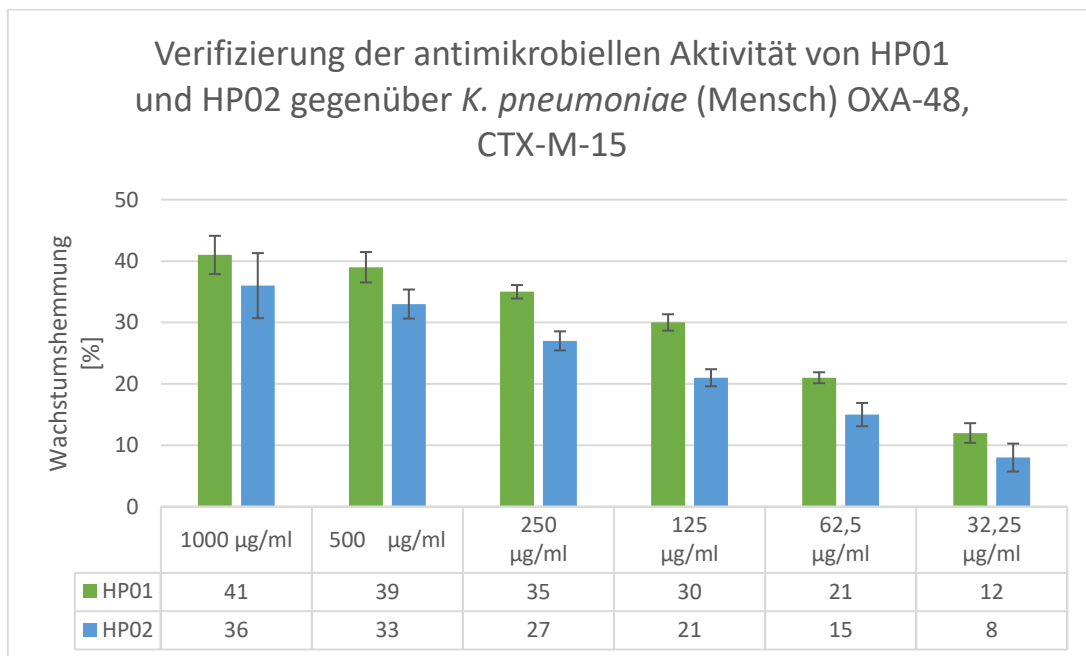


Abbildung 39: Antimikrobielle Profil der Peptide HP01 und HP02 gegenüber dem Wachstum eines multiresistenten *Klebsiellen*stammes mit den Resistenzgenen OXA-48 und CTX-M 15. Die Messungen erfolgten hier ebenfalls in Dreifachbestimmung.

Abbildung 39 zeigt die Ergebnisse der Wirkung beider Peptide auf das Wachstum des ESBL-produzierenden *Klebsiellen*stammes IHIT 19255. Hier konnte eine Reduktion des Bakterienwachstums von 41 % bzw. 36 % erreicht werden. Die minimal inhibitorische Konstante konnte wiederum mit dem Kontrollantibiotikum bei einer Konzentration von 4 µg/mL erreicht werden.

Beide Peptidvarianten zeigten eine dosisabhängige Wirkung, wobei HP01 wie auch in den vorangegangenen Versuchen eine bessere Wirkung aufwies. Da es sich bei den untersuchten *Klebsiella* Stämmen ebenfalls um Vertreter gramnegativer Erreger handelt, sind die bereits oben diskutierten Gründe der Prolinposition auch hier anzuführen.

Diese vielversprechenden Ergebnisse legten eine Weiterentwicklung der identifizierten und synthetisierten Peptide nahe. Im weiteren Verlauf der Arbeit lag nun der Hauptfokus auf Untersuchungen des Peptids HP01.

4.2.3 Untersuchung zur proteolytischen der Stabilität von HP01

Der proteolytische Abbau Peptid-basierter Wirkstoffe stellt eines der Hauptprobleme bei der Entwicklung therapeutischer Proteine respektive Peptide dar und führt häufig zu Einschränkungen in Bezug auf die Wahl von Applikationsrouten und Formulierungen. Proteasen finden sich ubiquitär in Zellen, im Gewebe und in Körperflüssigkeiten und besitzen mannigfaltige Aufgaben. In der Entwicklung neuer Peptid-basierter Wirkstoffe spielt daher die Serum- und Plasmastabilität, als auch die Stabilität gegenüber Proteasen des Verdauungssystems eine immense Rolle, da hier die Stabilität entscheidend für die Anwendung *in vivo* ist. Innerhalb dieser Arbeit wurde daher die Stabilität von HP01 gegenüber einer Reihe von relevanten Proteasen getestet. Ebenso wurden Untersuchungen zur Serumstabilität und zur Stabilität in künstlichem Magensaft, der sogenannten *Simulated Gastric Fluid* (SGF) durchgeführt.

4.2.3.1 Proteasestabilität von HP01 in Puffersystemen

Zunächst wurde die proteolytische Stabilität von HP01 gegenüber einer Reihe von Testenzymen unterschiedlicher Proteasetypen untersucht.

Hierzu wurde, wie in 3.2.3.4.1 beschrieben, 0,2 µM des Peptides in die verschiedenen Proteaseansätze wie in Tabelle 35 dargestellt überführt und bei den gegebenen Parametern über jeweils insgesamt 48 h inkubiert. Die Peptidquantifizierung der Reaktionsansätze erfolgte mittels RP-HPLC. Hierzu wurde zunächst eine Kalibrierung wie beschrieben durchgeführt und die nachfolgenden Stabilitätsuntersuchungen mittels der in der nachfolgenden Abbildung 40 dargestellten Kalibriergerade unter Verwendung von Gleichung (13)

$$c_{\text{Peptid}} = \frac{\text{Absorption}_{214\text{nm}} [\text{mAU}]}{1833,6} \quad (13)$$

berechnet.

Tabelle 39: Parameter zur Kalibrierung

c_{Peptid} [mg/mL]	$\text{Absorption}_{214\text{ nm}}$ [mAU]
0,5	902,14
0,2	394,28
0,1	199,87
0,02	43,71
0,01	21,33
0,005	8,79

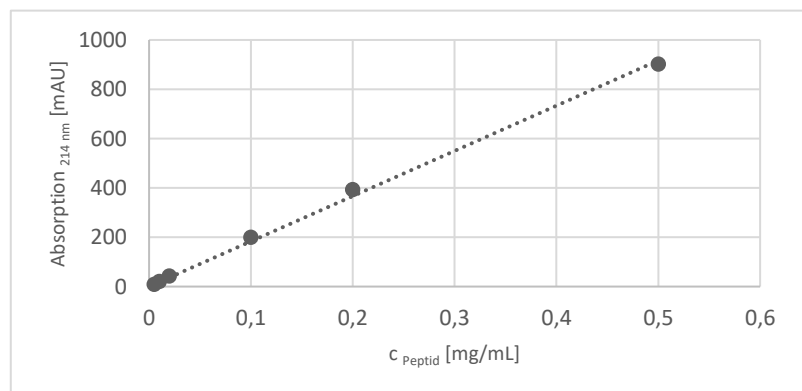


Abbildung 40 rechts: Kalibriergerade von HP01 in Reinstwasser zur Quantifizierung der Peptidkonzentrationen mittels RP-HPLC in den Stabilitätsstudien ($R^2=0,9987$)

Die Auswahl der Proteasen erfolgte in Anlehnung an deren physiologische Bedeutung *in vivo*. Die untersuchten Proteasen werden anhand des Aufbaus ihrer katalytischen Zentren in Serinproteasen, Aspartylproteasen und Matrixmetalloproteasen eingeteilt und werden im nachfolgenden in dieser Unterteilung betrachtet.

4.2.3.1.1 Serinproteasen

Serinproteasen sind die umfangreichste und am besten untersuchteste Klasse von Peptidasen. Eine große Anzahl der Plasma- und Serumproteasen wie auch der Enzyme des Verdauungstraktes gehören der Klasse der Serinproteasen an. Die physiologisch relevanten Peptidasen besitzen in der Regel eine hohe bis sehr hohe Spezifität. Ihr katalytisches Zentrum wird im Allgemeinen durch eine Triade aus Serin, Histidin und Aspartat gebildet, wobei dem Serin hier eine entscheidende Rolle in der Aktivität zukommt. Die Reaktion, die diese Enzyme katalysieren, beinhaltet die Ausbildung einer Acylzwischenstufe, in der das Substrat in einem Schritt im aktiven Zentrum an der Hydroxylgruppe des Serins kovalent gebunden wird. Für diese Arbeit wurden aus der Klasse der Serinproteasen die Verdauungsenzyme Chymotrypsin und Trypsin ausgewählt, ebenso wie die Plasma- bzw. Serumproteine Urokinase und Thrombin. Ihre Substratspezifität wird durch die S₁-Bindetasche vorgegeben. Die einzelnen Spaltstellen und somit die Spezifität der in dieser Arbeit verwendeten Serinproteasen ist Tabelle 40 zu entnehmen.

Tabelle 40: Getestete Serinproteasen mit physiologischer Relevanz (Böhm et al. 2002)

Enzym	Spaltstelle	Physiologische Funktion
Chymotrypsin	Tyr-X, Phe-X, Trp-X	Verdauung
Trypsin	Arg-X, Lys-X	Verdauung
Urokinase	Arg-X, Arg-Val	Blutgerinnung, Plasminogen à Plasmin
Thrombin	Arg-Gly	Blutgerinnung, Fibrinogen à Fibrin

Innerhalb der Klasse der Serinproteasen wurde zusätzlich zu den physiologisch relevanten Enzymen, die Peptidase Proteinase K untersucht, welche aus dem Schlauchpilz *Engyodontium album* isoliert wurde. Diese Peptidase spaltet als Endopeptidase bevorzugt nach aliphatischen oder aromatischen Aminosäuren und wirkt vergleichsweise unspezifisch. Sie diente in der vorliegenden Arbeit dadurch als Vergleichsenzym für unspezifische Proteasen.

Die Inkubation der Testansätze wurde wie unter 3.2.3.4.2 beschrieben durchgeführt, nach den vorgegebenen Zeiten wurden Aliquots der Testansätze gewonnen, mit der entsprechenden Stopplösung die Aktivität der Proteasen gequench und die Peptidkonzentration mittels RP-HPLC quantifiziert. Die Ergebnisse der proteolytischen Stabilitätsuntersuchung von HP01 gegenüber der Serinproteasen sind in Tabelle 41 zusammengefasst.

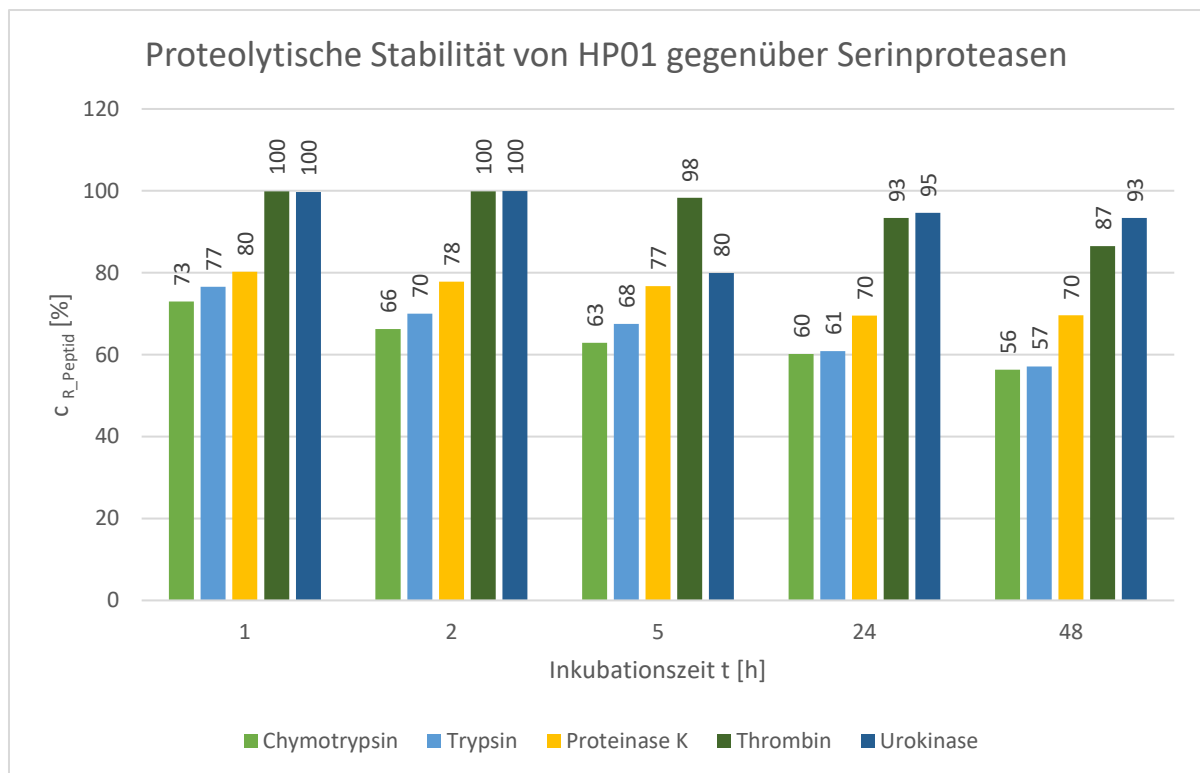


Abbildung 41: Darstellung der prozentual verbleibenden Peptidkonzentration über die Inkubationszeit für fünf verschiedene Serinproteasen

Die Quantifizierung der Peptidkonzentration erfolgte mit RP-HPLC über die Peakhöhe. Zur Beurteilung der proteolytischen Stabilität von HP01 wird zunächst der 24 h-Wert herangezogen. Hierbei ergibt sich für die Klasse der Serinproteasen folgendes Stabilitätsmuster. HP01 weist gegenüber den Verdauungsenzymen Chymotrypsin und Trypsin nach einer Inkubationsdauer von 24 h eine eher mittlere Stabilität auf. Hier können nach 24 h noch ca. 60 % des aktiven Peptides identifiziert werden. Die Stabilität von HP01 gegenüber den beiden Verdauungsenzymen ist jedoch als positiv zu bewerten.

Tabelle 41: Parameter zur proteolytischen Stabilität von HP01 gegen die Serinproteasen Chymotrypsin, Trypsin, Proteinase K, Thrombin sowie Urokinase

Enzym Chymotrypsin				Enzym Trypsin			
Testansatz 0,1 mg/mL in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 T _i =30 °C				Testansatz 0,5 mg/mL in 10 mM NH ₄ HCO ₃ , 0,1 mM CaCl ₂ , pH 8, T _i =37 °C			
Quenching 0,08 % TFA in H ₂ O				Quenching 0,08 % TFA in H ₂ O			
Zeit _i [h]	Absorption _{214 nm} [mAU]	C _{Peptid} [mg/mL]	C _{Peptid rest} [%]	Zeit _i [h]	Absorption _{214 nm} [mAU]	C _{Peptid} [mg/mL]	C _{Peptid est} [%]
1	272,86	0,1459	72,95	1	285,85	0,1531	76,55
2	248,78	0,1326	66,3	2	262,27	0,1401	70,05
5	239,12	0,1258	62,9	5	253,08	0,135	67,5
24	226,61	0,1204	60,2	24	229,07	0,1217	60,85
48	212,64	0,1127	56,36	48	215,56	0,1143	57,15

Enzym	Thrombin			
Testansatz	0,1 mg/mL in TBS-Puffer (20 mM Tris, 50 mM NaCl), pH 7,4; T _i =37 °C			
Quenching	0,08 % TFA in H ₂ O			
	Zeit _t [h]	Absorption _{214 nm} [mAU]	C _{Peptid} [mg/mL]	C _{Peptid rest} [%]
	1	370,32	0,1998	99,9
	2	370,95	0,1996	99,89
	5	364,51	0,1966	98,3
	24	346,63	0,1867	93,35
	48	321,85	0,173	86,5

Enzym	Urokinase			
Testansatz	0,2 mg/mL in TBS-Puffer (20 mM Tris, 50 mM NaCl), pH 7,4; T _i =37 °C			
Quenching	0,08 % TFA in H ₂ O			
	Zeit _t [h]	Absorption _{214 nm} [mAU]	C _{Peptid} [mg/mL]	C _{Peptid rest} [%]
	1	369,64	0,1994	99,7
	2	370,6	0,1999	99,95
	5	298,21	0,1599	79,95
	24	351,13	0,1892	94,6
	48	346,62	0,1867	93,35

Enzym	Proteinase K			
Testansatz	0,04 mg/mL in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; T _i =37 °C			
Quenching	0,08 % TFA in H ₂ O			
	Zeit _t [h]	Absorption _{214 nm} [mAU]	C _{Peptid} [mg/mL]	C _{Peptid rest} [%]
	1	299,23	0,1605	80,25
	2	290,28	0,1556	77,8
	5	286,6	0,1535	76,75
	24	260,52	0,1391	69,55
	48	260,72	0,1392	69,6

Die mittlere Stabilität von HP01 gegenüber Chymotrypsin und Trypsin lässt sich wie folgt erklären. Chymotrypsin hydrolysiert bevorzugt Peptidbindungen nach hydrophoben Aminosäuren, die Peptidase Trypsin spaltet hingegen bevorzugt Peptidbindungen nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Die Struktur von HP01 weist an Position 8 ein Lysin auf, was für die Hydrolyse des Peptids durch Trypsin spricht. Es finden sich jedoch keine Aromaten in der Sequenz, so dass der proteolytische Abbau durch Chymotrypsin unspezifisch erfolgen muss. Allgemein ist das übermäßige Vorkommen der Aminosäure Prolin als positiv bezüglich der Hydrolyseresistenz gegenüber Serinproteasen zu bewerten. Ein Grund hierfür könnte in der Notwendigkeit des Einnehmens einer antiparallelen Geometrie bei der Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes, welchen diese Enzyme mit der Substratpeptidkette eingehen, liegen. Durch die Ringstruktur des Prolins besitzt dessen Aminogruppe in der Peptidbindung kein freies Wasserstoffatom mehr und es kann sich folglich zwischen einem Prolin in Position P1 oder P3 und der Serinprotease in Position S1 und S3 keine Wasserstoffbrückenbindung mehr ausbilden. Eine Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes ist nur dann möglich, wenn sich lediglich in Position P2 ein Prolin befindet. Desweiteren stellt die Ringstruktur des Prolins im Allgemeinen eine sterische Hinderung bei der Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes dar.

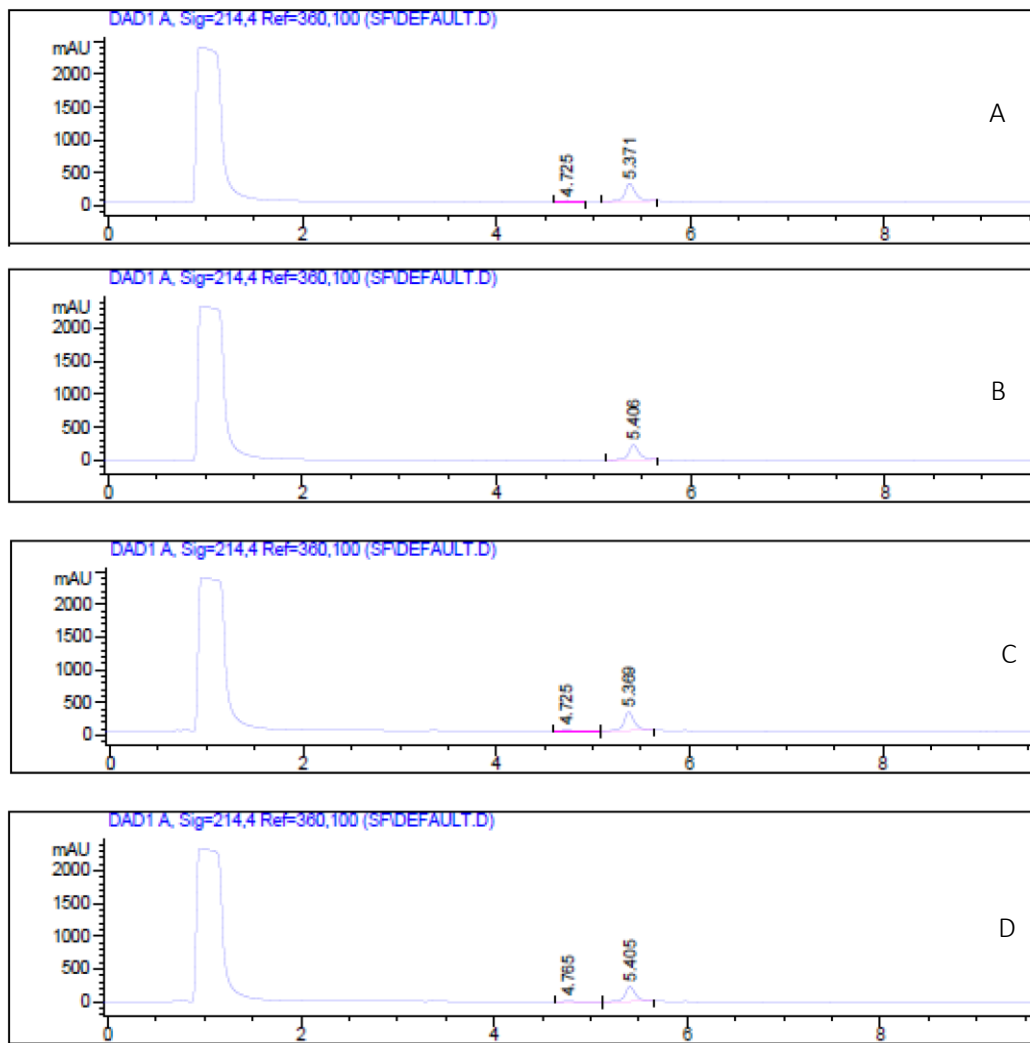


Abbildung 42: Chromatogramme zur proteolytischen Stabilität von HP01 gegenüber der Verdauungsenzyme Chymotrypsin (A und B) und Trypsin (C und D): A nach einstündiger Inkubation und B nach 24-stündiger Inkubation von HP01 mit Chymotrypsin; C nach einstündiger Inkubation und D nach 24-stündiger Inkubation von HP01 mit Trypsin; Retentionszeit HP01 $t_{R\text{HP01}} \approx 5,4$ min

Gegenüber den Enzymen Thrombin und Urokinase weist HP01 eine sehr gute Stabilität auf. Der Vergleich der Inkubation ist in Abbildung 43 dargestellt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h ist bei beiden Enzymen eine Wiederfindungsrate von über 90 % zu verzeichnen. Diese Ergebnisse liefern erste richtungsweisende Ergebnisse in Bezug auf die Plasma- bzw. Serumstabilität von HP01, welche eine wichtige Rolle und entscheidenden Einfluss auf den weiteren Entwicklungszyklus der Leitstruktur haben.

Urokinase zirkuliert im Blutstrom und sorgt innerhalb der Hämostase für die Umsetzung von Plasminogen zu Plasmin. Es zählt, wie alle Enzyme der Hämostase, zu den hochspezifischen Vertretern und hydrolysiert Peptidbindungen vornehmlich zwischen basischen Argininen und Valinen. In der Sequenz von HP01 sind beide Aminosäuren nicht vertreten, was für die gute Stabilität gegen den hydrolytischen Abbau durch Urokinase spricht.

Thrombin stellt in der Blutgerinnung eines der wichtigsten Enzyme dar. Diese Endopeptidase hydrolysiert bevorzugt die Spaltung von Peptidbindungen zwischen der polaren, basischen Aminosäure Arginin und der Aminosäure Glycin oder Serin, wobei die optimale Schnittstelle für Thrombin zwischen einem Arginin an der P1 Position und einem Glycin an der P2 Position liegt. Somit wird in der S1 Tasche des Enzyms die polare, basische Seitenkette des Arginins gebunden. Dadurch lässt sich die hohe Stabilität gegenüber Thrombin erklären, denn die Sequenz von HP01 enthält zwar Glycine an Position 2 und 7, allerdings geht in beiden Fällen kein Arginin voraus. Auch in diesen beiden Fällen wirkt sich der hohe Prolin-Anteil der Leitstruktur HP01 von 60 % positiv auf die Stabilität gegenüber proteolytischen Verdau aus.

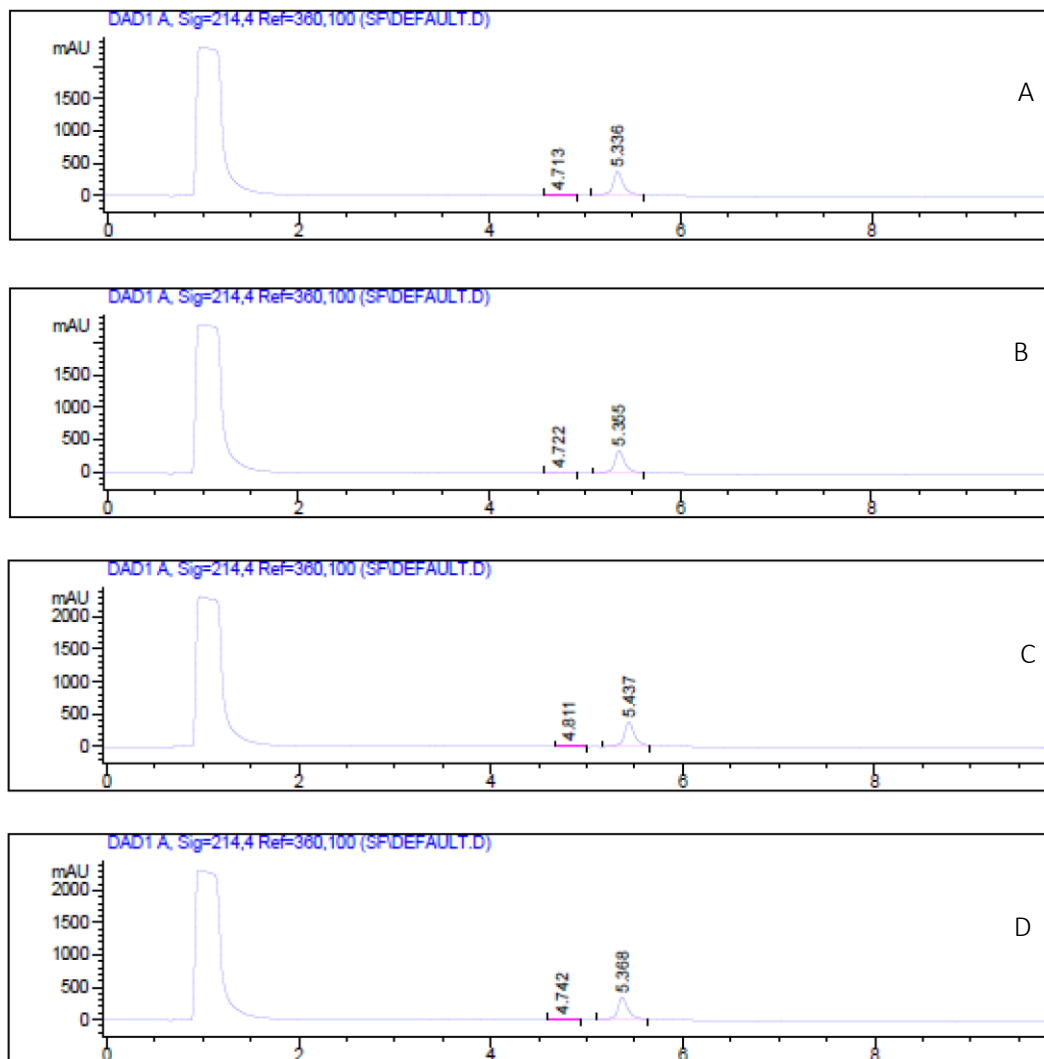


Abbildung 43: Chromatogramme zur proteolytischen Stabilität von HP01 gegenüber der Serinproteasen Urokinase (A und B) und Thrombin (C und D): A nach einstündiger Inkubation und B nach 24-stündiger Inkubation von HP01 mit Urokinase; C nach einstündiger Inkubation und D nach 24-stündiger Inkubation von HP01 mit Thrombin; Retentionszeit HP01 $t_{R, HP01} \approx 5,4$ min

4.2.3.1.2 Aspartylproteasen

Aspartylproteasen, denen auch das physiologisch relevante Pepsin zuzuordnen ist, besitzen in ihrem katalytischen Zentrum zwei Aspartat-Reste und benötigen für die Katalyse ein Wassermolekül, welches als Nucleophil dient und durch die Aspartylreste optimal polarisiert wird. Beide Reste wirken zusätzlich auch als Stabilisatoren des Übergangszustandes, als Protonenüberträger und sorgen für einen Ladungsausgleich. Das Verdauungsenzym Pepsin wurde hier als erster Vertreter dieser Klasse eingehend untersucht. Pepsin spielt eine herausragende Rolle in der Verdauung und stellt mit seiner Aktivität im stark sauren Bereich zudem ein hoch interessantes Enzym dar. Die beiden katalytischen Aspartate verhalten sich in der Reaktion wie ein gekoppeltes System ähnlich wie eine Dicarbonsäure, wirken also durch ihre unterschiedlichen pKa-Werte wie eine zweiprotonige Säure. Die spezifischen Spaltstellen dieser Peptidase liegen bevorzugt links und rechts von hydrophoben Gruppen wie beispielsweise Phenylalanin.

Die Inkubation der Testansätze wurden analog zur Testreihe der Serinproteasen ebenfalls wie unter 3.2.3.4.2 beschrieben durchgeführt, nach den vorgegebenen Zeiten Aliquots der Testansätze gewonnen, mit der entsprechenden Stopplösung die Aktivität der Proteasen gequencht und die Peptidkonzentration mittels RP-HPLC quantifiziert. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 42 zusammengefasst.

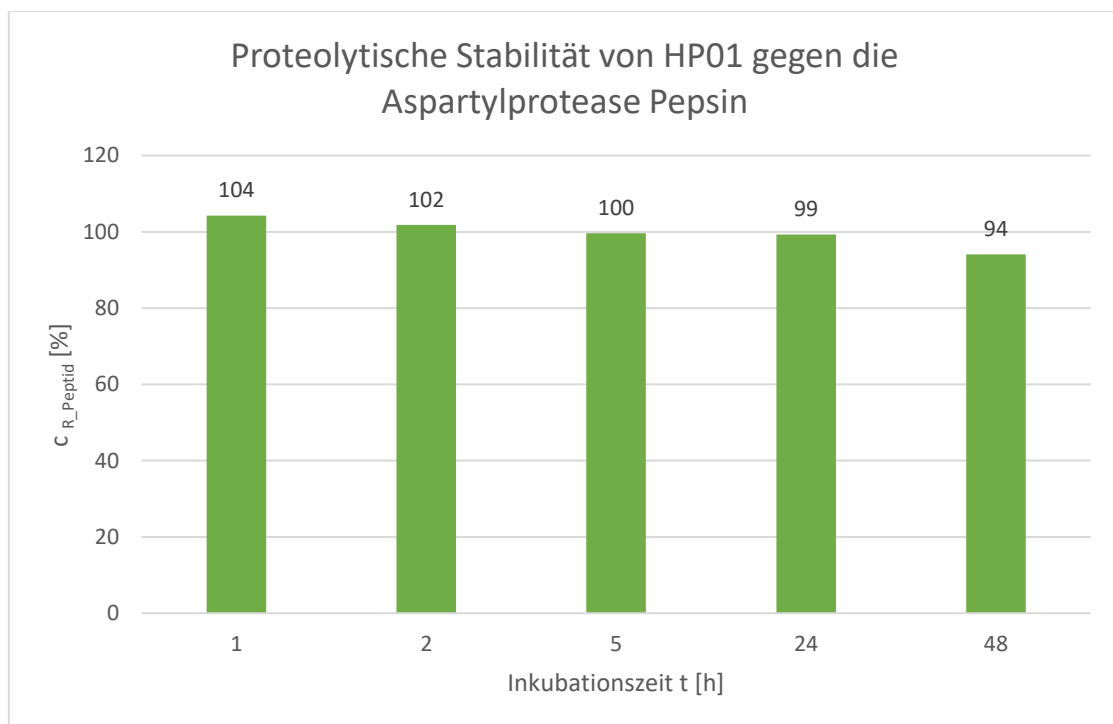


Abbildung 44: Darstellung der prozentual verbleibenden Peptidkonzentration über die Inkubationszeit von 48 h mit der Aspartylprotease Pepsin

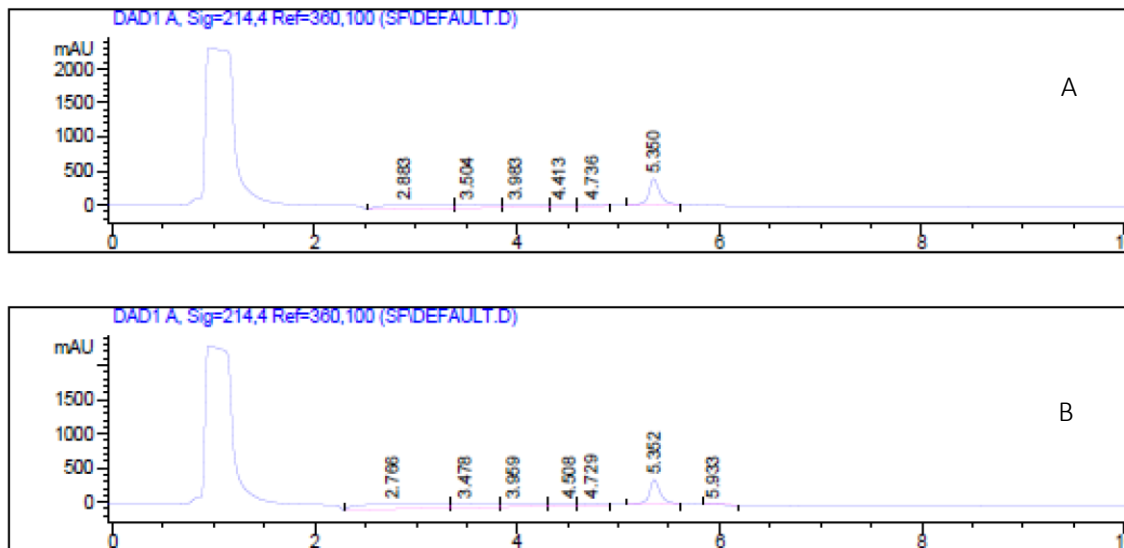


Abbildung 45: Chromatogramme zur proteolytischen Stabilität von HP01 gegenüber der Aspartylprotease Pepsin: A nach einstündiger Inkubation und B nach 24-stündiger Inkubation von HP01; Retentionszeit HP01 $t_{R,HP01} \approx 5,4$ min

Tabelle 42: Parameter zur proteolytischen Stabilität von HP01 gegen Pepsin

Enzym:	Pepsin			
Testansatz:	0,29 mg/mL in 10 mM Acetatpuffer, pH 4,0, $T_I=30$ °C			
Quenching:	2 % NH_3			
	Zeit I [h]	Absorption 214 nm [mAU]	c Peptid [mg/mL]	c Peptid rest [%]
	1	386,26	0,2085	104,25
	2	377,33	0,2036	101,8
	5	369,37	0,1993	99,65
	24	357,2	0,1925	99,25
	48	349,09	0,1881	94,05

Wie in Abbildung 44 und Abbildung 45 zu sehen ist, weist HP01 gegenüber dem proteolytischen Abbau von Pepsin eine sehr hohe Stabilität auf. Nach 24 h sind noch nahezu 100 % des Peptids quantifizierbar und nach 48 h ebenfalls mit 95 % eine hohe Wiederfindungsrate des intakten Peptides zu verzeichnen. Die Parameter zu dieser Testreihe sind in Tabelle 42 aufgelistet. Diese hohen Werte lassen sich wie folgt erklären. Pepsin ist eine Endopeptidase, welche bevorzugt nach aromatischen Aminosäuren oder der aliphatischen Aminosäure Leucin spaltet. Die Leitstruktur HP01 weist innerhalb ihrer Sequenz keine dieser Aminosäuren auf. Auch hier wirken sich Proline wie bereits oben beschrieben an den Positionen 3 und 4 stabilisierend gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Proteasen aus. Diese Ergebnisse lassen auf eine mögliche spätere orale Applikationsroute hoffen, da eine gute Stabilität gegenüber Pepsin und damit verbunden eine eventuelle Magensaftresistenz eine wichtige Voraussetzung für diese Applikationsroute darstellt.

4.2.3.1.3 Matrixmetalloproteasen (MMP)

Die Enzymklasse der Matrixmetalloproteasen benötigt für ihre Funktion in ihrem katalytischen Zentrum Metallionen, in den meisten Fällen ein Zinkion, durch dessen Koordination ein Wassermolekül für den nucleophilen Angriff auf die zu spaltende Bindung aktiviert werden kann. Viele therapeutisch wichtige Enzyme gehören dieser Klasse an. Unter den Zinkproteasen ist hier beispielsweise das blutdrucksteigernde Angiotensin-Converting-Enzyme aber auch die Carboxypeptidase A zu nennen.

Das Verdauungsenzym Carboxypeptidase A ist in dieser Enzymklasse das am besten untersuchteste. Das für die Aktivität essentielle Zinkion wird zunächst über zwei Histidin- sowie einer Glutamat-Seitenkette koordiniert und die vierte Stelle, wie oben erwähnt, über ein Wassermolekül komplexiert. Charakteristisch für Zinkproteasen ist die im aktiven Zentrum vorhandene Aminosäureabfolge -His-Glu-X-X-His-, die sich in einer Vielzahl von Proteasen wiederfindet. Dies gilt auch für die in dieser Arbeit verwendeten Matrixmetalloprotease Collagenase, welche bevorzugt zwischen Glycin und Leucin, respektive Glycin und Isoleucin spaltet und unter anderem am Gewebeumbau beteiligt ist.

Tabelle 43: Parameter zum Testansatz der proteolytischen Stabilität von HP01 gegen Collagenase

Enzym:	Collagenase			
Testansatz:	1 mg/mL in PBS, pH 7,4, TI= 37 °C			
Quenching:	0,08 % TFA in H2O			
	Zeit l [h]	Absorption 214 nm [mAU]	c Peptid [mg/mL]	c Peptid rest [%]
	1	356,91	0,1924	96,2
	2	353,24	0,1903	95,15
	5	344,99	0,1858	92,9
	24	341,94	0,1841	92,05
	48	329,9	0,1775	88,75

Wie auch in den Testreihen zuvor, wurden die Untersuchungen wie unter 3.2.3.4.2 beschrieben durchgeführt. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurde die Reaktion mit 0,08 % TFA-Lösung gestoppt, ein Aliquot mittels RP-HPLC analysiert und die Peptidmenge quantifiziert. Die Absorptionen und Stoffmengenanteil sind in Tabelle 43 zu entnehmen.

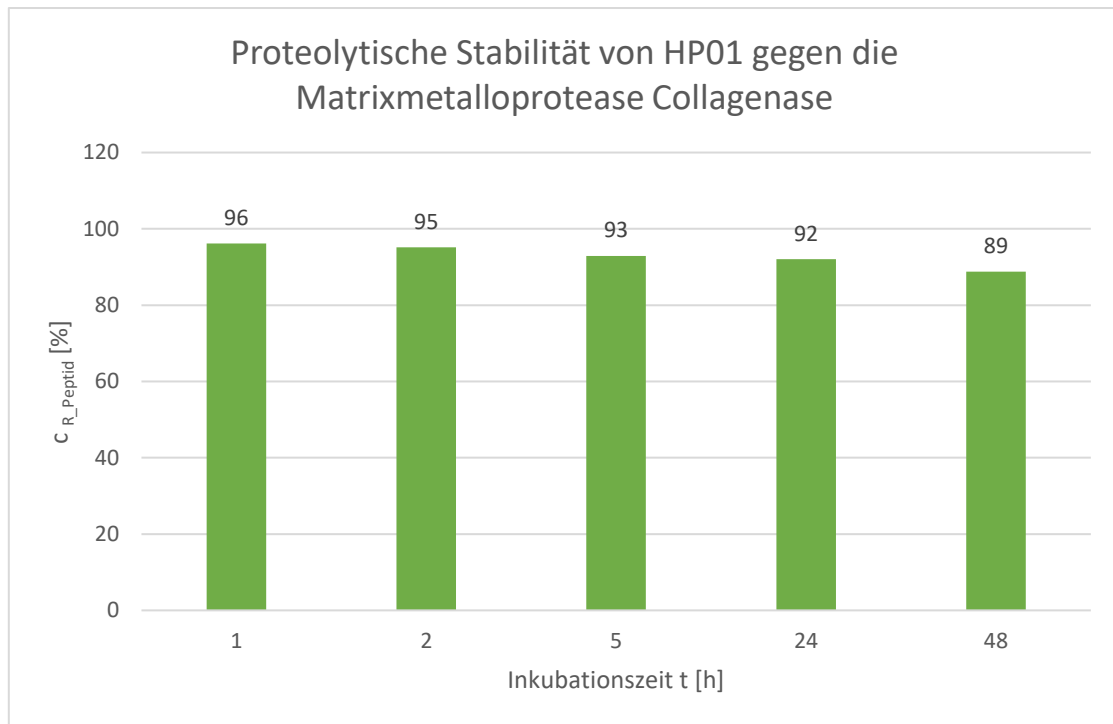


Abbildung 46: Darstellung der prozentual verbleibenden Peptidkonzentration über die Inkubationszeit von 48 h mit Collagenase

Die in Tabelle 43 gezeigten Parameter sind in Abbildung 46 graphisch über den Zeitverlauf aufgetragen. Hier lässt sich auf eine gute Stabilität von HP01 gegenüber der Collagenase schließen. Nach 24 h sind noch ca. 90 % der Peptidmenge wiederfindbar und im Falle der Collagenase sicherlich auf die nicht vorhandenen strukturellen Schnittstellen Gly-Leu und Gly-Ile zurückzuführen (Abbildung 47).

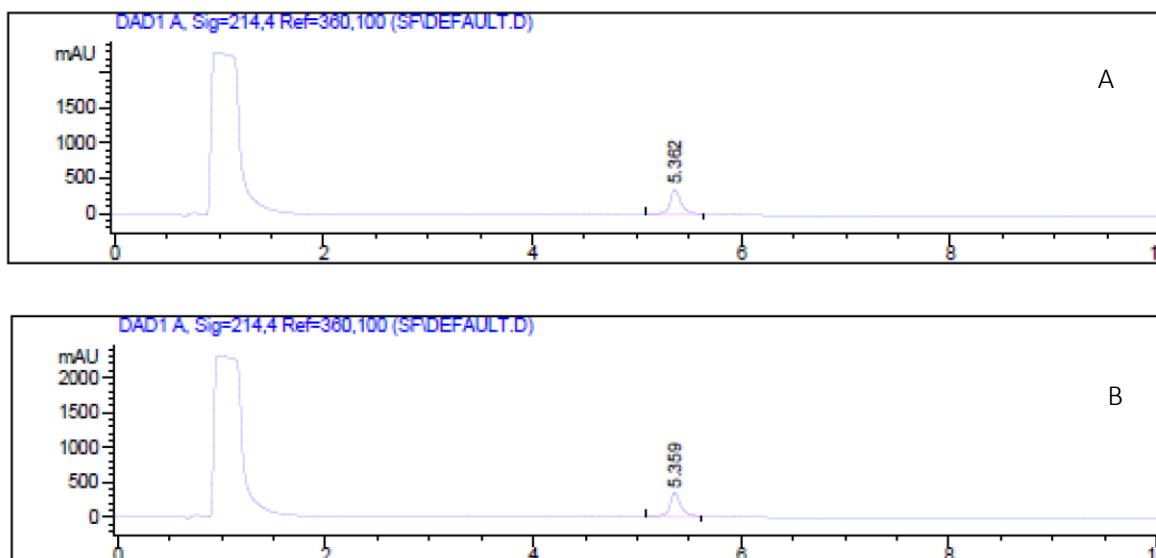


Abbildung 47: Chromatogramme zur proteolytischen Stabilität von HP01 gegenüber der Matrixmetalloprotease Collagenase: A nach einstündiger Inkubation und B nach 24-stündiger Inkubation von HP01; Retentionszeit HP01 $t_{R_{HP01}} \approx 5,4$ min

Carboxypeptidase A, welche vom Katalysemechanismus der Collagenase gleichzusetzen ist, spaltet spezifisch vor Tyrosin oder Phenylalanin. Da beide Aminosäuren in der Sequenz von HP01 nicht vorhanden sind, kann man anhand der Ergebnisse eine ähnliche Stabilität gegenüber dieser Protease annehmen. Somit kann aufgrund der durch diese Untersuchungen belegten hohen proteolytischen Stabilität, eine vielversprechende Weiterentwicklung von HP01 erwartet werden.

Als nächste Schritte wurden nun Untersuchungen der Stabilität von HP01 in künstlichem Magensaft und die Stabilität in humanem Plasma untersucht.

4.2.3.2 Untersuchungen zur Serumstabilität und gastrointestinalen Stabilität

Neben der traditionellen Interpretation der Wirkung eines Arzneimittels im Sinne einer Stoff-Dosis-Wirkungs-Äquivalenz ist man heute im Bereich der Pharmakokinetik zu der Erkenntnis gelangt, dass vieles mehr, als nur die reine Wirkstoffdosis, entscheidend für Erfolg oder Misserfolg eines Therapieansatzes ist. Hier werden alle Faktoren wirksam, die den Weg des Wirkstoffs von der Freisetzung aus der Arzneiform bis hin zur Ausscheidung bestimmen. Diese Faktoren sind im sogenannten LADME-Modell miteinander vereint. Zunächst hat die Arzneiform einen großen Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung (Liberation) im Organismus. Nachgeschaltet ist die Aufnahme des Wirkstoffes in die Blut- und Lymphbahn (Absorption), sowie die Verteilung über diese Körperflüssigkeiten (Distribution) im Organismus. Hieran schließt sich nun noch die Biotransformation (Metabolismus) des Wirkstoffes sowie die Ausscheidung (Extrektion) an.

Für die Ermittlung der therapeutischen Dosis eines neuen Wirkstoffkandidaten sind insbesondere die Schritte der Absorption und der Distribution entscheidend. Zunächst muss der Wirkstoff in ausreichender Menge im Dünndarm zur Resorption vorliegen. Anschließend muss die Stabilität im Blut gewährleistet sein, um nicht eine signifikante Menge an Wirkstoff auf dem Transportweg zu verlieren. Für erste richtungsweisende Untersuchungen dieser Parameter von HP01 wurde die Stabilität in humanem Serum und in künstlichem Magensaft getestet.

4.2.3.1.4 Proteolytische Stabilität in Humanserum

Im Bereich der antimikrobiellen Peptide sieht man großes Potential zur Entwicklung neuer Antibiotika, jedoch stellt die im allgemeinen geringe Serumstabilität eine der Hürden hinsichtlich einer erfolgreichen Weiterentwicklung dieser Substanzgruppe aufgrund ihres Peptid-basierten Grundgerüsts dar (Knappe et al. 2010; Seefeldt et al. 2015). Insbesondere kationische antimikrobielle Peptide, sogenannte CAMPs, sind aufgrund ihres hohen Arginin- und Lysingehalts hier anfällig gegenüber Serumproteasen. Zur Untersuchung der Serumstabilität von HP01 wurde, wie unter 3.2.3.4.3 beschrieben, die Substanz über einen Versuchszeitraum von 24 h in humanem Serum inkubiert. Hierzu wurden eine 10 mM Stammlösung von HP01 mit humanem Serum versetzt und nach definierten Zeitpunkten die Inkubation gestoppt. Anschließend wurde das Peptid mittels Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt und dieses dann hinsichtlich der Konzentration mittels RP-HPLC quantifiziert.

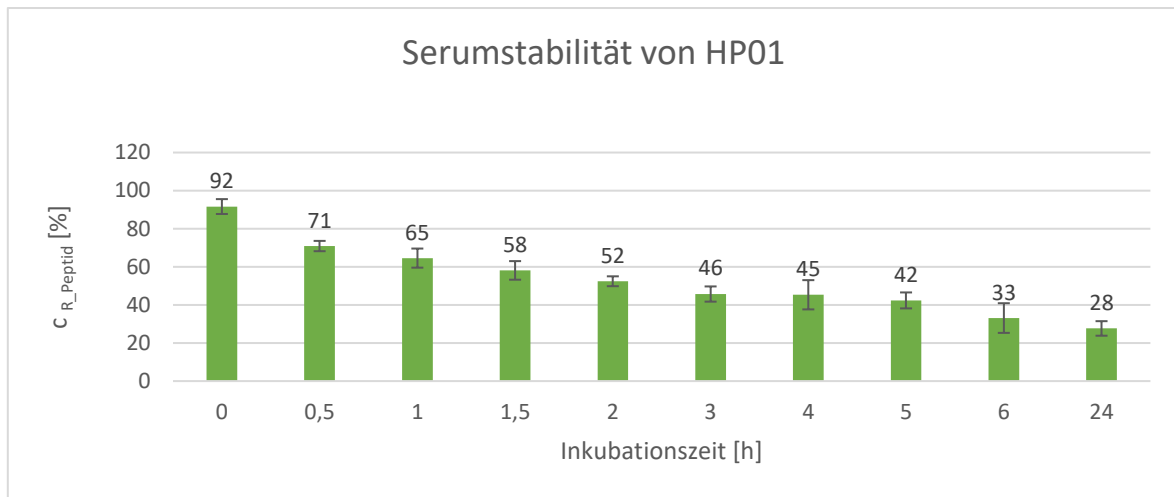


Abbildung 48: Darstellung der prozentual verbleibenden Peptidkonzentration von HP01 über die Inkubationszeit von 24 h in humanem Serum nach TCA-Fällung mit n=3

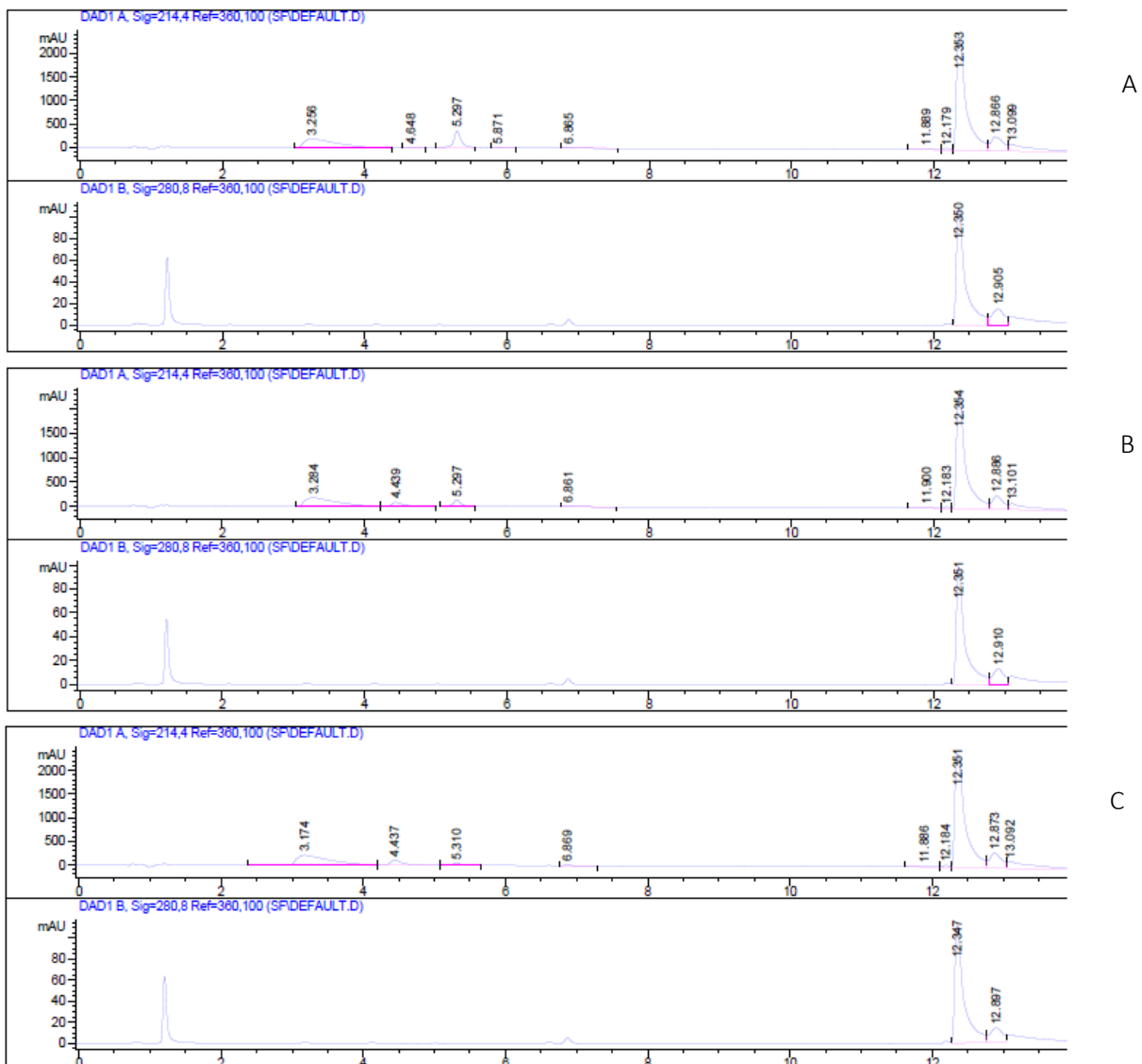


Abbildung 49: Chromatogramme zur Serumstabilität: A zum Startzeitpunkt t(0); B nach sechs Stunden Inkubation und C nach 24-stündiger Inkubation von HP01 in Humanserum

Aus Tabelle 44 und Abbildung 48 wird ersichtlich, dass die Konzentration an HP01 zu Beginn der Inkubation mit humanem Serum eine exponentielle Abnahme verzeichnet, nach ca. 3 bis 4 h die Serumhalbwertszeit erreicht und sich schließlich einem Wert von ca. 0,06 mg/mL annähert, was einer quantifizierbaren verbleibenden Peptidmenge von ca. 20 % nach 24 h Inkubation entspricht. Die in Abbildung 49 dargestellten Chromatogramme machen den Verlauf der Inkubation ebenfalls deutlich. Dies kann durch Auswertung des der Leitstruktur HP01 zuzuordnenden Peaks bei einer Retentionszeit von $t_{R(HP01)} = 5,3$ min verifiziert werden. Auffällig ist hier der zeitgleiche Anstieg eines Peaks mit der Retentionszeit von ca. 4,4 min. Dieser weist nach der Inkubationszeit von 24 h eine Peakhöhe auf, die die von HP01 übertrifft. Diese kontinuierliche Zunahme lässt vermuten, dass es sich hierbei um ein Abbauprodukt von HP01 handelt. Um die Serumprotease zu identifizieren, welche für den Abbau von HP01 zuständig ist, müsste eine massenspektrometrische Untersuchung mittels LC-MS/MS mit anschließender *De-novo*-Sequenzierung durchgeführt werden. Diese Untersuchungen könnten für eine gezielte Modifikation hinsichtlich dieser Schnittstelle zur Verbesserung der Serumhalbwertszeit von HP01 herangezogen werden.

Diese Tatsache könnte die hohe Abnahme von HP01 innerhalb der ersten 6 h erklären, da in der Sequenz von HP01 an Position 8 die basische Aminosäure Lysin vorkommt.

Vergleicht man die Serumstabilität von HP01 allerdings mit der anderer PrAMPs, so weist HP01 mit ca. 4 h eine deutlich höhere Serumhalbwertszeit auf. Das eingangs erwähnte Api88, ein prolinreiches, antimikrobielles Peptid aus der Honigbiene, weist in Gegenwart von Nagerserum lediglich eine Halbwertszeit von 10 min auf. Ähnlich verhält sich das Designerpeptid A3-APO in 25 % Mäuseserum (Berthold et al. 2013; Noto et al. 2008). Auch andere AMPs, wie beispielsweise Lfcin B und Combi, zeigen in Humanserum mit einer Halbwertszeit von 30 min eine deutlich geringere Stabilität als unsere Leitstruktur. Hier konnte durch gezielte Modifikationen eine signifikante Steigerung der Serumhalbwertszeit erreicht werden (Nguyen et al. 2010).

Tabelle 44: Parameter zum Testansatz der Serumstabilität von HP01

Serum human				
Testansatz:	800 µL Serum, 200 µL 10 mM Peptidlösung, 37 °C			
TCA-Fällung	20 µL 15 % TCA; 15 min, 4 °C;			
	Zeit t_i [h]	Absorption $_{214\text{ nm}}$ [mAU]	C Peptid [mg/mL]	C Peptid rest [%]
	0	355,04395	0,1913	91,64
	0,5	276,67004	0,148	70,90
	1	252,70424	0,1348	64,57
	1,5	228,28384	0,1213	58,11
	2	206,7374	0,1094	52,41
	3	181,38211	0,0954	45,70
	4	179,97987	0,0946	45,32
	5	168,67253	0,0884	42,35
	6	133,81287	0,0691	33,10
	24	113,1025	0,0577	27,64

4.2.3.1.5 Proteolytische Stabilität in künstlichen Magensaft - Simulated Gastric Fluid (SGF)

Den wichtigsten und größten Resorptionsort für Arzneistoffe stellt die Dünndarmschleimhaut da. Von dort aus wird ein Großteil der Arzneistoffe in den Organismus absorbiert. Eine diesem Resorptionsort vorgeschaltete Passage stellt der Magen dar und spielt daher aus biopharmazeutischer Sicht für eine ausreichende Wirkstoffabsorption eine entscheidende Rolle. Es kann nur eine ausreichende Dosis eines Arzneistoffes vom Organismus im Dünndarm resorbiert werden, wenn ein Großteil der applizierten Wirkstoffmenge die Magenpassage ohne Abbau übersteht. Im Ruhezustand befinden sich in den Zwischenräumen der Magenschleimhaut ca. 25 mL eines Sekrets, dessen pH-Wert zwischen 1 – 1,5 liegt. Durch Nahrungsaufnahme wird die Magensaftsekretion gesteigert und nach Vermischen mit dem Nahrungsbrei herrscht ein pH-Wert-Milieu von 3 bis 5 vor. Der Magensaft enthält neben organischen Säuren und Phosphaten vor allem HCl und das Verdauungsenzym Pepsin.

Neben der Stabilität von HP01 gegenüber Pepsin bei einem pH-Wert, der dem eines gefüllten Magens entspricht, sollte nun noch die Stabilität in künstlichem Magensaft, sogenannten *simulated gastric fluid* – kurz *SGF* - untersucht werden. Der künstliche Magensaft setzt sich aus 0,2 % (m/v) NaCl, 0,32 % (m/v) Pepsin und 20 % (v/v) HCl gelöst in Wasser zusammen. Die Stabilitätsuntersuchung wurde wie unter 1.1.1.1.1 beschrieben durchgeführt. Die nach definierten Zeiten gewonnenen Proben wurden zur Inaktivierung des Pepsins zunächst mit NaOH bis zu einem pH-Wert von 7 neutralisiert und anschließend mittels RP-HPLC quantifiziert. Die zuvor erzielten positiven Ergebnisse mit der Aspartylprotease Pepsin in Puffer konnten in künstlichen Magensaft, wie in Tabelle 45 und Abbildung 50 ersichtlich, erfolgreich wiederholt werden. So konnten nach 24-stündiger Inkubation noch über 90 % von HP01 wiedergefunden werden.

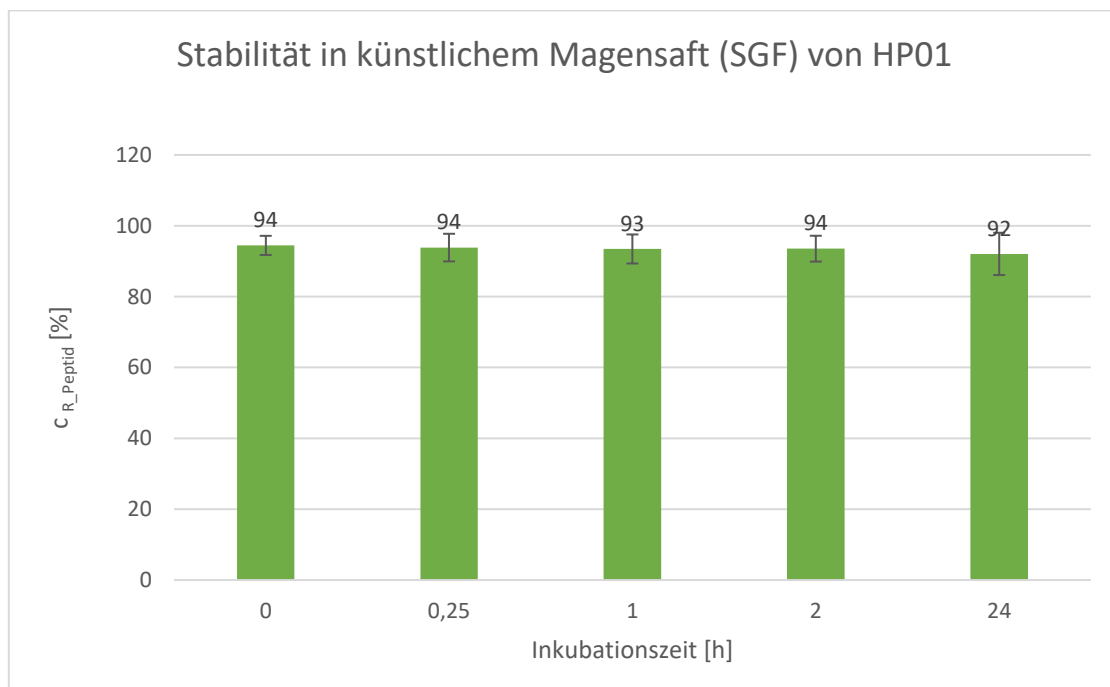


Abbildung 50: Darstellung der prozentual verbleibenden Peptidkonzentration von HP01 über die Inkubationszeit von 24 h in künstlichem Magensaft mit n=3

Tabelle 45: Parameter zum Testansatz der Stabilität in künstlichem Magensaft (SGF) von HP01

Simulated gastric fluid (SGF)				
Testansatz:	450 µL SGF, 50 µL 10 mM Peptidlösung, 37 °C			
Quenching:	22 µL 2 M NaOH			
	Zeit _i [h]	Absorption _{214 nm} [mAU]	C _{Peptid} [mg/mL]	C _{Peptid rest} [%]
	0	950,75017	0,1966	94,47
	0,25	949,03791	0,1962	93,85
	1	943,51449	0,1951	93,46
	2	941,3614	0,1947	93,54
	24	926,7374	0,1916	92,07

Diese sehr vielversprechenden Ergebnisse würden eine orale Applikation des antimikrobiellen Wirkstoffes erlauben, denn in der Regel verweilen Arzneistoffe, abhängig von der Menge des Mageninhaltes, zwischen 30 Minuten und drei Stunden. In diesem Bereich liegt der quantifizierbare Gehalt an HP01 noch bei ca. 93 % gegenüber der Ausgangskonzentration. Eine ausreichende nicht metabolisierte Wirkstoffkonzentration würde somit auch nach der Magenpassage zur Resorption im Dünndarm zur Verfügung stehen.

4.2.4 Untersuchungen zur zytotoxischen Unbedenklichkeit von HP01

Im Bereich Wirkstoffentwicklung gehört die Untersuchung auf zytotoxische Unbedenklichkeit zu einem der Hauptkriterien in Bezug auf die Arzneimittelwirkung. Im Laufe der Entwicklung neuer antibakterieller Chemotherapeutika ist es essentiell, dass die neue Substanz eine größtmögliche Wirkung gegenüber den bakteriellen Zellen aufweist. Dabei darf sie jedoch keine toxischen Einflüsse auf die Zellen des Wirtes, also gegenüber Säugerzellen, besitzen. Um das zytotoxische Potential von HP01 gegenüber Säugerzellen zu testen, wurden verschiedene Konzentrationen der Leitstruktur, im unter 3.2.5.2 beschriebenen MTT-Assay zur Überprüfung der Zellviabilität, eingesetzt. Als Positivkontrollen wurden zum einen das zytotoxische anionische Detergenz Natriumlaurylsulfat (SDS), mit einer Konzentration von 2,5 mg/mL, sowie das Zytostatikum Doxorubicin, mit einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Als Negativkontrolle diente 20 % (v/v) PBS.

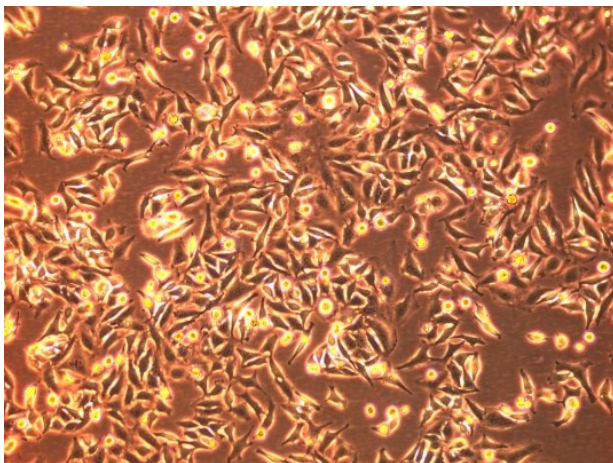


Abbildung 51: 80 %ige Konfluenz der HeLa-Zellen am Tag der Passage

Hierzu wurden die adhärenenten HeLa-Zellen bis zu einer Konfluenz von mindestens 80 % bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM Medium kultiviert (Abbildung 51). Nach Erreichen der erforderlichen Konfluenz wurden sie mit verschiedenen Konzentrationen von HP01 versetzt und für 24 h unter gleichbleibenden Bedingungen kultiviert. Nach Abschluss der 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) versetzt und, wie unter 3.2.5.2 beschrieben, inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde schließlich nach Behandlung der Zellen mit DMSO ihre Zellviabilität überprüft. Hierzu wurde die Reduktion von MTT durch die mitochondriale Reduktase zu einem wasserunlöslichen Formazan verfolgt und photometrisch bei 570 nm vermessen.

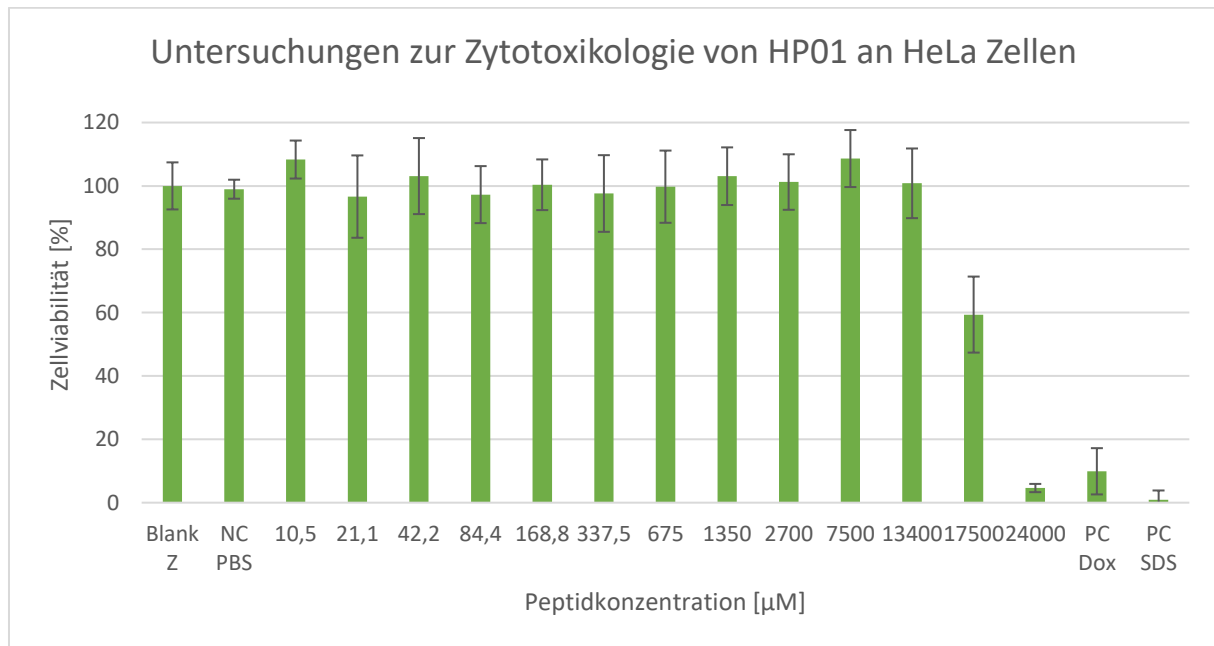


Abbildung 52: Zytotoxisches Profil von HP01 gegenüber HeLa-Zellen verglichen mit den Positivkontrollen Doxorubicin (10 µM) und SDS (2,5 mg/mL)

Das Peptid zeigt über einen weiten Konzentrationsbereich keine toxischen Einflüsse auf die HeLa-Zellen. Erst ab einer Konzentration größer 13,4 mM, was einer Volumenkonzentration von 14 mg/mL entsprach, zeigen sich zytotoxische Auswirkungen. Vergleicht man diese mit der MIC₉₀-Konzentration, so beginnen erste zytotoxische Effekte erst ab einem 14-fachen dieser Konzentration. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei der getesteten Substanz HP01 um eine noch zu optimierende Substanz handelt, bietet die Spanne zwischen Wirkkonzentration und dem Auftreten erster zytotoxischer Effekte eine breites Fenster für Optimierungen der Leitstruktur hin zu einem neuen pharmazeutischen Wirkstoff. Vergleicht man die gewonnen Daten mit Studien zur Zytotoxizität anderer antimikrobieller Peptide, so sind diese Daten als äußerst positiv zu bewerten (Knappe et al. 2010). So zeigten andere Vertreter der PrAMPs wie das Oncocin, selbst mit optimierten Derivaten in Studien an HeLa-Zellmodellen bereits zytotoxische Effekte bei einer Konzentration von 0,6 mg/mL, was sich in einer Zellviabilität von 40-80 % zeigte (Knappe et al. 2010). Allgemein gilt für die meisten AMPs, dass zytotoxische Effekte häufig bereits bei dem 2- bis 4-fachen der Wirkkonzentration beobachtet werden.

Dieses ist wahrscheinlich auf das zusätzliche Einfügen weiterer basischer Aminosäuren zurückzuführen, was zu einer Erhöhung der positiven Nettoladung der Oncocin-Derivate führt. Eine Erhöhung der positiven Nettoladung auf bis zu +5 resultiert zwar in einer Absenkung der MIC-Werte, zieht aber in vielen Modifikationsbeispielen einen drastischen Anstieg der Zytotoxizität nach sich. Zudem kann eine erhöhte Nettoladung im Fall der prolinreichen Peptide dazu führen, dass sie unter Umständen ihren Wirkmechanismus ändern und somit nur noch unspezifisch wie eine Vielzahl anderer kationischer Peptide wirken. Diese Art von AMPs eignen sich besonders aufgrund der hohen Zytotoxizität nicht für eine Weiterentwicklung zum Therapeutikum.

Im weiteren Verlauf der Arbeit, insbesondere im Bereich der QSAR-Studien sowie der einfachen rationalen Designansätze, sollte daher auf die Erhöhung der Nettoladung oberhalb +5 verzichtet werden.

4.2.5 *In-vivo*-Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität von HP01

Larven der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* werden als *In-vivo*-Infektions-Modell zur Testung antibakterieller Substanzen beschrieben. Dieses Modell wurde für die ersten *In-vivo*-Untersuchungen zur Aktivität des *Hirudo*-Peptids HP01 genutzt. Zur Infektion der Larven wurde der humanpathogene *E. coli* Stamm H132 eingesetzt. Die Larven wurden nach ihrer Größe sortiert und auf ihre Vitalität hin überprüft. Weiße und somit gesunde Larven wurden nun bis zum Erreichen eines Gewichtes von 200-250 mg in einem Brutschrank bei 23 °C in einer Petrischale mit frischem Futter gelagert. Dunkelfarbige Larven hingegen wurden direkt aussortiert (Abbildung 53).



Abbildung 53: Auswahl der Larven für das *Galleria mellonella*-Infektionsmodell: links: weiße ausgewählte Larven; rechte Seite dunkle aussortierte Larven

Die unterschiedlichen Peptidkonzentrationen sowie die Bakterieninokula wurden, wie unter 3.2.4.2 beschrieben, angesetzt bzw. hergestellt. Pro Infektionsstudie wurden zehn Larven eingesetzt. Die

Injektion von 10 μL Bakteriensuspension und somit die Infektion der Larven erfolgte mittels Mikroapplikator.



Abbildung 54: Infektion der Larven mittels Mikroapplikator

Die infizierten Larven wurden im Anschluss auf frischem Futter in einer Petrischale gesetzt und bei 37 °C in einem Brutschrank für die jeweilige Versuchsdauer gelagert. Täglich erfolgten eine Vitalitätskontrolle und Zählung der Larven.



Abbildung 55: Verpuppung einer Larve: links oben: normale Puppe; Links unten: Kannibalismus; Rechts: Zerstörte Puppe

Parallel zur Injektion wurde eine 10-fach-fortlaufende Verdünnungsreihe (bis 1:10⁶) der Bakteriensuspension, wie im Methodenteil beschrieben, hergestellt und von den beiden letzten Verdünnungsstufen (1:10⁵ und 1:10⁶) jeweils 100 μL auf eine LB-Agarplatte ausplattiert. Zur Berechnung der realen

Infektionsdosis wurde ebenfalls eine 10-fach fortlaufende Verdünnungsreihe des Testansatzes Bakterien+HP01 500 µg/mL hergestellte und hier lediglich die Verdünnungsstufe 1:10⁴ auf LB-Agar ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte für 24 h bei 37 °C und am darauffolgenden Tag wurden die koloniebildenden Einheiten (CFU) entsprechend bestimmt. Im Verlauf der Experimente wurde bei einzelnen Larven eine Verpuppung beobachtet, diese Larven wurden separiert, da die Larven gegenüber den Puppen zu Kannibalismus neigen. Ebenso konnte ein Gewichtsverlust einen Tag nach Infektion festgestellt werden, welcher unter anderem auf die Inkubationstemperatur zurückzuführen sein könnte.

Zunächst wurden Vorversuche zur Testung der Überlebensrate der Larven durchgeführt. Hierzu wurden je zehn Larven mit *E. coli* H132 bzw. mit physiologischer, steriler Kochsalzlösung injiziert und über sieben Tage beobachtet (Tabelle 46).

Tabelle 46: Ergebnisse der Vorversuche zur Ermittlung der Überlebensrate

		<i>E. coli</i> H132	0,9 % NaCl
12.03.2018	OD	1,02	
	Inkubation [h]	1,42	
	CFUs	218 * (10 ⁻⁵)	0
	Überlebensrate nach 7 Tagen [%]	0	100
13.03.2018	OD	0,99	
	Inkubation [h]	1,42	
	CFUs	185 * (10 ⁻⁵)	0
	Überlebensrate nach 7 Tagen [%]	0	100
14.03.2018	OD	1,04	
	Inkubation [h]	1,67	
	CFUs	230 * (10 ⁻⁵)	0
	Überlebensrate nach 7 Tagen [%]	0	100

Die Ergebnisse des Vorversuches zeigten, dass alle mit *E. coli* H132 infizierten Larven nach sieben Tagen starben und alle Larven, welche lediglich eine sterile Kochsalzlösung injiziert bekamen, überlebten die sieben Tage im Infektionsmodell. Im Anschluss an die Vorversuche erfolgte nun ein weiteres Experiment zur Erhebung erster *In-vivo*-Daten zur antimikrobiellen Wirkung des Peptides HP01. Hierzu wurde das Peptid in drei unterschiedlichen Wirkungs-dosen eingesetzt.

Tabelle 47: Ergebnisse der Infektionsversuche mit *E. coli* H132 und verschiedenen Konzentrationen von HP01

		<i>E. coli</i> H132	<i>E. coli</i> H132 + 20 µg/mL HP01	<i>E. coli</i> H132 + 100 µg/mL HP01	<i>E. coli</i> H132 + 500 µg/mL HP01
16.03.2018	OD	1			
	Inkubation [h]	2,1			
	CFUs	218 * (10 ⁻⁵)	223 * (10 ⁻⁵)	25 * (10 ⁻⁵)	0 * (10 ⁻⁴)
	Überlebensrate nach 7 Tagen [%]	0	0	0	90
12.04.2018	OD	1,15			
	Inkubation [h]	1,9			
	CFUs	170 * (10 ⁻⁵)	160 * (10 ⁻⁵)	3 * (10 ⁻⁵)	0 * (10 ⁻⁴)
	Überlebensrate nach 7 Tagen [%]	0	0	70	90
13.04.2018	OD	1,32			
	Inkubation [h]	2,62			
	CFUs	390 * (10 ⁻⁵)	150 * (10 ⁻⁵)	7 * (10 ⁻⁵)	0 * (10 ⁻⁴)
	Überlebensrate nach 7 Tagen [%]	0		0	5

Zusätzlich wurde neben den beiden Kontrollgruppen auch noch eine mögliche toxische Wirkung durch das Peptid selbst auf die Larven ohne Bakterien getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 47 dargestellt

Die in Tabelle 48 dargestellten Daten zeigen, dass die Leitstruktur HP01 selbst in der höchsten eingesetzten Konzentration keine toxischen Eigenschaften gegenüber den Larven aufwies. In allen drei unabhängigen Experimenten zeigte sich eine Überlebensrate der Larven von 100 % und ließ sich somit nicht von der als Negativkontrolle eingesetzten NaCl-Lösung unterscheiden.

Tabelle 48: Überprüfung der In-vivo-Toxizität von HP01

		20 µg/mL HP01	100 µg/mL HP01	500 µg/mL HP01	0,9 % NaCl
16.03.2018	OD				
	Inkubation [h]				
	CFUs				0
	Überlebensrate nach 7 Tagen [%]	100	100	100	100

12.04.2018	OD				
	Inkubation [h]				
	CFUs				
	Überlebensrate nach 7 Tagen [%]	80	90	90	100
13.04.2018	OD				
	Inkubation [h]				
	CFUs				
	Überlebensrate nach 7 Tagen [%]	70	100	100	100

Die Abweichungen in der Überlebensrate insbesondere im Experiment zwei lassen sich durch Kannibalismus, wie eingangs erwähnt, unter den Larven erklären, weswegen eine Einzelhaltung der Gallerien zu bevorzugen ist. Dies wurde im letzten Experiment entsprechend berücksichtigt.

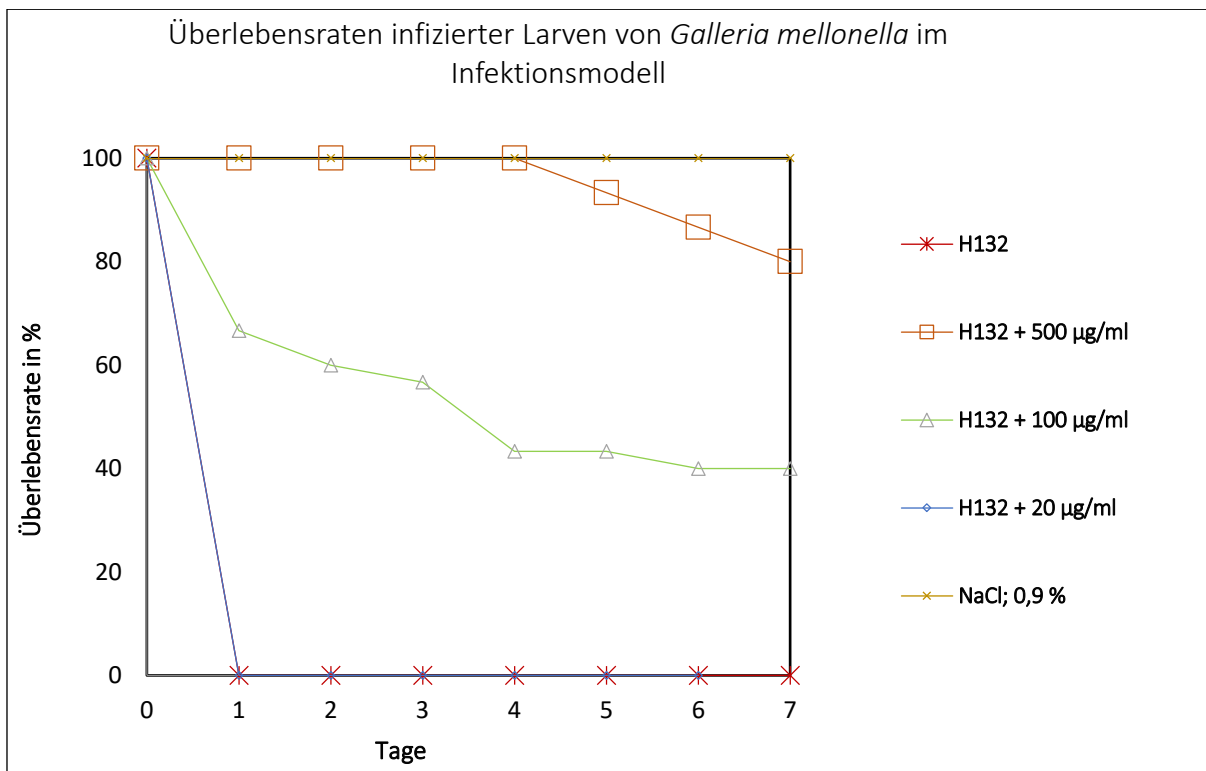


Abbildung 56: Grafische Darstellung der gemittelten Überlebensraten der drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimente im Infektionsmodell *Galleria mellonella*

Eine Infektion der Larven lediglich mit *E. coli* H132 bestätigte die bereits im Vorfeld durchgeführten Experimente zur Überlebensrate der Larven. In den unabhängig voneinander durchgeführten Triplikaten konnte abermals eine Überlebensrate von 0 % ermittelt werden. Infizierte man die Larven

mit der niedrigsten Dosierung des Wirkstoffes von 20 µg/mL, zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie bei der Injektion der reinen Bakteriensuspension, hier überlebten keine Larven. Im Bereich der mittleren Wirkstoffmenge von 100 µg/mL zeigten sich höhere Standardabweichungen, trotzdem war hier schon ein klarer Trend erkennbar (siehe Abbildung 56). Mit der höchsten Wirkstoffkonzentration von 500 µg/mL wurde eine mittlere Überlebensrate von 80 % nach sieben Tagen Inkubation *post infectum* gemessen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 56 aufgezeigt. Bei einem Molekulargewicht der Leitstruktur HP01 von 971,12 Da errechnet sich die absolute Wirkmengenkonzentration zu 5 nmol.

Ein Vergleich mit anderen PrAMPs ist zurzeit noch nicht möglich, da im Bereich *In-vivo*-Infektionsmodelle im allgemeinen Mäuse getestet werden und somit noch keine Daten für Gallerienmodelle verfügbar sind. In einem systemischen Infektionsmodell an Mäusen wurde für das optimierte prolinreiche AMP Oncocin72 eine gute Wirkung gegenüber dem gramnegativen Bakterienstamm *Escherichia coli* und einem KPC- produzierendem Stamm von *Klebsiella pneumoniae* nachgewiesen (Knappe et al. 2015). Die Leitstruktur HP01 zeigt schon vor Beginn der Optimierung und weiteren Untersuchungen zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen sehr vielversprechende Ergebnisse im ersten *In-vivo*-Modell und übertrifft sogar noch die bisher gewonnenen *In-vitro*-Ergebnisse. Hieraus wird ersichtlich, dass es Unterschiede bzgl. des Wirkmechanismus, selbst in einem recht einfachen Modellorganismus wie den Larven von *Galleria mellonella*, zwischen *in vivo* und *in vitro* Modell gibt, wie es häufig im Bereich der Wirkstoffentwicklung beim Übergang *In-vitro*- zu *In-vivo*- Experimenten der Fall ist.

4.3 Untersuchungen zur quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehung (QSAR) mit Hilfe einfacher rationaler Designkonzepte

4.3.1 Alaninscan

Zur Identifizierung der für die biologische Aktivität kritischen Aminosäurepositionen innerhalb der Peptidsequenz wurde ein so genannter Alaninscan durchgeführt. Dabei wird sukzessive jede Aminosäure einer Peptidsequenz durch die kleinste chirale Aminosäure Alanin ersetzt. Ziel dieser Methode der Kombinatorischen Chemie ist die Identifizierung für die Aktivität wichtiger Aminosäurereste, die im Zuge der Leitstrukturoptimierung nicht oder nur bedingt geändert werden dürfen, da dies meist mit einem starken Abfall bis hin zum vollständigen Verlust der Aktivität einhergeht.

Diese Methode wurde für die Abschätzung erster Struktur-Wirkungsbeziehungen des Peptid HP01 eingesetzt. Nach erfolgter Synthese wurden die Peptidderivate mittels Mikrodilutionsassay wie unter 3.2.4.1 beschrieben auf ihre antimikrobielle Wirkung gegenüber dem gramnegativen Bakterium *E. coli* BL21 getestet. Die Ergebnisse dieser Testreihe sind in Abbildung 57 aufgezeigt. Vergleicht man die so gewonnenen Daten mit dem antibakteriellen Potential von HP01, so wurden bei der Substitution von insgesamt sechs Aminosäurepositionen zum Teil erhebliche Wirkungseinbußen gemessen.

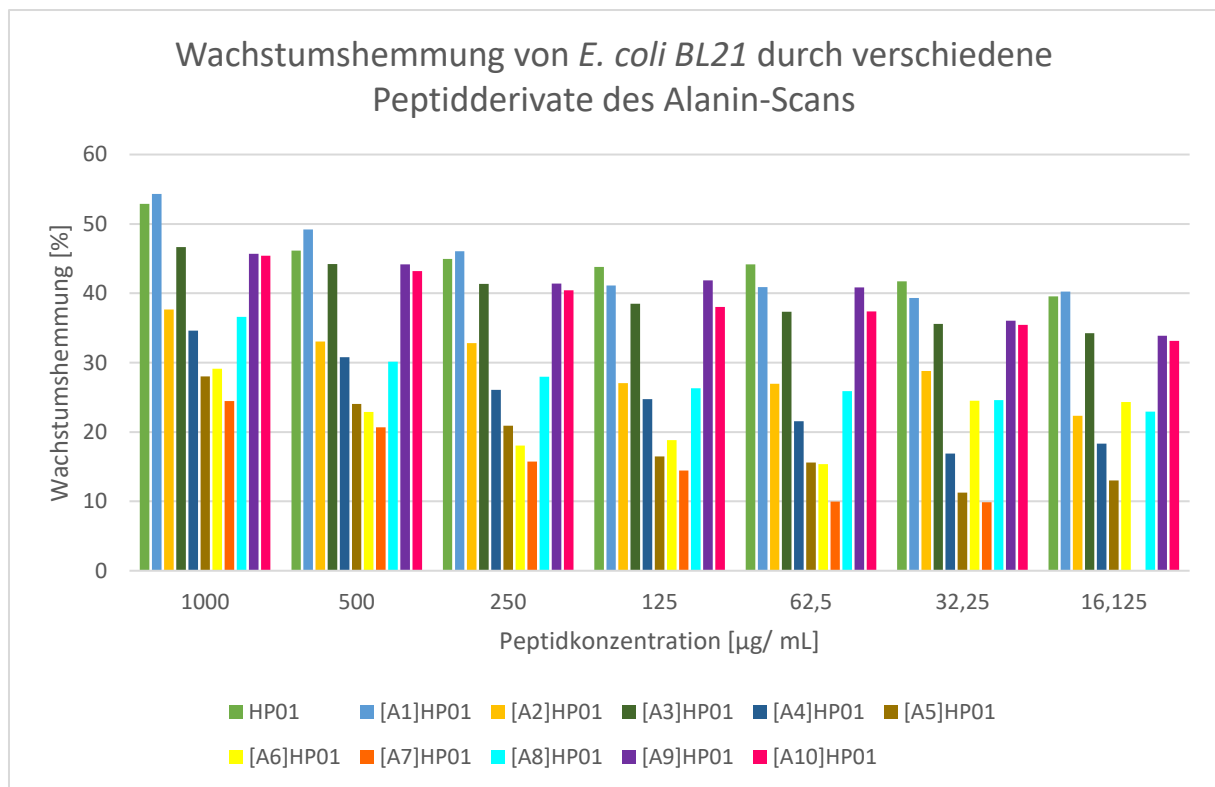


Abbildung 57: Dosisabhängige antibakterielle Wirkung der Ala-Scan Peptidderivate

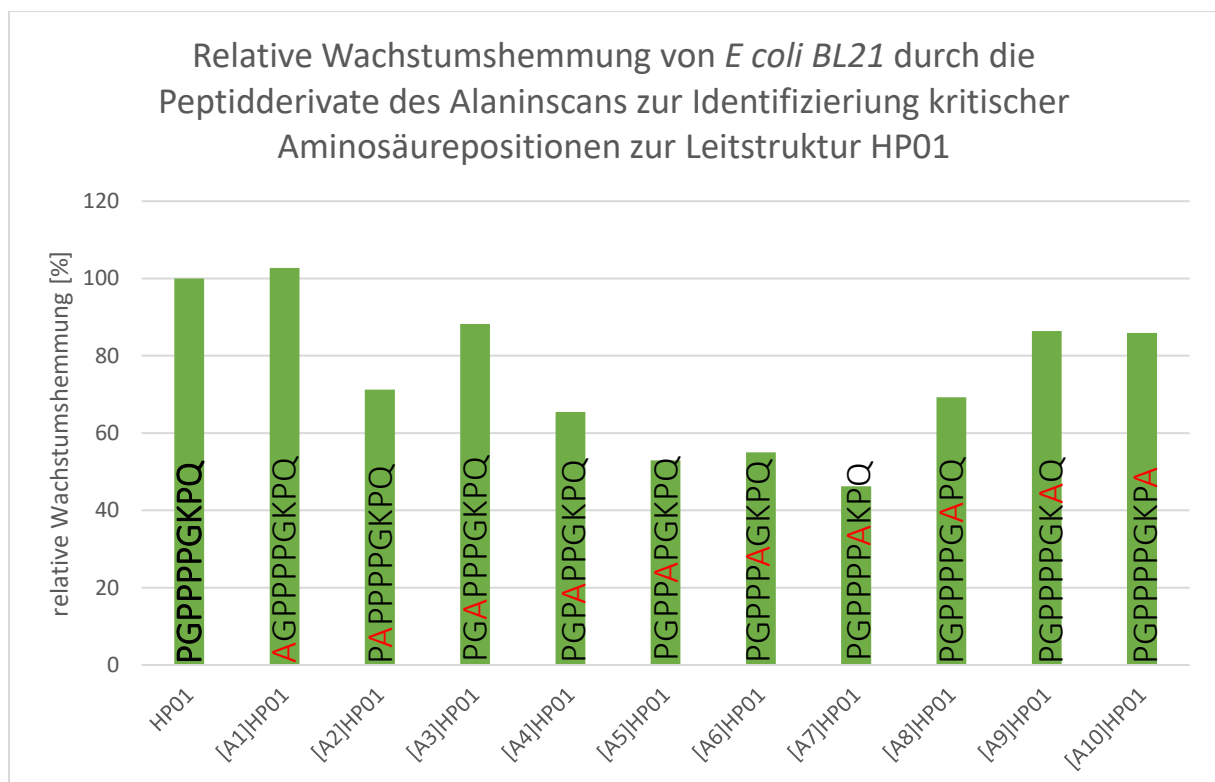


Abbildung 58: Relative Wachstumshemmung von *E. coli* BL21 durch die Ala-Scan Peptide im Verhältnis zur Leitstruktur HP01

Im Wesentlichen betraf das den Polyprolinkern von Aminosäureposition 4 bis 7. Eine Substitution im Bereich der vier Proline (PGPPP GK PQ) führte zu einem Abfall der Aktivität von nahezu 50 %. Das Derivat [A⁵] HP01 wies bei der höchsten Konzentration von 1 mg/mL eine Wachstumshemmung von nur noch 28 % auf, die Leitsubstanz HP01 hingegen erreichte hier noch den IC₅₀-Wert. Überraschenderweise wirkte sich jedoch eine Substitution der siebten Aminosäure Glycin am drastischsten aus. Setzte man an dieser Stelle stattdessen Alanin ein verringerte sich die Aktivität um mehr als die Hälfte. Verglichen mit der Leitsubstanz konnte hier nur noch eine Wachstumsinhibition von 25 % erreicht werden. Dies bedeutet, dass im Verhältnis zu HP01 lediglich 45 % des antibakteriellen Potentials erhalten blieben. In der nachfolgenden Abbildung 58 sind die zur Leitstruktur HP01 relativen Wachstumshemmungen grafisch dargestellt

Die Minderung der antimikrobiellen Aktivität durch Substitutionen innerhalb des Polyprolinkerns sind nicht verwunderlich und können durch die strukturellen Gegebenheiten eines solchen Polyprolinteils plausibel erklärt werden.

Polypeptide benötigen häufig für ihre Funktion oder biologische Aktivität spezielle strukturelle Anordnungen, welche sie über die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen einnehmen. Zu diesen Sekundärstrukturen gehören unter anderem helikale Anordnungen wie bspw. die α -Helix. Diese Strukturelemente entstehen durch intramolekulare Wechselwirkungen, im Fall der helikalen Anordnungen durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Antimikrobielle Peptide können, wie eingangs erläutert, ebenfalls Sekundärstrukturelemente ausbilden, welche in den meisten Fällen essentiell für ihre antimikrobielle Wirkung sind. Eine helikale Anordnung ist besonders günstig für die Interaktion der Peptide mit bakteriellen Membranen, da sich so unter Umständen der für antimikrobielle Peptide wichtige amphiphile Charakter erst zeigt. Prolinreiche AMPs können durch ihren hohen Anteil an Prolinen je nach Verteilung eine spezielle helikale Struktur ausbilden, welche zu den sogenannten *extended structures* zählt, die Poly-L-prolin-II-Helix (PPII-Helix).

Die PPII-Helix ist verglichen mit der bekannten alpha-helikalen Struktur (5,4 Å pro Windung) eine verlängerte und gestreckte linkshändige Form einer Spirale (9,6 Å pro Windung). In einer idealen Form der PPII-Helix bilden drei Aminosäurereste eine Umdrehung. Sie besitzt eine 3-fache Rotationssymmetrie und ist in Form eines Dreieckprismas angeordnet (Adzhubei et al. 2013).

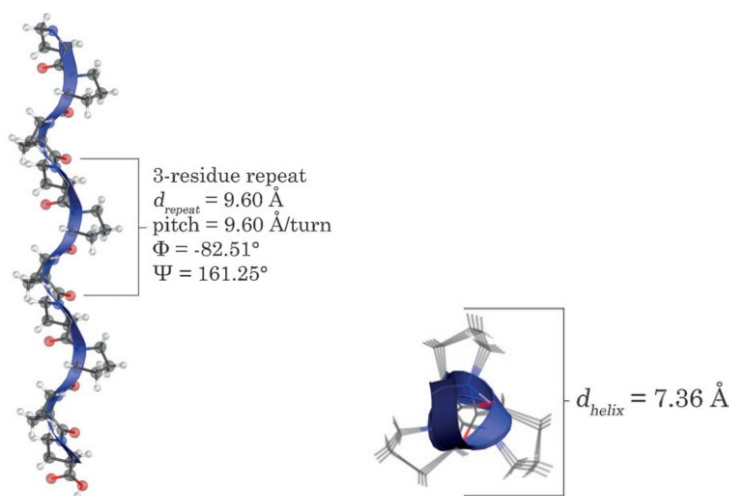


Abbildung 59: Strukturen eines 10 mer Poly-L-II-Profils. Links PPII- Helix; dargestellt sind der Abstand pro kristallographischer Wiederholung (Drepeat), Neigung bzw. Distanz pro Helixschwingung (pitch), die beiden Ramachandran Winkel (Φ und Ψ), sowie rechts die Form eines Dreieckprismas mit Durchmesser der Spirale (Ruggiero et al. 2016)

Verschiedene Studien zeigten außerdem, dass nicht nur der Anteil von L-Prolin ausschlaggebend für die strukturelle Natur der PPII-Helix ist, sondern auch die Anwesenheit von bestimmten Aminosäuren sich positiv, aber auch negativ auf die ideale Ausbildung dieses Helixtypes auswirken können. Hierzu gehören unter anderem die Aminosäuren Glycin und Lysin. Betrachtet man nun die Sequenzabfolge der Leitstruktur HP01, insbesondere den Polyprolinkern zwischen Position 2 und 8, befinden sich genau diese beiden Aminosäuren an diesen Stellen. Die Substitution der Aminosäure Glycin in Position 2 (Derivat [A²]HP01) und der basischen Aminosäure Lysin an Position 8 zeigen schon erheblichen Einfluss auf die Wachstumshemmung gegenüber *E. coli* BL21. Im Falle der Substitution des Lysins an Position 8 entfällt ein weiterer wichtiger Parameter für die antimikrobielle Wirkung, da Lysin unter physiologischen Bedingungen bei pH 7 positiv geladen vorliegt und somit zu einer positiven Nettoladung von +1 führt. Diese ist ebenfalls ein wichtiger physikochemischer Parameter bezgl. der Membraninteraktion und somit nicht unerheblich für die antimikrobielle Wirkung. Substitutionen in der Abfolge der Proline von Position 3 bis 6 zieht ebenfalls einen Abfall der antimikrobiellen Wirkung nach sich. Besonders problematisch zeigt sich jedoch der Austausch des Glycins an Position 5. Die beiden Glycine stellen so offensichtlich für eine optimale PPII-Helix-Anordnung wichtige Positionen dar, deren Austausch sich negativ auf die AMP wichtige strukturelle Konformation auswirkt. Für weitere QSAR-Studien sollten daher vorerst keine Änderung innerhalb des Prolinkerns vorgenommen werden.

4.3.2 Modifikationen

Zur Untersuchung des Wirkungsmechanismus und zur näheren Targetfindung werden nun Prinzipien des strukturbasierten Wirkstoffdesigns und Studien zur quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehung des neu identifizierten Peptides aus *Hirudo verbana* angewandt. Ziel dieser Studien ist es einen Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und der biologischen Wirkung zu erfassen und zu quantifizieren. In der Regel finden beim strukturbasierten Wirkstoffdesign rechnergestützte *In-silico*-Methoden Einsatz, mit deren Hilfe Docking-Studien, Homologiesuchen oder molekulare Modellierungen durchgeführt werden, um so zu einem bereits bekannten Target den optimalen Liganden zu finden. Mit Hilfe der computergestützten Systeme werden wichtige Bindungsstellen zwischen Zielprotein und Ligand identifiziert. Dieser wird in einem nächsten Schritt synthetisiert und schließlich auf die biologische Wirkung hin getestet. Ist das Target, wie in der vorliegenden Arbeit noch zu identifizieren, kann man sich trotzdem bestimmter Designregeln aus dem strukturbasierten Wirkstoffdesign bedienen und so eine Optimierung der Struktur hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung und ihres zytotoxikologischen Potential erreichen.

Die Optimierungsschritte von HP01 wurden anhand einer Reihe von physiko-chemischen Parametern die für antimikrobielle Peptide wichtiger sein sollten, durchgeführt. Ebenso wurden, Sequenzhomologien mit bekannten prolinreichen Peptide in die Überlegungen einbezogen. Im Folgenden wird kurz auf die Eigenschaften, welche während der Entwicklung neuer Derivate berücksichtigt wurden, eingegangen. Eine ausführliche Erläuterung findet sich im Theorieteil.

Die **Nettoladung** antimikrobieller Peptide bei einem physiologischen pH-Wert nimmt Einfluss auf eine Vielzahl elektrostatischer Wechselwirkungen, so auch auf den ersten Kontakt mit der Membran. Viele antimikrobiellen Peptide besitzen eine positive Nettoladung. Problematisch bei der Entwicklung neuer Derivate ist hierbei ein Überschreiten einer optimalen Ladung, da mit zunehmender Ladung das

zytotoxikologische Potential dieser Peptide deutlich zunimmt und auch die Wirkung unspezifischer wird. Für das Design neuer Derivate von HP01 wurde eine maximale Nettoladung von +5 als Obergrenze festgelegt.

Ein Hauptaugenmerk lag außerdem auf der **Hydrophobizität** <H> bzw. auf dem **hydrophoben Moment** < μ H>. Beide Parameter sind wichtig für eine Membrantranslokation, die zum Erreichen eines intrazellulären Targets und damit für die Aufnahme in die Zelle unerlässlich sind. Hier spielt insbesondere das hydrophobe Moment eine große Rolle, dass dies ein direktes Maß für die Amphiphilie und damit für die Membrangängigkeit darstellt. Amphiphile Peptide mit antimikrobieller Aktivität besitzen in der Regel immer einen kationischen und einen hydrophoben Anteil.

Einen weiteren Einfluss auf die zelluläre Aufnahme zeigen allerdings auch Modifikationen der **N- und C-terminalen Regionen**, sowie Änderungen in der Länge der PrAMPs (Guida et al. 2015). Daher wurden hier auch unterschiedliche Modifikationen vorgenommen.

So wurden zunächst Modifikationen innerhalb der Kern-Sequenz von HP01 unter Berücksichtigung der kritischen Positionen, die durch den Alaninscan identifiziert werden konnten vorgenommen. In einem zweiten Schritt wurden Derivate mit verändertem N-Terminus oder C-Terminus synthetisiert. Im darauffolgenden letzten Schritt wurden nach Bewertung der Ergebnisse aus den vorangegangenen Modifizierungen schließlich Derivate mit Änderungen am N-Terminus und am C-Terminus synthetisiert. Die physikochemischen Eigenschaften der Derivate wurden mit Hilfe des Softwaretools CellPPD und HeliQuest *in silico* bestimmt.

4.3.2.1 Derivate mit Änderungen im Core-Peptid HP01

Insgesamt wurden 62 Derivate mit unterschiedlichen Modifikationen synthetisiert und getestet. Insgesamt wurden 25 Derivate synthetisiert (Übersicht im Anhang Tabelle 70). Die drei erfolgreichsten Derivate aus dieser Design-Reihe sind in Tabelle 49 dargestellt. Hier ist das Hauptaugenmerk auf die Position [K⁸] und das dortige befindliche Lysin gerichtet, welches in allen drei hier dargestellten Sequenzen durch das ebenfalls basische Arginin ersetzt wurde.

Tabelle 49: Übersicht Derivate mit Modifikationen des Kern-Peptides HP01

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Molekulargewicht (Da)	pI theor.	Hydrophobizität / Amphipathie	Nettoladung
BT 1	HP01	PGPPPPGKPKQ	971,12	9,11	(- 0,19) / 0,49	+ 1
BT 27	[R][R ⁸] HP01	RPGPPPPGRPKQ	1098,27	12,01	(- 0,45) / 0,61	+ 2
BT 30	[RQ][R ⁸] HP01-NH ₂	RQPGPPPPGRPKQ-NH ₂	1225,4	12,01	(- 0,37) / 0,51	+ 2

- BT 1 HP01

Im Zuge der QSAR-Studien wurde die Leitsubstanz HP01 erneut gegen den in den QSAR-Studien eingesetzten Stamm *E. coli* BL21 getestet. Diese gewonnenen Daten galten als Referenz für das nun folgende strukturbasierte Wirkstoffdesign.

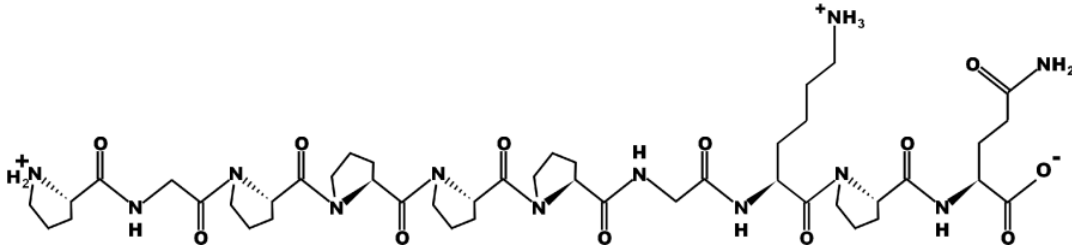


Abbildung 60: Chemische Struktur der Leitsubstanz HP01 (erstellt mit PepDraw).

Die Daten zur Festphasensynthese inklusive analytische Daten sind Abschnitt 4.2.1 zu entnehmen.

Innerhalb dieser Studie zeigte das Peptid HP01 gegen *E. coli* BL21 einen gute Dosis-Wirkungsverlauf mit einem IC₅₀-Wert von 1000 µg/mL. Die physikochemischen Parameter Hydrophobizität <H> mit einem Wert von 0,311 und hydrophobes Moment <μH> mit einem Wert von 0,122 gelten ebenso wie der IC₅₀-Wert für alle darauffolgenden Derivate als Referenzwerte.

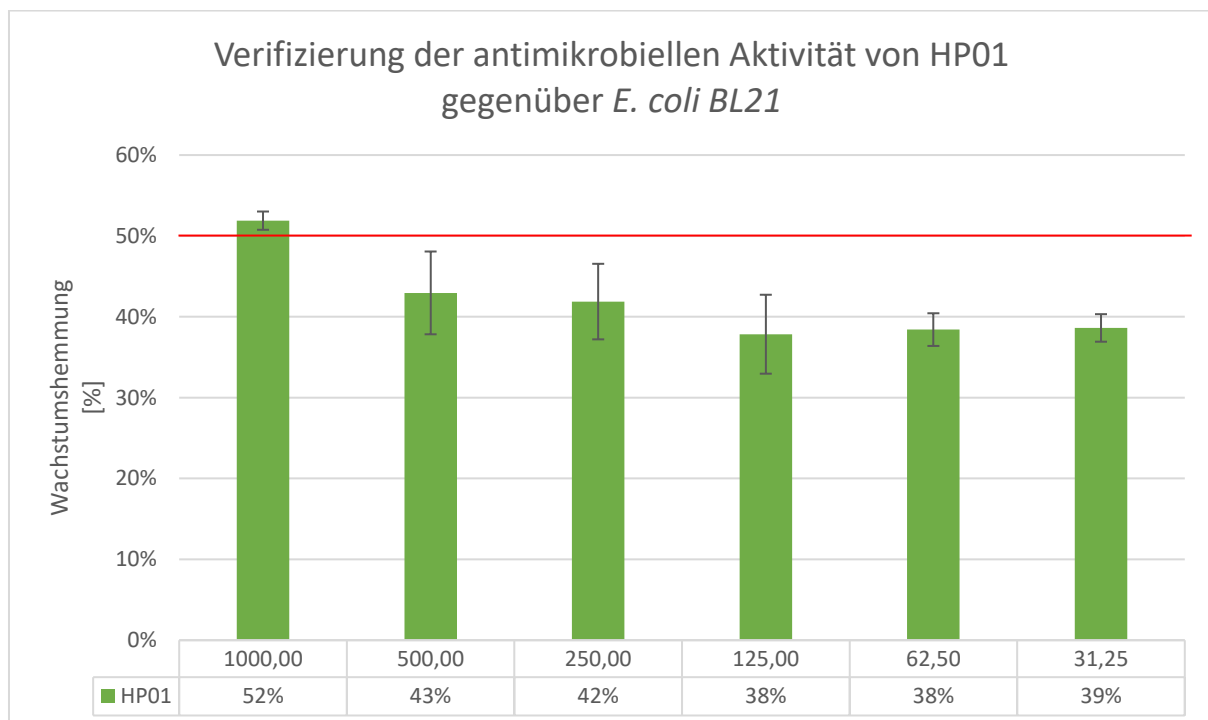


Abbildung 61: Dosis-Wirkungs-Verlauf der Leitstruktur HP01 im Mikrodilutionsassay gegen *E. coli* BL21

- BT 27 [RQ][R⁸]HP01

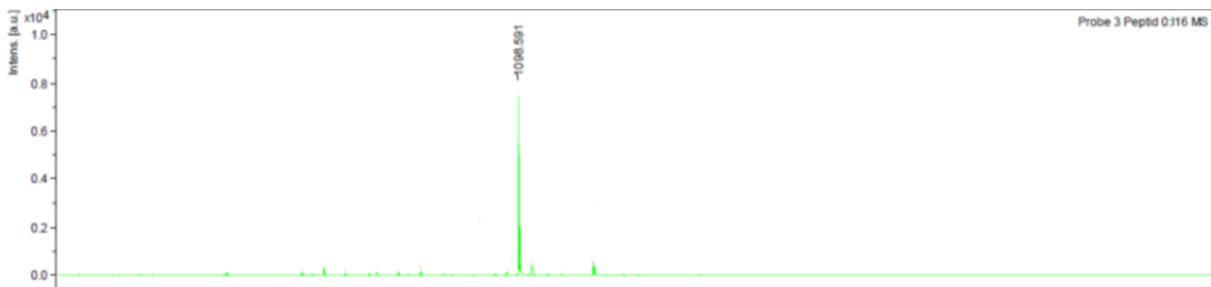
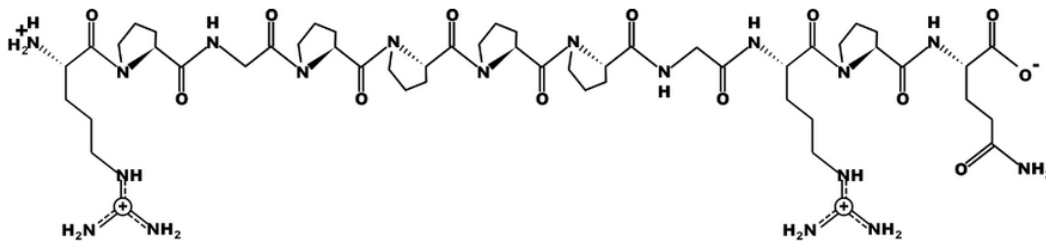


Abbildung 62: Oben: Chemische Struktur von [R][R⁸]HP01; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 1098 Da.

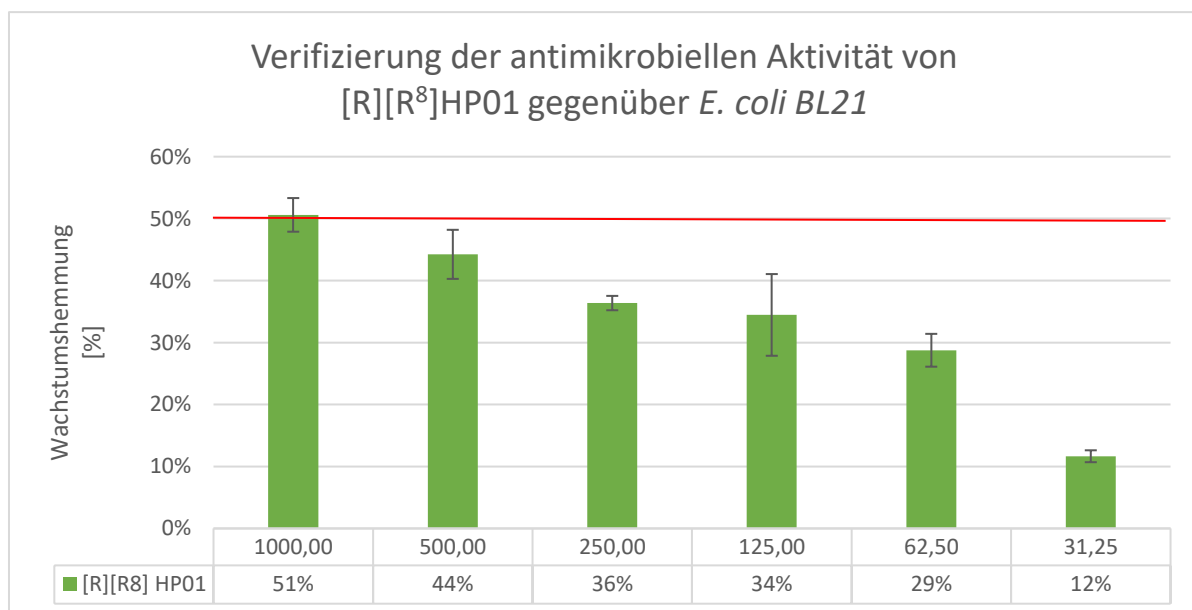


Abbildung 63: Antimikrobielle Wirkung von [R][R⁸]HP01 gegenüber dem Referenzkeim *E. coli* BL 21 mit einer IC₅₀ von 1000 µg/mL

Nach erfolgreicher Synthese von [R][R⁸]HP01 wurde dessen antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* BL 21 im Mikrodilutionsassay getestet. Nach Substitution des Lysins durch Arginin und Anfügen eines Arginins am N-Terminus, zeigte sich ein deutlich dosisabhängiger Verlauf und ein IC₅₀-Wert von 1000 µg/mL. Durch die Substitution des Lysins durch Arginin und das N-terminale Anfügen eines weiteren Arginins

verändern sich Hydrophobizität und hydrophobe Moment, da eine Änderung im Verhältnis polarer zu unpolaren Aminosäuren entsteht. Demzufolge sinkt die Hydrophobizität $\langle H \rangle$ gegenüber dem der Leitstruktur um 40 % auf 0,189. Das hydrophobische Moment verändert sich ebenfalls entsprechend und steigt um 70 % auf 0,191.

- BT 30 [RQ][R⁸]HP01 -NH₂

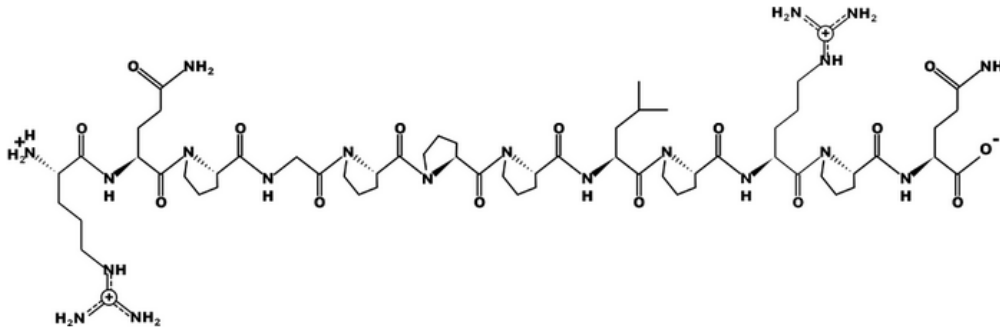


Abbildung 64: Chemische Struktur von [RQ][R⁸]HP01-NH₂

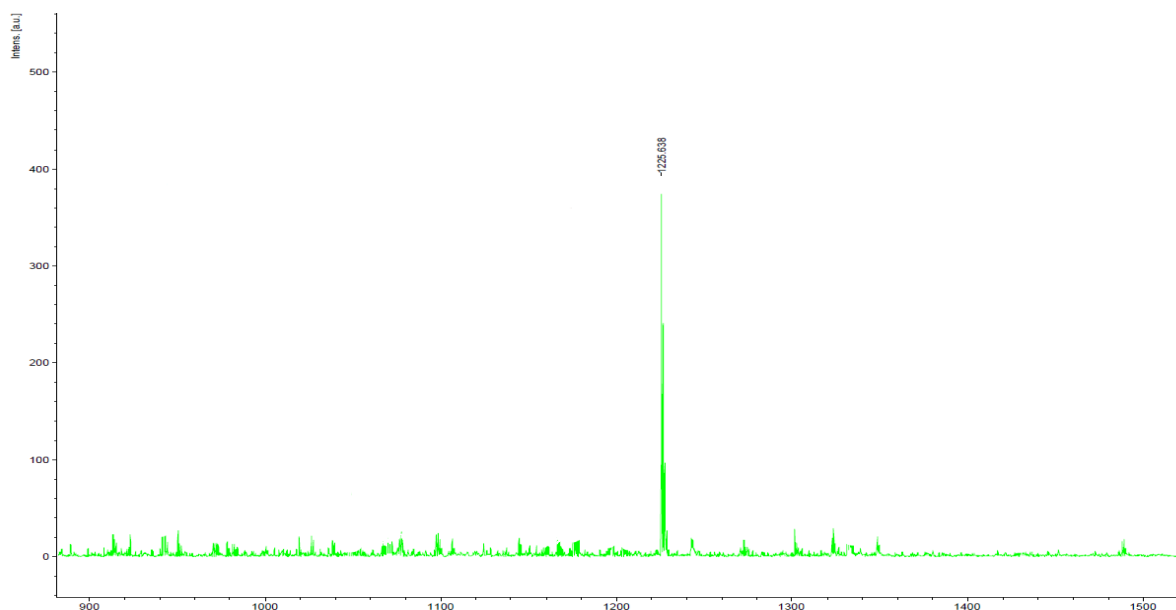


Abbildung 65: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 1225 Da.

Im zweiten Derivat innerhalb der Kern-Modifizierungen wurden ein Glutamin an der zweiten N-terminalen Position eingefügt und der C-Terminus amidiert, was durch Synthese des Peptides mit einem Rink-Amidresin realisiert wurde, so dass direkt nach der durchgeführten Abspaltung des Peptides von Trägerharz ein CONH₂-Ende vorlag. Das synthetisierte Derivat konnte im anschließend durchgeführten Mikrodilutionsassays den für die Wirkstoffentwicklung wichtigen IC₅₀-Wert selbst mit der im Test höchsten eingesetzten Konzentration nicht mehr erreichen. Die Hydrophobizität des Derivates erreichte lediglich 50 % des Wertes von HP01. Ebenfalls sinkt das hydrophobe Moment auf einen Wert von 0,105.

Hier liegt das Verhältnis von polaren und hydrophoben Aminosäuren bei 50 %, was angesichts des Ausbleibens einer signifikanten Wirkung vermieden werden sollte

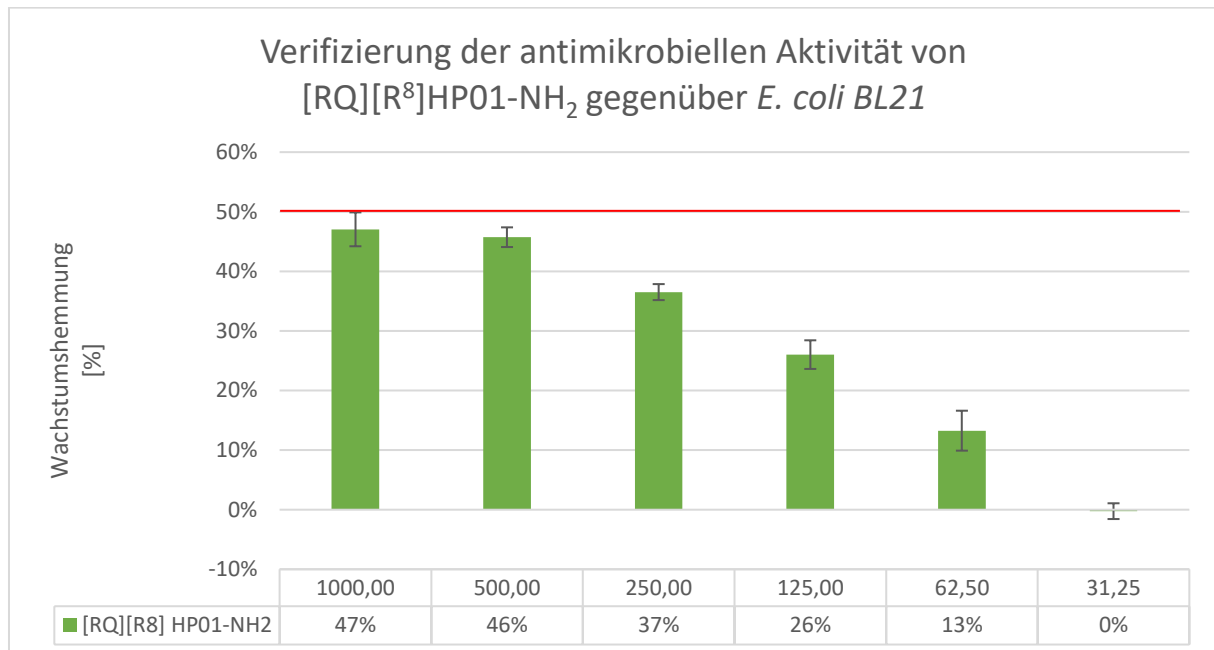


Abbildung 66: Dosisabhängige antibakterielle Wirkung von [RQ][R⁸]HP01 -NH₂ auf das Wachstum von *E. coli* BL 21

Im Zuge der ersten Modifikationen zur Untersuchung der quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen stand die Substitution der Aminosäure Lysin am Position 8 im Fokus. Die meisten AMPs sind kationisch, was im Allgemeinen auf das Vorhandensein der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin zurückzuführen ist. Obwohl beide bei physiologischen Bedingungen Träger positiver Ladung sind, unterscheiden sie sich bei neutralem pH-Wert deutlich in ihrem pKa-Wert, wobei der von Arg bei 12,45 liegt und der von Lys bei 10,5. Diese Unterschiede wirken sich auch auf ihre Protonierungszustände in Membrenumgebung aus. Theoretische Berechnungen ergaben, dass Arg seinen Protonierungszustand im lipophilen inneren Bereich einer Membran beibehält, wohingegen Lys im Bilayer deprotoniert wird (Yoo und Cui 2008; Gleason et al. 2013).

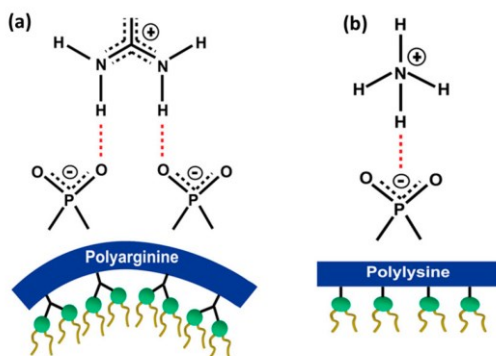


Abbildung 67: Schematische Darstellung der (a) bidentatischen und (b) monodentaten Wasserstoffbrückenbindungen: Wechselwirkung der Guanidingruppe des Arginins bzw. der Lysin-Seitenkette mit der Membran, entnommen aus Mishra et al. 2011

Aufgrund des hohen pKa und der mehrfachen Wasserstoffbrückenbindungseigenschaften von Arg wird vermutet, dass Arginin-reiche Peptide stärkere Wechselwirkungen mit anderen Peptiden eingehen können. Untersuchungen zeigten, dass auch Mehrfach-Arginin-Motive die Membrantranslokation unterstützen können. Diese Motive finden sich häufig auch in so genannten zellpenetrierenden Peptiden, kurz CPP (Bechara und Sagan 2013). Studien zeigten auch, dass Arg aufgrund seiner Guanidingruppe in der Seitenkette über Wasserstoffbrückenbindungen stärker an PO₄-Gruppen bindet als Lys und somit eine stärkere negative Gaußsche Krümmung eines amphiphilen Bilayers induzieren kann. Auch dies führt zu einer verbesserten Translokation (Schmidt und Wong 2013; Wu et al. 2013).

Obwohl in vielen Studien die Präferenz von Arg gezeigt wurde, wirken einige Peptide mit Lysinresten besser im Vergleich zu deren analogen Derivate mit Arginin. Zum Beispiel das Arginin-modifizierte Polymyxin B zeigte eine verminderte antimikrobielle Aktivität, was darauf hindeutet, dass es keine allgemeine Regel für die selektive Präferenz von Arginin gegenüber Lysin in AMPs gibt (Rabanal et al. 2015).

4.3.2.2 Derivate mit N-terminalen Modifizierungen

QSAR-Studien zu strukturellen Änderungen am N-terminalen Ende eines antimikrobiellen Peptides zeigten, dass diese einen entscheidenden Einfluss auf die Membrantranslokation haben und prinzipiell entscheidend für das antibakterielle Spektrum eines AMPs zu sein scheinen (Guida et al. 2015). Daher wurden acht Derivate mit unterschiedlichen N-Termini synthetisiert (Übersicht im AnhangTabelle 67). Auf insgesamt fünf dieser Derivate, die in Tabelle 50 aufgelistet sind, soll nun im Folgenden näher eingegangen werden. Die Derivate lassen sich in zwei Subklassen einteilen. Zum einen wurden N-terminal typische CPP-Motivs angehängt, da diese *per se* für eine bessere Aufnahme in die Zellen in Form eines Carriersystems sorgen können. Zum anderen wurden bereits bekannte PrAMPs auf deren Sequenzhomologien am N-Terminus hin untersucht.

Tabelle 50: Positive Derivate mit N-terminaler Modifizierung von HP01

No	Bezeichnung	Sequenz	Molekulargewicht (Da)	pI theor.	Hydrophobizität / Amphipathie	Nettoladung
BT 90	[RRIR]HP01	RRIRPGPPPPGKPQ	1553,04	12,31	(- 0.46) / 0.88	+ 3
BT 92	[RWRW]HP01	RWRWPGPPPPGKPQ	1655,93	12,01	(- 0.33) / 0.70	+ 3
BT 94	[MIIFR]HP01	MIIFRPGPPPPGKPQ	1632,24	11,01	(- 0.09) / 0.49	+ 2
BT 81	[VDKPPYLPR][R ⁸]HP01	VDKPPYLPRPGPPPP GRPQ	2065,67	10	(- 0.28) / 0.52	+ 2

Die Auswahl der CPP-Motive erfolgte unter der Berücksichtigung Eingangs erwähnter Designregeln mit zwei Prämissen. Zum einen sollte die Gesamtnettoladung des Moleküls +5 nicht überschritten werden, um einen lytischen Effekt der Peptide vorzubeugen und das Motiv sollte ≤ fünf Aminosäuren sein. So fiel die Wahl mit Hilfe einer Datenbank auf die Motive RRIR, RWRW und MIIFR, deren Ergebnisse nun dargestellt und diskutiert werden.

- BT 90 [RRIR]HP01

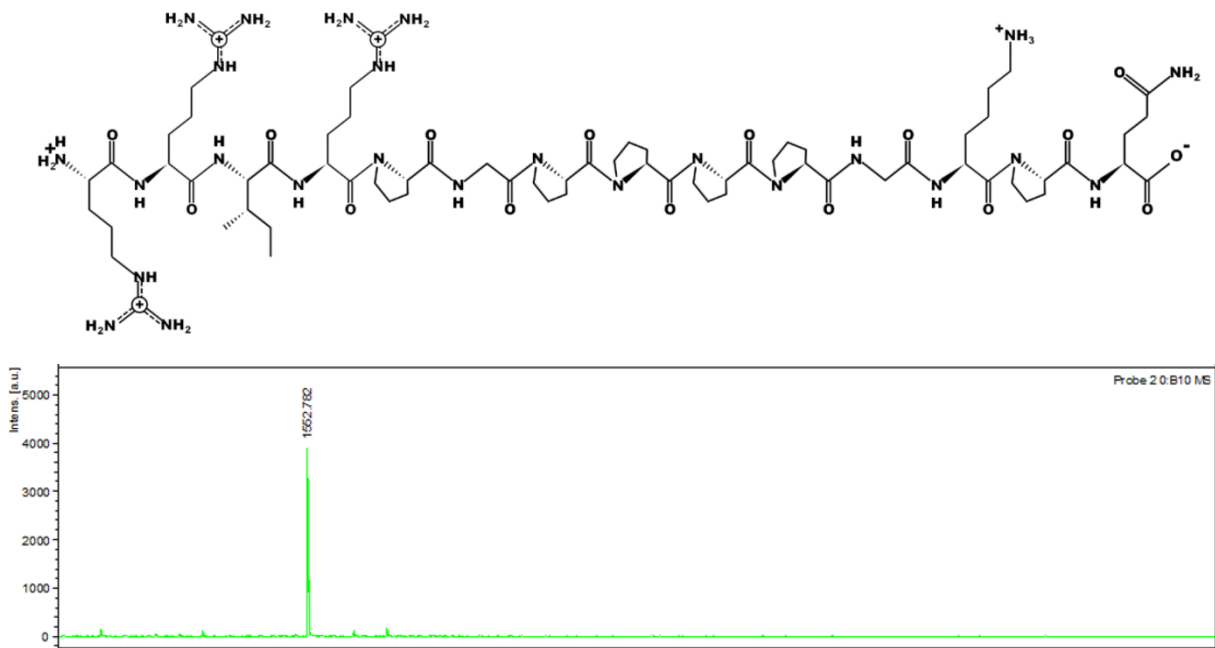


Abbildung 68: Oben: Chemische Struktur von [RRIR]HP01; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 1552 Da.

Nach erfolgreicher Synthese von [RRIR]HP01 an einem *preloaded* Wang-Harz mit einer Ausbeute von >90 % konnte im Mikrodilutionsassay eine sehr gute Dosisabhängigkeit und ein IC_{50} -Wert von <1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wie in Abbildung 69 ersichtlich verifiziert werden.

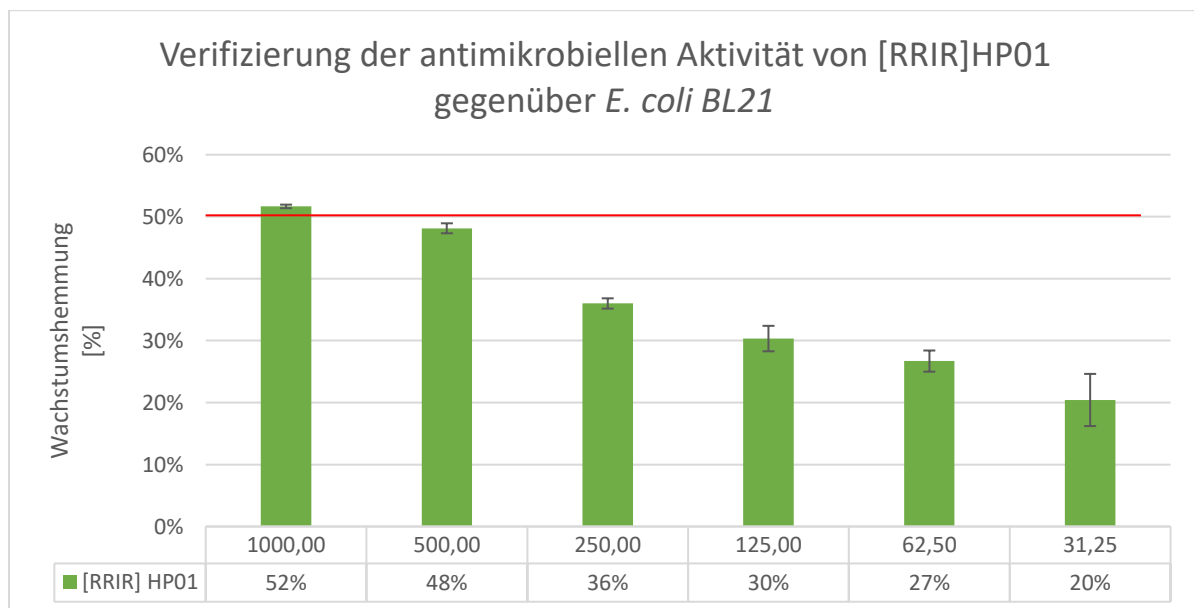


Abbildung 69: Dosisabhängige antibakterielle Aktivität von [RRIR]HP01 gegenüber gramnegativen *E. coli* BL 21

Die physikochemischen Parameter verbesserten sich trotz des ausgeglichenen Verhältnisses von polaren zu unpolaren Aminosäuren. Die für eine Membranlokalisierung wichtigen Parameter Hydrophobizität und hydrophobisches Moment änderten sich nach Anfügen der CPP-Sequenz zum Teil enorm. Durch den hohen Anteil der hydrophilen Arginine nahm die Hydrophobizität um nahezu 60 % ab, das hydrophobe Moment allerdings stieg auf mehr als das Doppelte verglichen mit HP01 an.

- BT 92 [RWRW]HP01

Ein weiteres häufig eingesetztes CPP-Motiv ist $(RW)_n$, welches hier als RWRW-Dimer verwendet wurde. Dieser kumulierte Wechsel von polaren und hydrophoben Resten wirkt sich positiv auf die Amphiphilie des PrAMPs und damit auf die Membrangängigkeit aus. Nach erfolgreicher Synthese des Derivates an einem Wang-Harz mit einer Ausbeute >98 % erfolgte wiederum die Testung auf antibakterielle Aktivität wie im Methodenteil beschrieben im MBD-Assay. Hier konnte das erste Mal eine deutliche Verbesserung des IC_{50} -Wertes ebenso wie eine gute Dosisabhängigkeit verifiziert werden. Der IC_{50} -Wert von [RWRW]HP01 lag bei 375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und konnte somit ein um 2,5 Verdünnungsstufen reduzierte Konzentration erreicht werden. Die Hydrophobizität stieg durch die Anwesenheit der beiden Tryptophanreste lediglich um 20 % gegenüber HP01 an, das hydrophobe Moment, das Maß für die Amphiphilie der Struktur, zeigte durch das Anfügen des RWRW-Motivs ebenfalls nur leichte Veränderungen.

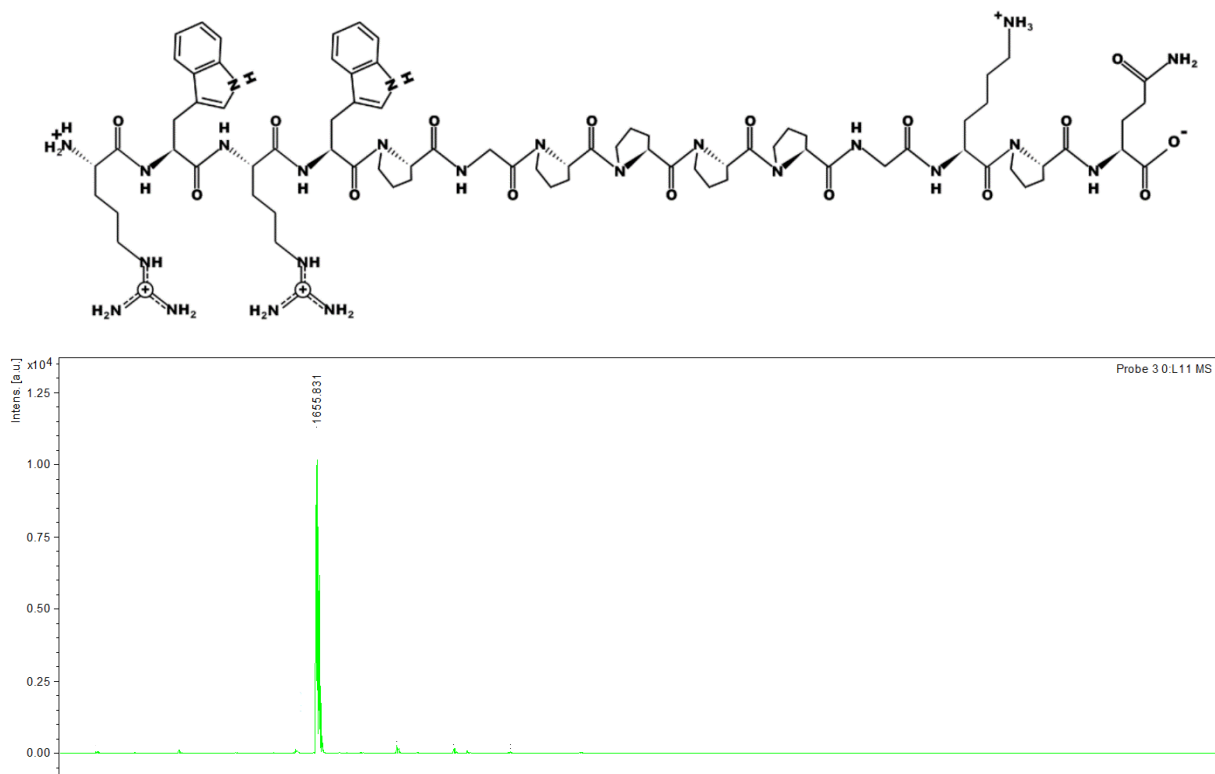


Abbildung 70: Oben: Chemische Struktur von [RWRW]HP01; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 1655 Da.

Nach erfolgreicher Synthese des Derivates an einem Wang-Harz mit einer Ausbeute >98% erfolgte wiederum die Testung auf antibakterielle Aktivität im wie im Methodenteil beschrieben im MBD-Assay.

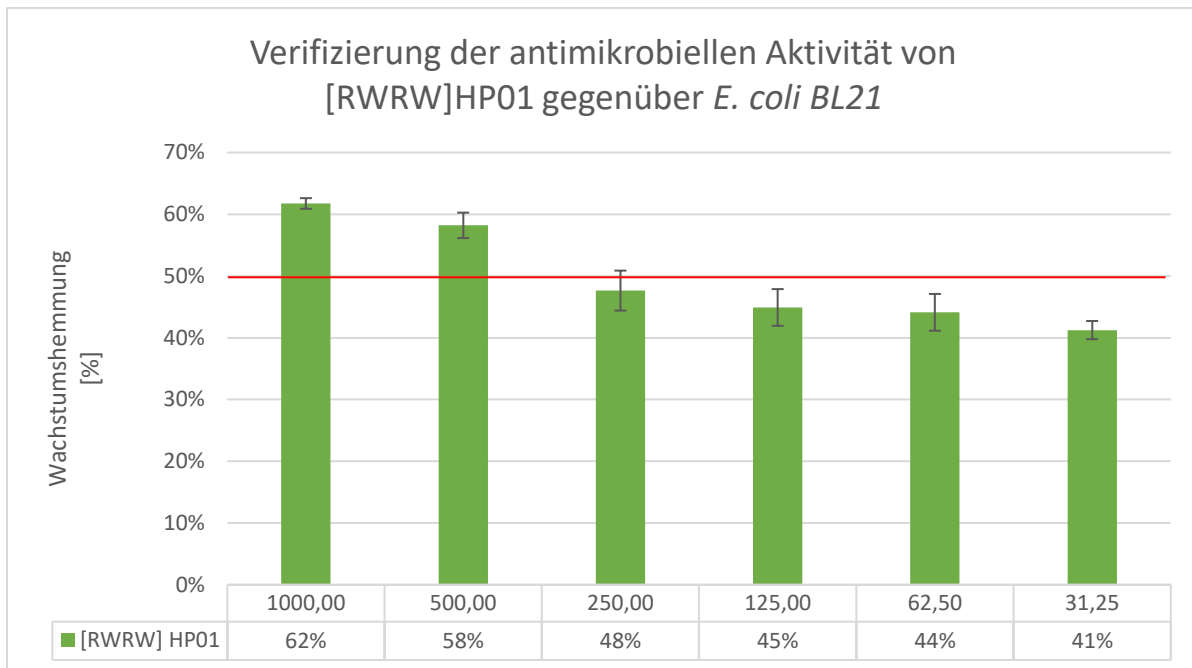


Abbildung 71: Dosisabhängige antibakterielle Wirkung von [RWRW]HP01 auf das Wachstum von *E. coli* BL 21 mit einer IC_{50} von 375 mg/mL

Hier konnte das erste Mal eine deutliche Verbesserung des IC_{50} -Wertes ebenso wie ein gute Dosisabhängigkeit verifiziert werden. Der IC_{50} -Wert von [RWRW]HP01 lag bei 375 μ g/mL und konnte somit ein um 2,5 Verdünnungsstufen reduzierte Konzentration erreicht werden. Die Hydrophobizität stieg durch die Anwesenheit der beiden Tryptophanreste lediglich um 20 % gegenüber HP01 an, das hydrophobe Moment, das Maß für die Amphiphilie der Struktur, zeigte durch das Anfügen des RWRW-Motivs ebenfalls nur leichte Veränderungen.

- BT 94 [MIIFR]HP01

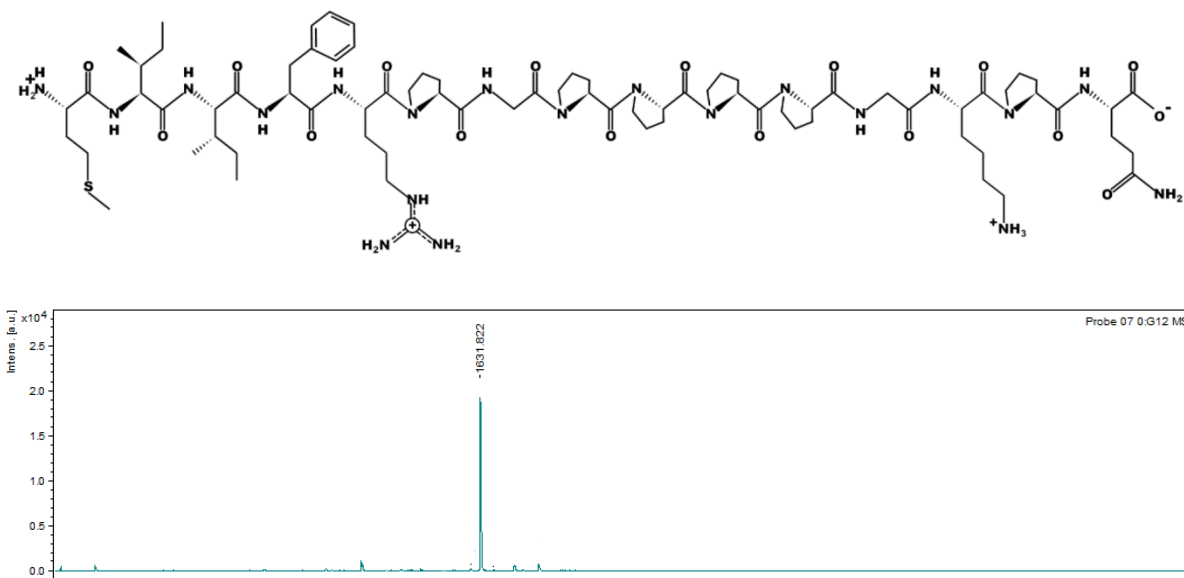


Abbildung 72: Oben: Chemische Struktur von [MIIFR]HP01; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 1631 Da.

Als letztes CPP-Motiv wurde MIIRF eingesetzt. Verglichen mit den anderen beiden Sequenzen ist hier lediglich eine zusätzliche Ladung durch das Arginin vorhanden, was gerade für weitere Modifikationen von Vorteil sein dürfte, angesichts des steigenden zytotoxikologischen Potentials bei zunehmender positiver Nettoladung. Die Synthese dieses Derivates verlief ebenso erfolgreich, wie die vorangegangenen mit einer Ausbeute >90 %. Im antimikrobiellen Test zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung mit einem IC₅₀-Wert von 750 µg/mL.

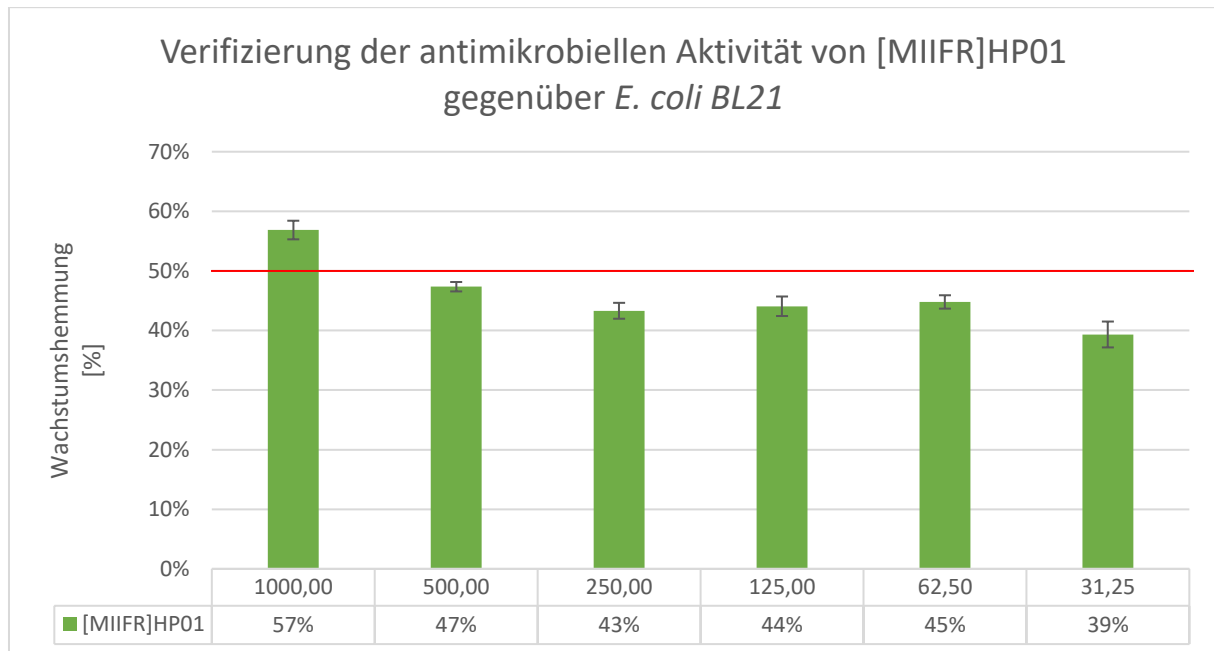


Abbildung 73: Antimikrobielle Wirkung von [MIIFR]HP01 gegenüber des gramnegativen Referenzstammes *E. coli* BL21

Durch das Einfügen der unpolaren Aminosäuren Methionin, Isoleucin und Phenylalanin stieg die Hydrophobizität des Moleküls auf 0,581, was eine Zunahme von fast 90 % bedeutet, folglich stieg das hydrophobe Moment ebenfalls um ca. 40 % auf einen Wert für μ H von 0,157. Das Verhältnis zwischen polaren und unpolaren Anteilen hat sich durch Einfügen dieser Sequenz deutlich zugunsten der unpolaren Teile verschoben. Verglichen mit [RWRW] ist auffällig, dass sich beide wichtigen Parameter für die Membrantranslokation erhöht haben. Hieraus lässt sich für weitere strukturbasierte Designansätze schließen, dass sich eine Erhöhung beider Parameter leider negativ auf die Entwicklung des IC₅₀-Wertes auswirkt.

Zellpenetrierende Peptide können mit oder ohne Ladung aktiv, das heißt ATP-abhängig, oder auch passiv, also ATP-unabhängig, in Zellen eindringen. Die physiko-chemischen Grundlagen von Peptid-Membran-Interaktionen sind entscheidend für eine effiziente Zellpenetration. Viele Faktoren, darunter ein positiver Ladungsanteil, Zellmembranzusammensetzung, endosomale Freisetzung, Amphipathie und Faltungseigenschaften nehmen Einfluss auf den Mechanismus und die Effizienz der Zellpenetration, wodurch die Internalisierung zu einem hochkomplexen Prozess wird (Kauffman et al. 2015).

Prolinreiche CPPs, gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Pyrrolidinringen, penetrieren häufig über Caveola- oder Lipidtransplantation vermittelte Endozytose in das Zellinnere (Pujals und Giralt 2008) oder nutzen Transporter wie bspw. SmbA oder Membranproteine wie YaiW in *E. coli*, um in die Zelle zu gelangen (Guida et al. 2015).

Für die zweite Subklasse der N-terminale Modifizierungen wurde eine Homologiesuche für den N-Terminus der bereits bekannten prolinreichen Peptide verwendet. Hier stachen insbesondere die hohen Homologien der N-Termini von Oncocin, Pyrrhocoricin und Metalnikowin hervor. Hieraus wurde die Sequenz VDKPPYLPR zusammenfassend abgeleitet und N-terminal an zwei Peptidderivate angefügt.

- **BT 81 [VDKPPYLPR][R⁸]HP01**

Die aus der Homologiesuche abgeleitete Sequenz wurde N-terminal an das Kern-Peptid HP01 angefügt. Die Synthese wurde über ein *preloaded-Gln(Trt)-Wang*-Harz realisiert.

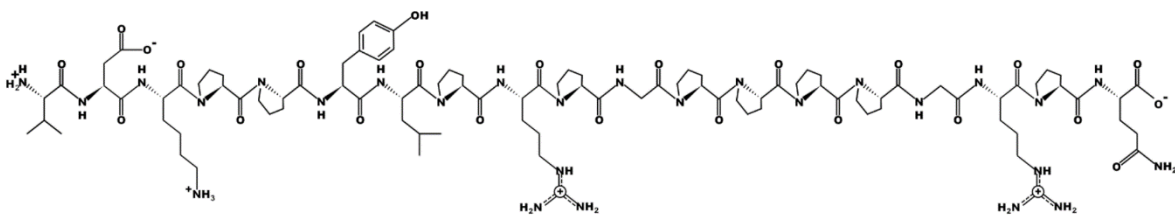


Abbildung 74: Chemische Struktur von [VDKPPYLPR][R⁸]HP01

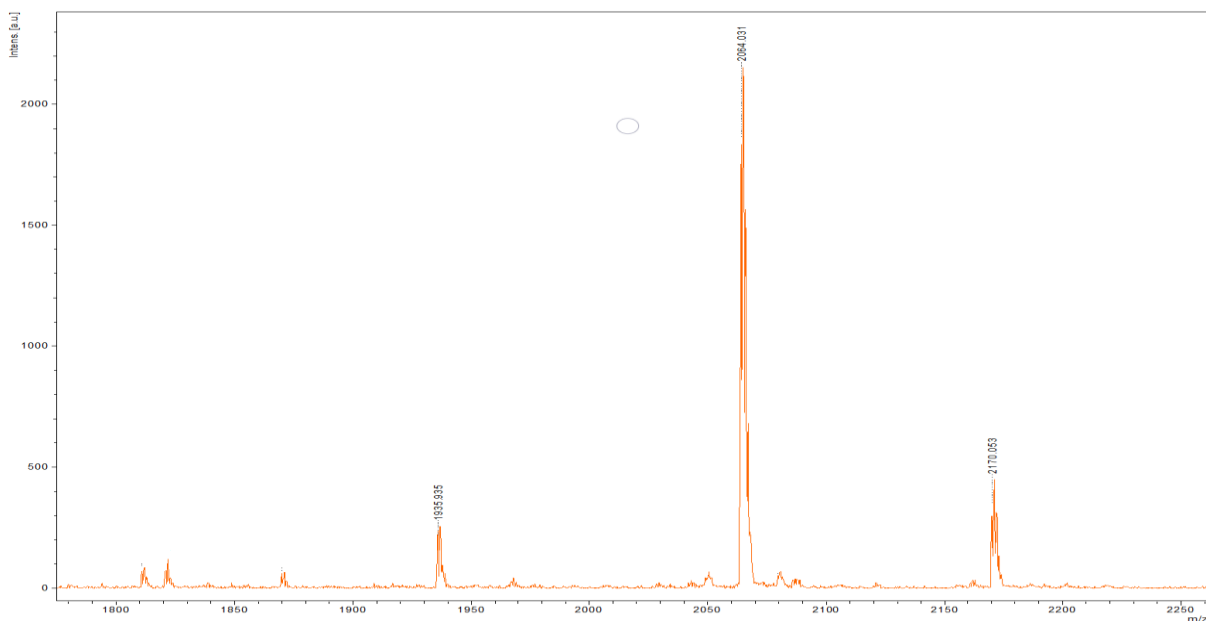


Abbildung 75: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 2064 Da und den beiden Nebenprodukten bei 1935 Da ($\Delta M = -130$ Da, fehlendes Lysin; ca. 300 a.u.) und bei 2170 Da ($\Delta M = +115$ Da, zusätzliches Aspartyl; ca. 500 a.u.)

Wie im Massenspektrum in Abbildung 75 ersichtlich verlief die Synthese mit einer Ausbeute von 73% nicht ganz optimal. Im Massenspektrum sind neben dem Molpeak mit der gesuchten Masse von 2064 Da zwei weitere Massen bei 1935 Da und bei 2170 Da zu sehen. Die Massendifferenz von 1935 Da zum Molpeak beträgt -130 Da, was auf das Fehlen der Aminosäure Lys an Position 3 zurückzuführen ist. Die Intensität beträgt etwa 15 % des Molpeaks bei 2064 Da. Das zweite Nebenprodukt in der Synthese mit einer Massendifferenz von $+115$ lässt sich auf das Einfügen eines zusätzlichen Aspartyls durch

Doppelkopplung der Aminosäure Asparaginsäure zurückführen, welches innerhalb der N-terminal angefügten konservierten Sequenz addiert wurde.

Die Testung des Derivates lieferte im antibakteriellen Test wie in Abbildung 76 ersichtlich eine deutliche Dosisabhängigkeit und einen IC₅₀-Wert von 375 µg/mL.

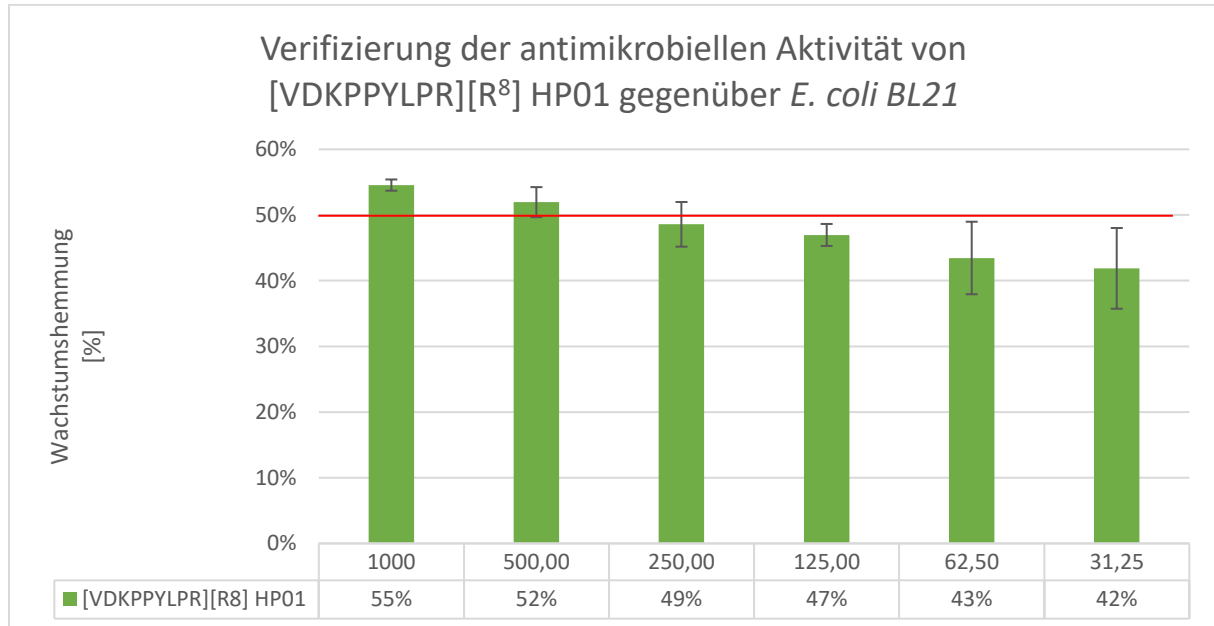


Abbildung 76: Antimikrobielle Wirkung von [VDKPPYLPR][R⁸]HP01 gegenüber *E. coli* BL21

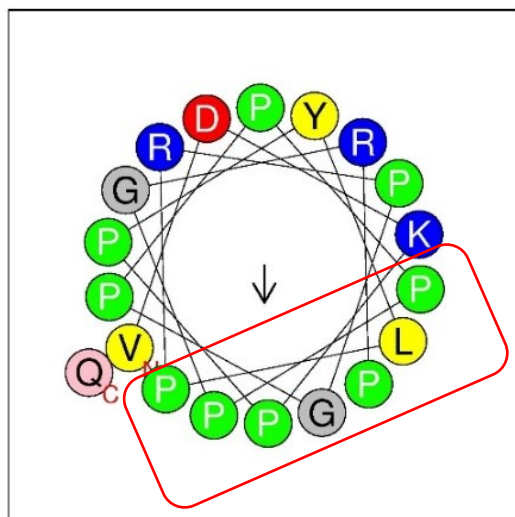


Abbildung 77: Helikale Struktur von [VDKPPYLPR][R⁸]HP01 (erstellt mit HeliQuest), rot markiert die stark hydrophobe Oberflächenregion

Durch Anfügen der überwiegend unpolaren Sequenz ändert sich die Gesamthydrophobizität des Peptides nur geringfügig, das hydrophobe Moment hingegen steigt um mehr als das Doppelte an auf 0,234. Geht man unter diesen Bedingungen durch den hohen Prolinanteil von der Ausbildung einer Sekundärstruktur in Form einer PPII-Helix aus, so entsteht hier erstmals eine hydrophobe Seite mit einer Oberflächensequenz von PLPGPPP. Durch diese stark hydrophobe Region entsteht eine deutlich besser verteilte Amphiphilie und die Membrangängigkeit könnte somit positiv beeinflusst werde.

Die N-terminalen QSAR-Studien resultierten in beiden Fällen in einer Herabsetzung des IC₅₀-Wertes. Im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes wurde das Anhängen der wesentlich längeren konservierten Homologiesequenz im weiteren Verlauf der Arbeit verzichtet. Auch die nicht optimale Synthese trug zur Entscheidung für die wesentlich kürzeren CPP-Sequenzen bei.

4.3.2.3 Derivate mit C-terminalen Modifikationen

Konservierte Bereiche spielen nicht nur am N-terminalen Ende des PrAMPs eine entscheidende Rolle um unter anderem das antibakterielle Spektrum zu steuern, auch konservierte Bereiche am C-Terminus sind für die Wirkung eines AMPs verantwortlich. Untersuchungen an den bereits charakterisierten PrAMPs Oncocin und Bac7 zeigten, dass Modifikationen am C-Terminus oder eine Sequenzlänge <16 Aminosäuren in einem vollständigen Verlust der antimikrobiellen Aktivität führen können (Guida et al. 2015). So scheint für die aktive, transportervermittelte Aufnahme in die Zelle gramnegativer Bakterien über SmbA oder YaiW eine minimale Länge erforderlich zu sein. Zum Erreichen der minimalen Länge von 16 Aminosäuren wurden wiederum eine nach Homologien und konservierte Bereiche der bekannten PrAMPs durchgeführt. Hieraus ergaben sich zwei Sequenzen. Die Sequenz YLPRPRPX stammt aus den Sequenzhomologien der prolinreichen Insektenpeptiden Oncocin, Pyrrhocoricin und Metalnikowin. PRPPHPRL, die zweite Sequenz, welche C-terminal angefügt wurde, leitet sich aus Sequenzen ab, welche sowohl in Insekten-AMPs wie Apidaecin als auch in Vertebraten-AMPs wie Bac7 aus dem Büffel wiederfinden lässt. Insgesamt wurden so 13 Derivate synthetisiert, von denen vier im Folgenden näher betrachtet und diskutiert werden (Übersicht im Anhang Tabelle 69).

Tabelle 51: Übersicht Derivate mit Modifikation am C-Terminus

No	Bezeichnung	Sequenz	Molekulargewicht (Da)	pI theor.	Hydrophobizität / Amphipathie	Nettoladung
BT 39	HP01[YLPRPRPQ]	PGPPPPGKPQYLPRPRPQ	1979,57	11,1	(- 0.32) / 0.61	+ 3
BT 107	HP01[YLPRPRPK]	PGPPPPGKPQYLPRPRPK	1979,61	11,1	(- 0.34) / 0.75	+ 4
BT 110	HP01[YLPRPR]	PGPPPPGKPQYLPRPR	1754,29	11,01	(- 0.31) / 0.61	+ 3
BT 89	HP01[PRPPHPRL]	PGPPPPGKPQPRPPHPRL	1922,52	12,01	(- 0.31) / 0.63	+ 3

- BT 39 HP01[YLPRPRPQ]

In den konservierten Domänen prolinreicher Peptide finden sich häufig PRPRX oder PPRPX-Motive wieder. Der hier angefügte konservierte Sequenzabschnitt stammt aus Insekten-PrAMPs wie Oncocin (Gagnon et al. 2016).

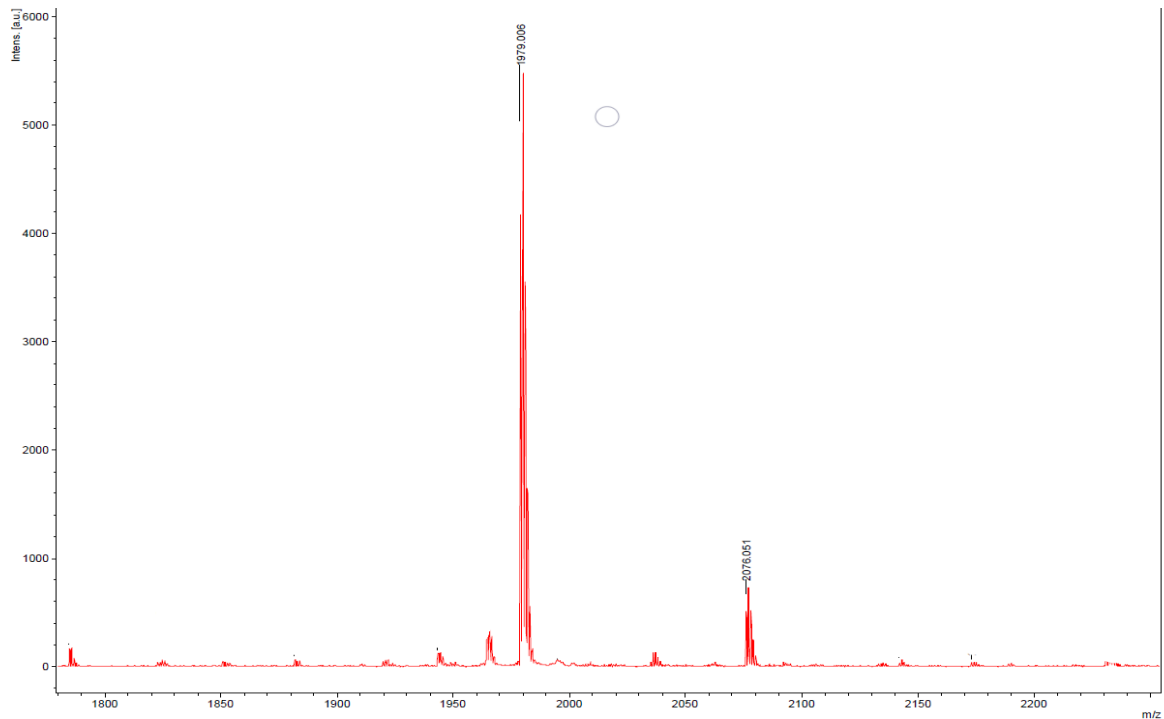
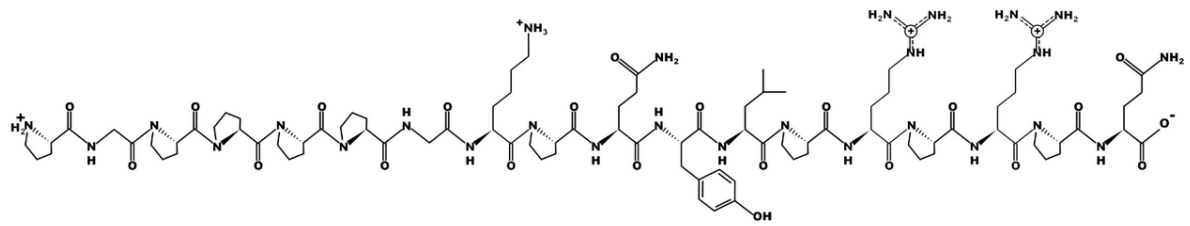


Abbildung 78: Oben: Chemische Struktur von HP01[YLPRRPQ]; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 1979 Da und dem Nebenprodukt bei 2076 Da ($\Delta M = +97$ Da, zusätzliches Prolyl-; ca. 800 a.u.)

Die Synthese des Derivates erfolgte mit Hilfe eines *preloaded* Wang-Harzes, an welches die C-terminale Aminosäure Glutamin bereits gekuppelt war, wodurch eine Ausbeute von 80 % erreicht werden konnte. Wie im Massenspektrum in Abbildung 78 zu sehen ist, entsteht durch Doppelkopplungsschritte innerhalb der Synthese für die Aminosäure Prolin ein Nebenprodukt mit einer relativen Intensität von ca. 800 a.u. und einem Massenzuwachs von +97 Da verglichen mit dem Molpeak des Derivates, welcher bei 1979 Da auftritt. Dieser könnten durch Doppelkopplung eines Prolinrestes entstanden sein. Eine Testung dieses Derivates zeigte eine, verglichen mit den vorherigen Derivaten, deutlich verbesserte Dosisabhängigkeit und einen IC_{50} -Wert von 375 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

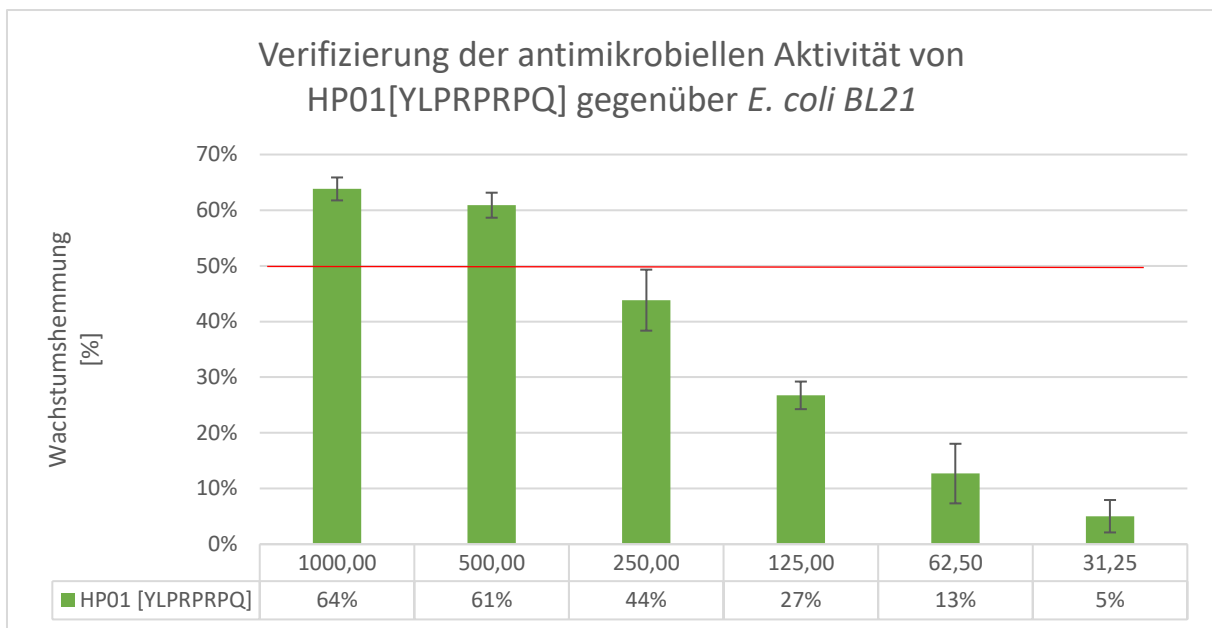


Abbildung 79: Antimikrobielle Wirkung des Derivates HP01[YLPRRPQ] auf das Wachstum von *E. coli* BL21

Durch Anfügen dieser konservierten Domäne ergaben sich lediglich leichte Änderung bezüglich Hydrophobizität und hydrophoben Moments, welche mit einem Wert für $\langle H \rangle$ von 0,316 und für $\langle \mu H \rangle$ von 0,100 keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Werten von HP01 aufweisen. Dies lässt sich auf das Verhältnis von polaren zu unpolaren Aminosäuren innerhalb der konservierten Domäne erklären. Die Sequenzabfolge YLPRRPQ setzt sich aus Aminosäuren alternierenden polaren Charakters zusammen, so sind Tyrosin (Y), Arginin (R) und Glutamin(Q) den polaren Aminosäuren zuzuordnen, Leucin (L) und Prolin (P) den unpolaren. Nimmt man durch den hohen Prolinanteil der Sequenz von 50 % die Fähigkeit zur Bildung einer PPII-Helix an, so zeigt sich, wie in Abbildung 80 zu sehen, auch für dieses Derivat eine rein hydrophobe Oberflächenregion.

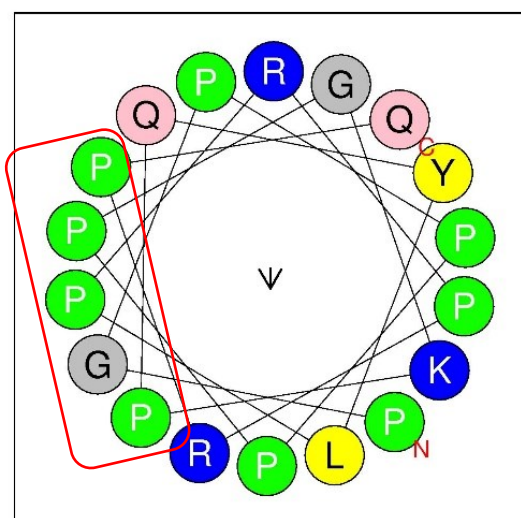


Abbildung 80: Vorhergesagte helikale Struktur von HP01[YLPRRPQ] (erstellt mit HeliQuest), rot markiert die stark hydrophobe Oberflächenregion PGPPP

- BT 107 HP01[YLPRPRPK]

Ein zweites Derivat zeigt die Effekte der C-terminalen variablen Aminosäure (X). Hier wurde anstelle der Aminosäure Glutamin das basische Lysin eingesetzt, was zu einer Erhöhung der Nettoladung auf +4 führte. Durch das Einfügen der zusätzlichen Ladung an der C-terminalen Seitenkette sollte der Einfluss der damit verbundenen Erhöhung der Amphiphilie des Moleküls und damit eine Erhöhung des hydrophoben Moments einer helikalen Struktur getestet werden. Vorhersagewerkzeuge wie CellPPD beschreiben für das Anfügen der Aminosäure Lysin eine Steigerung der Membrangängigkeit.

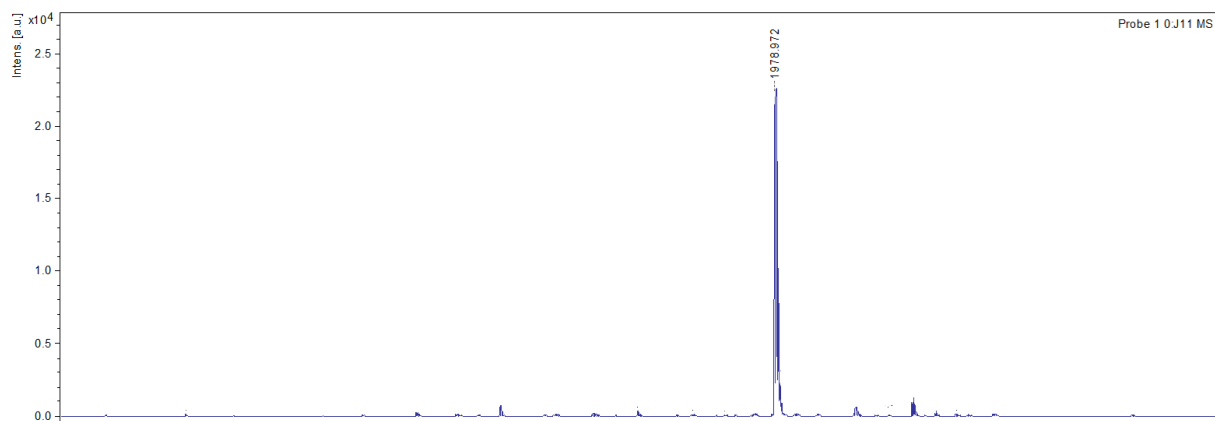
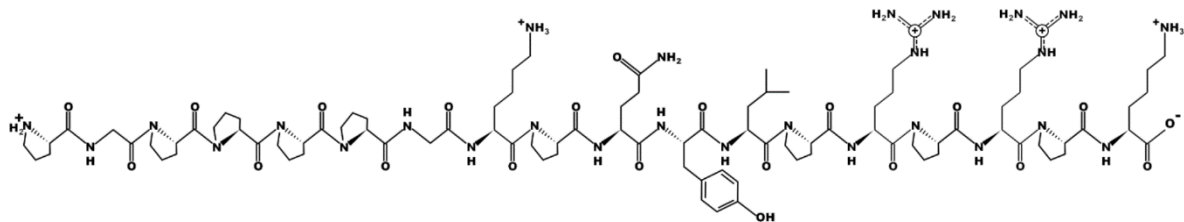


Abbildung 81: Oben: Chemische Struktur von HP01[YLPRPRPK]; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 1978 Da

Die Synthese von HP01[YLPRPRPK] erfolgte an einem preloaded Lys-Wang-Harz und stellte sich als in der Synthese unproblematische Sequenz dar. Eine Ausbeute von >90 % verweist hier für ein 18mer Peptid auf ein optimales Ergebnis. Bereits im ungereinigten Präzipitat direkt nach der Spaltung zeigten sich, wie in Abbildung 81 ersichtlich, keine nennenswerten Nebenprodukte. Die antibakterielle Testung im Mikrodilution-Assay zeigte allerdings eine weniger optimale Dosisabhängigkeit wie die des Derivates HP01[YLPRPRQ], so dass das Anfügen des Lysins und damit die Erhöhung der Ladung auf +4 eher auf einen Anstieg unspezifischer elektrostatischer Wechselwirkungen an der Membran zurückzuführen ist, was auch anhand des steigenden IC_{50} -Wertes erklärbar ist.

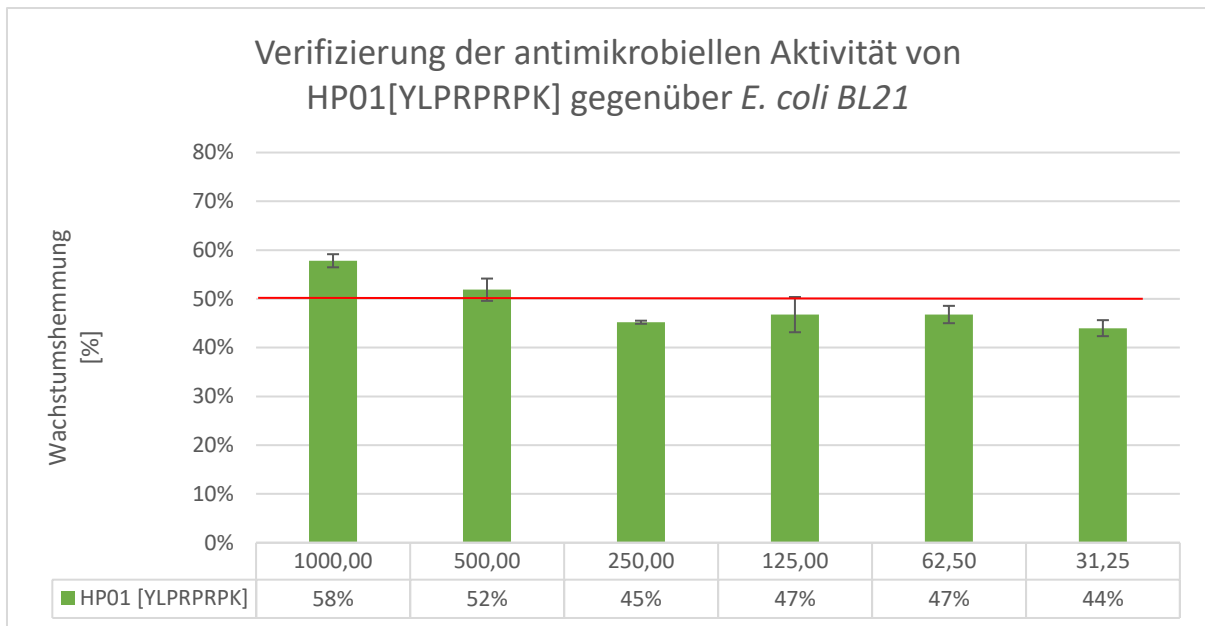


Abbildung 82: Ergebnis der antibakteriellen Testung von HP01[YLPRPRPK] im MDB-Assay gegen *E. coli* BL21

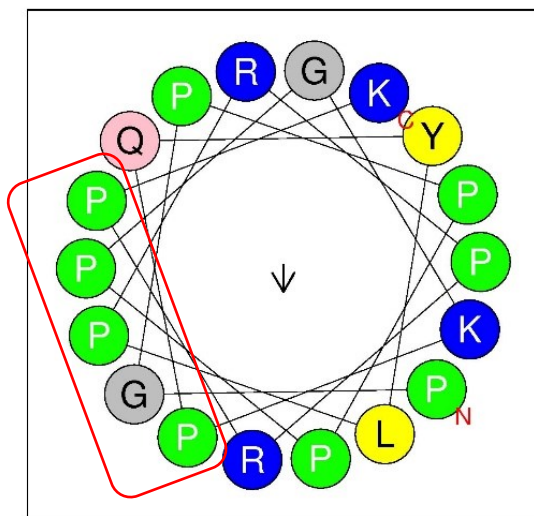


Abbildung 83: Mittels HeliQuest vorhergesagte helikale Struktur von HP01[YLPRPRPK], rot markiert die stark hydrophobe Oberflächenregion PGPPP

Durch Substitution des Glutamins am C-Terminus des 18mer Peptides durch die basische Aminosäure Lysin änderten sich wie erwartet die physikochemischen Parameter. So wurde die Hydrophobizität um ca. 10 % herabgesetzt und das hydrophobe Moment aufgrund der Erhöhung der Amphiphilie bei neutralem pH um 20 % gesteigert. Unter Annahme der Ausbildung einer helikalen Struktur zeigt sich auch für dieses Derivat eine hydrophobe Oberflächendomäne mit einem PGPPP-Motiv auf der linken Helixseite.

- BT 110 HP01[YLPRPR]

In einem weiteren Designschritt sollte anhand eines dritten Derivats mit C-terminaler Modifikation der Einfluss der Sequenzlänge in einer QSAR-Studie getestet werden. Hierzu wurde lediglich die häufig repetitive Sequenz PRPR angefügt und somit durch den Wegfall zweier Aminosäuren PX eine postulierte minimale Länge von 16 Aminosäuren genutzt.

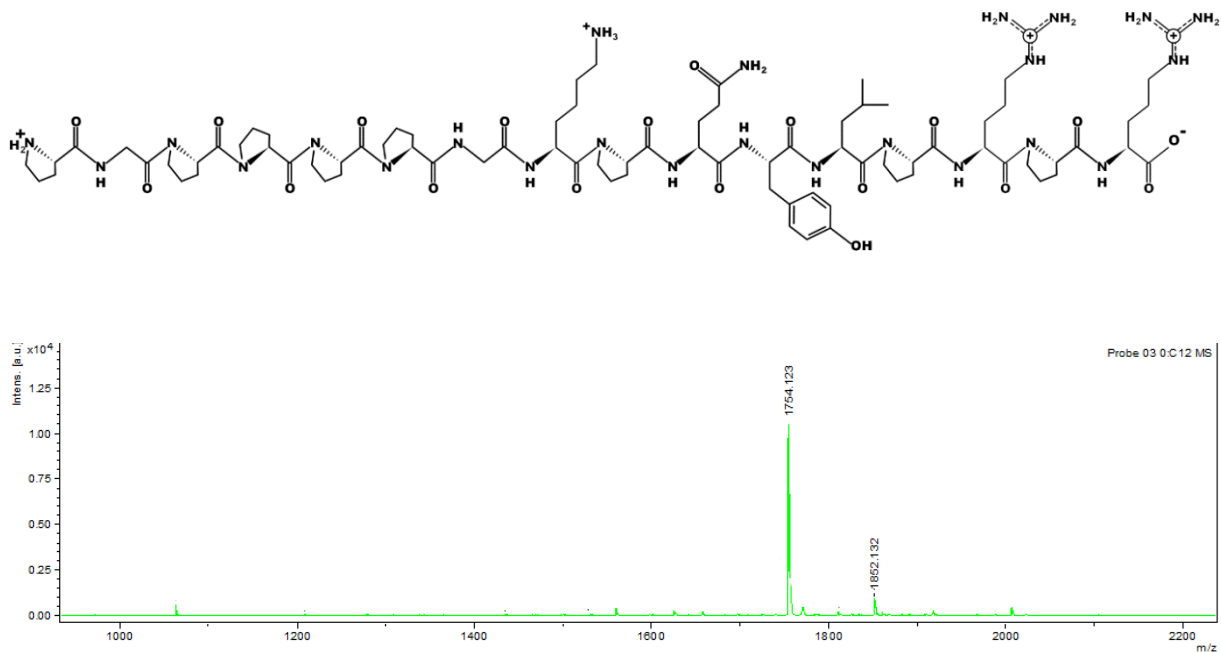


Abbildung 84: Oben: Chemische Struktur von HP01[YLPRPR]; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 1754 Da und den beiden Nebenprodukten bei 1852 Da ($\Delta M = +97$ Da, zusätzliches Prolyl-)

Die Festphasensynthese von HP01[YLPRPR] erwies sich ebenfalls als unproblematisch. Wie im Massenspektrum in Abbildung 84 zu sehen, liegt der Molpeak des gewünschten Produktes mit einer Intensität von $1,1 \times 10^4$ deutlich über dem eines detektierbaren Nebenproduktes mit einer Masse von 1852 Da. Hier kommt es durch Doppelkopplung der Aminosäure Prolin zu dem bereits erwähnten zusätzlichen Prolyls innerhalb der Sequenz. Mit einer Ausbeute von 90 % ist allerdings diese Sequenz im Hinblick auf die SPPS ebenfalls als unproblematisch einzuordnen.

Die antibakterielle Wirkung des Derivates zeigt sich, wie bereits im Derivat HP01[YLPRPRPK] als suboptimal in ihrer Dosisabhängigkeit. Der IC_{50} -Wert liegt zwar mit $62,5 \mu\text{g/mL}$ deutlich unter dem der zuvor beschriebenen Derivate, aber auch hier lässt sich durch die schlechtere Dosisabhängigkeit und das Vorhandensein eines Arginins an der C-terminalen Seitenkette auf eine unspezifischer Wirkung des Derivats aufgrund erhöhter elektrostatischer Wechselwirkungen und damit verbunden einer Erhöhung des lytischen Membraneffekt schließen.

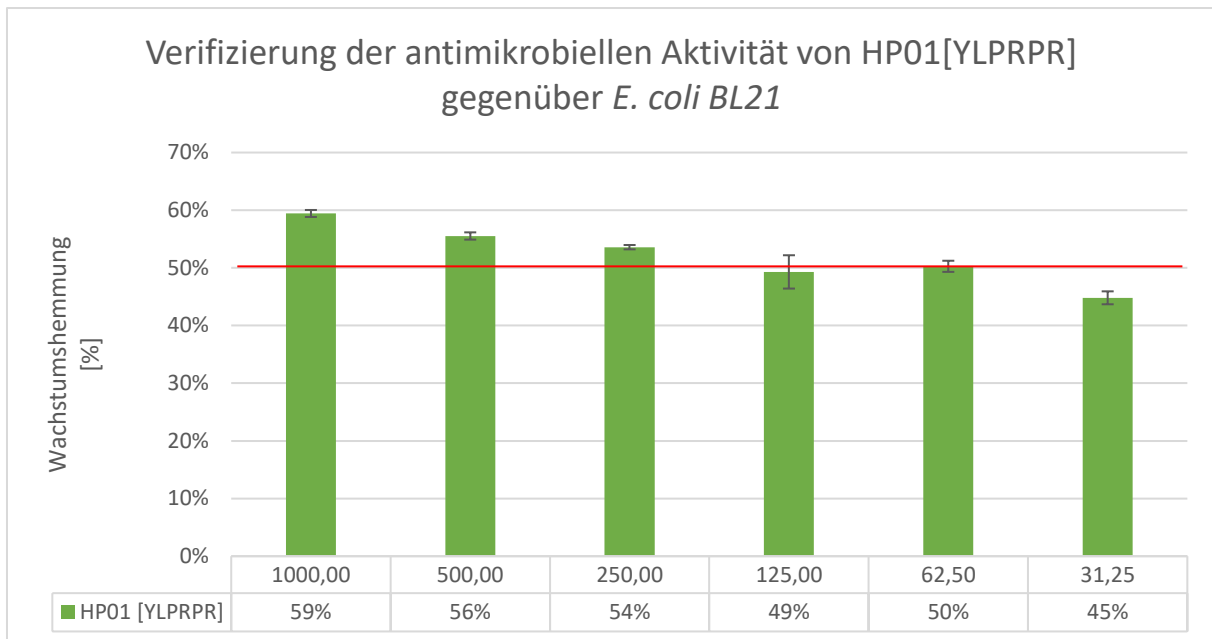


Abbildung 85: Antimikrobielle Aktivität des um zwei Aminosäuren verkürzten 16mer Peptides HP01[YLPRPR]

Die physikochemischen Parameter zeigten im Bereich der Hydrophobizität gegenüber der Leitstruktur HP01 nur sehr geringe Änderung. Diese erscheint durch den Wegfall der unpolaren Aminosäure Prolin und der polaren Aminosäure Glutamin plausibel. Im Bereich der Amphiphilie einer helikalen Struktur zeigt sich auch hier durch die polare basische Aminosäure Arginin, ähnlich wie bei Lysin, eine Erhöhung des hydrophoben Moments um ca. 20 %.

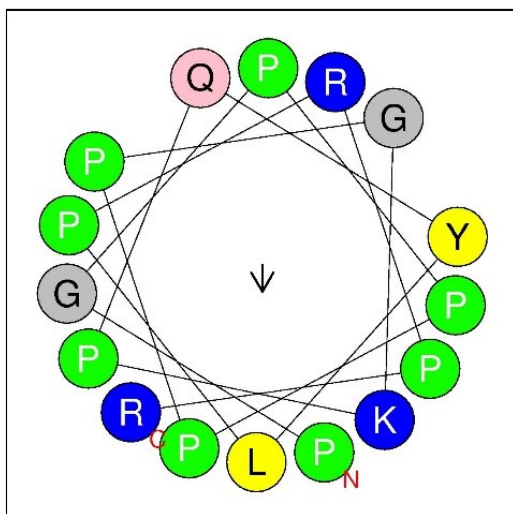


Abbildung 86: Mittels HeliQuest vorhergesagte helikale Struktur von HP01[YLPRPR], deutlich erkennbar die nicht optimale Ausbildung der helikalen Struktur

Betrachtet man nun aber unter Annahme der Ausbildungsfähigkeit einer Sekundärstruktur eine Helix, so wird deutlich, dass die Bildung eines rein hydrophoben Bereichs, wie im Falle der beiden 18mer Peptide ausbleibt, ebenso keine geschlossene Helixform ausbildbar erscheint, so dass sich an der Oberfläche der helikalen Struktur verglichen mit HP01[YLPRPRPQ] und HP01[YLPRPRPK] nicht besetzte Bereiche zeigen. So scheint für die Ausbildung einer optimalen helikalen Struktur und damit verbunden

für die Bildung eines membrangängigen amphiphilen Moleküls eine minimale Länge von 18 Aminosäuren notwendig sein, um die spezifische intrazelluläre Wirkung gewährleisten zu können.

- **BT 89 HP01[PRPPHPRL]**

Eine zweite homologe und konservierte Sequenz, welche sowohl in Insekten-PrAMPs wie Apidaecin als auch in Säuger-PrAMPs lokalisiert ist, wurde ebenfalls C-terminal an die Leitstruktur HP01 angefügt. Diese Sequenz beinhaltet neben dem ebenfalls häufig identifizierten Motiv PRPP eine weitere konservierte Sequenz – HPRL, welche einige PrAMPs direkt C-terminal aufweisen (Scocchi et al. 2016).

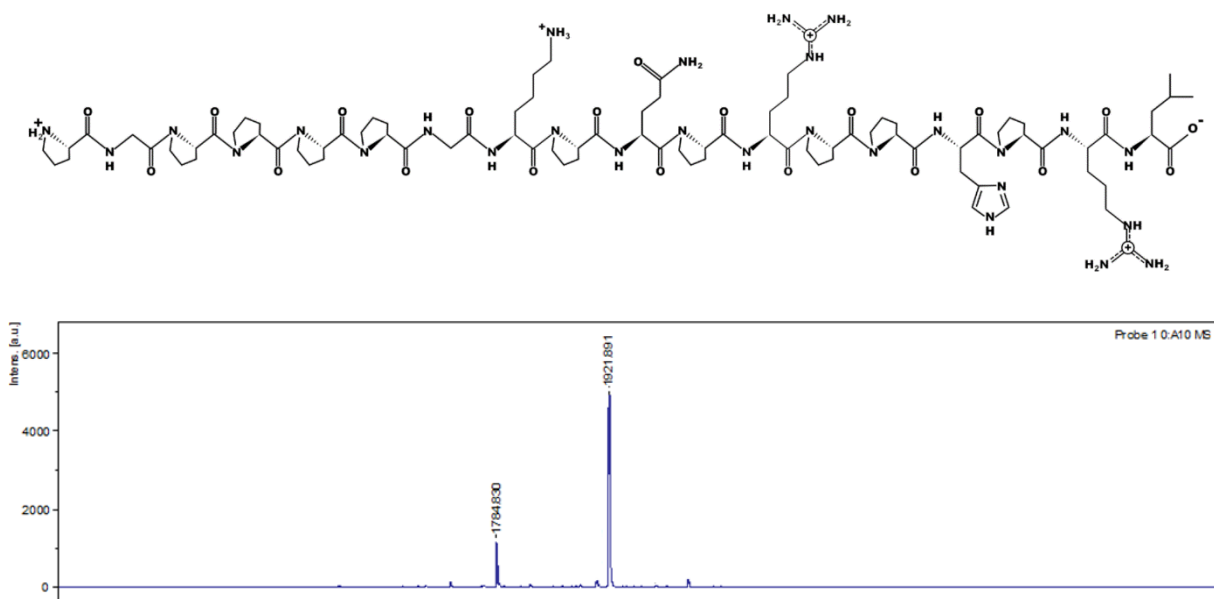


Abbildung 87: Oben: Chemische Struktur von HP01[PRPPHPRL]; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 1921 Da und dem Nebenprodukt bei 1784 Da ($\Delta m = -137$ Da, fehlendes Histidyl; ca. 1000 a.u.)

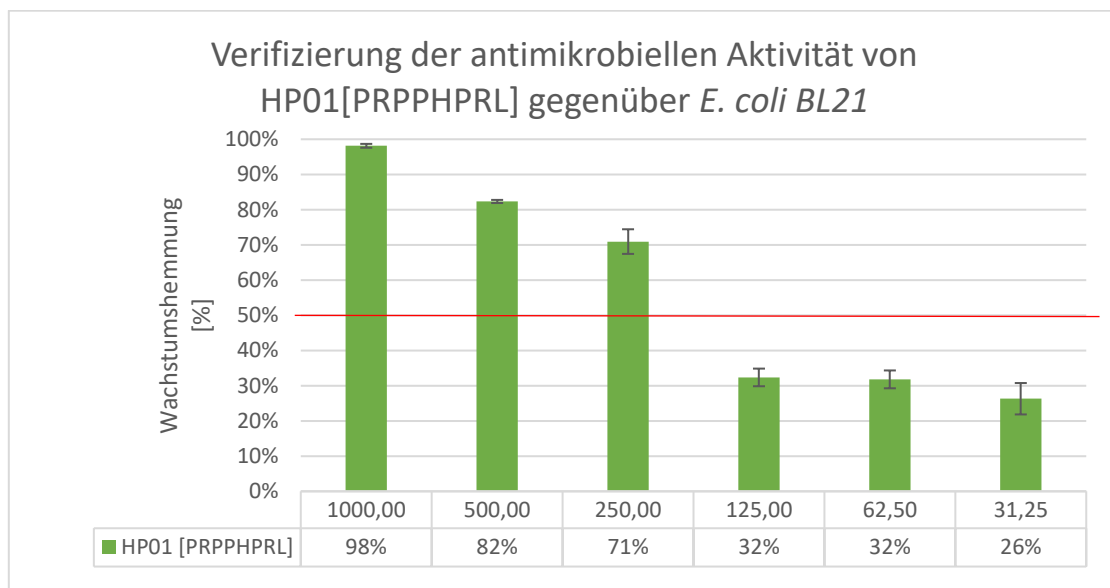


Abbildung 88: Dosisabhängige antibakterielle Wirkung von HP01[PRPPHPRL] gegenüber dem Referenzstamm *E. coli* BL21

Mit einer Ausbeute von 80 % ist diese Sequenz in der Synthese noch als unproblematisch anzusehen. Deutlich in Massenspektren wie in Abbildung 87 ersichtlich ist die Detektion eines Nebenproduktes bei eine m/z Verhältnis von 1784 Da. Die hier auftretende Massendifferenz von – 137 Da lässt sich auf das Fehlen des Histidins in der Abfolge PHP erklären. Dieser Bereich scheint in der Synthese durch die drei aufeinanderfolgenden Ringe sterisch anspruchsvoller zu sein. Die Testung der antibakteriellen Wirkung ergab deutliche Steigerungen gegenüber allen vorangegangenen Derivaten. Es zeigte sich zum einen eine sehr gute Dosisabhängigkeit mit einem IC₅₀-Wert von 187,5 µg/mL und erstmals mit einem MIC₉₀-Wert von 750 µg/mL, welcher im Zuge der bisherigen Modifikationen noch nicht erreicht werden konnte.

Im Bereich der physiochemischen Parameter zeigte sich für die Hydrophobizität mit einem Wert für <H> von 0,322 gegenüber der Hydrophobizität von HP01 keine signifikante Änderung. Auffällig ist allerdings die Änderung des hydrophoben Moments. Hier nimmt der Wert für <µH> um 25 % ab und liegt mit 0,084 nun deutlich unterhalb dessen der Leitsubstanz. Für eine optimale Membrantranslokation ist offensichtlich nicht automatisch eine hohe Hydrophobizität und eine hohe Amphiphile ausschlaggebend. Vielmehr gibt es für jedes Molekül ein optimales Verhältnis beider zueinander. Durch das Anfügen dieser konservierten Sequenz scheint eine verbesserte zelluläre Aufnahme gewährleistet zu sein. In Hinblick auf die gute Dosisabhängigkeit ist verglichen mit den Derivaten HP01[YLPRPRPK] und HP01[YLPRPR] eine unspezifischer Membraneffekt eher unwahrscheinlich. Verglichen mit den positiv geladenen, basischen C-terminalen Seitenketten Lysin und Arginin der eben erwähnten Derivate befindet sich am C-Terminus dieses Derivates das unpolare Leucin mit entsprechend lipophiler Seitenkette.

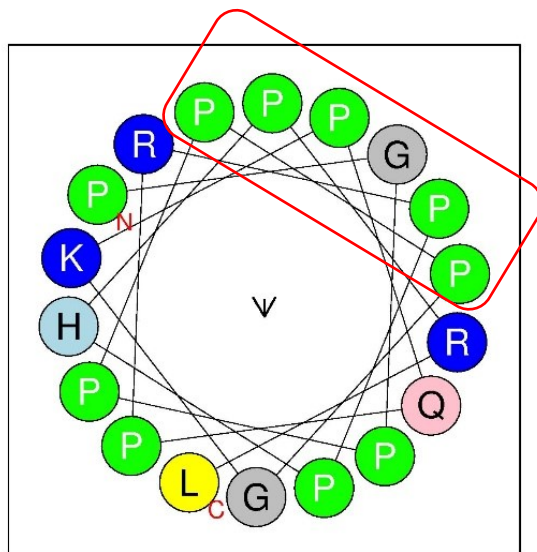


Abbildung 89: Mittels HeliQuest vorhergesagte helikale Struktur von HP01[PRPPHRL], rot markiert die hydrophobe Oberflächendomäne PPPGPP

Auch hier lässt sich unter Annahme der Ausbildung einer helikalen Sekundärstruktur durch die hohe Anzahl an Prolinen eine vollständige und optimale Helix simulieren. Das Auftreten einer rein hydrophoben Oberflächendomäne mit dem Sequenzmotiv PPPGPP wird in Abbildung 89 ersichtlich. Hier befinden sich die Hälfte aller Proline. Die anderen 50 % sind gleichmäßig auf der Helixoberfläche verteilt, so dass eine für die Membrantranslokation günstige Anordnung der unpolaren und polaren entstehen kann.

Die durchgeführten QSAR-Studien der beiden C-terminal eingefügten konservierten Bereiche bzw. repetitiven Sequenzen RRPX und RPPX lieferten weitere Erkenntnisse zum Einfluss des C-Terminus bzw. der Sequenzlänge hinsichtlich der antimikrobiellen Aktivität der Derivate. Zunächst bestätigten sich Untersuchungen von Guida *et al.* 2015, welche die C-terminale Kürzung von Bac7 untersuchten und schließlich postulierten, dass eine minimale Sequenzlänge von 16 Aminosäuren sowohl für eine erfolgreiche Membrantranslokation als auch für die generelle antibakterielle Aktivität benötigt wird. Vergleicht man die Sequenzlänge mit bisherigen Modifikationen von HP01, so konnte durch C-terminales Anfügen der konservierten Sequenzabschnitte die IC₅₀-Werte gesenkt werden und mit Sequenz HP01[PRPPHPRL] auch erstmals die MIC₉₀, also eine 90 %ige Hemmung des bakteriellen Wachstums erzielt werden.

Weitere wichtige Erkenntnisse für nun folgende Strukturüberlegungen erhält man auch durch die physikochemischen Parameter. So sollte insbesondere der Wert des hydrophoben Moments um min. 25 % gesenkt werden, was eine optimale Amphiphilie des Moleküls für die Membranpassage vermuten lässt. Angesichts der aus der C-terminalen QSAR-Studie gewonnenen Daten, wurden nun in einer letzten Auswahl Strukturen mit C- und N-terminalen Modifikationen entworfen und synthetisiert.

4.3.2.4 N-/C-terminal-modifizierte Derivate

Im letzten Schritt des strukturbasierten Wirkstoffdesigns von HP01 münden nun die Ergebnisse der vorangegangenen QSAR-Studien in Derivaten, welche an beiden Termini modifiziert sind. Insgesamt wurden so sechs Derivate synthetisiert und getestet (Übersicht im Anhang Tabelle 71). Die Erkenntnisse aus dieser letzten Studie sollen nun anhand der vier besten Derivate dargestellt und diskutiert werden.

C-terminal wurde die konservierte Sequenz PRPPHPRL angefügt, am N-terminalen Ende wurden schließlich die beiden erfolgreich getesteten CPP-Sequenzen RWRW und MIIFR eingefügt. Zusätzlich wurde noch C-terminale Amidierungen durchgeführt, welche im Allgemeinen durch eine erhöhte antibakterielle Wirkung gegenüber ihre natürlichen Carboxylvariante auffallen.

Tabelle 52: Übersicht der erfolgreich am N- und C- Termini modifizierten Strukturen

No	Bezeichnung	Sequenz	Molekulargewicht (Da)	pI _{theror.}	Hydrophobizität / Amphipathie	Nettoladung
BT 95	[RWRW]HP01 [PRPPHPRL]	RWRWPGPPPPGKP QPRPPHPRL	2607,07	12,5	(- 0.38) / 0.73	+ 5
BT 96	[MIIFR]HP01 [PRPPHPRL]	MIIFRPGPPPPGKP QPRPPHPRL	2583,14	12,3	(- 0.22) / 0.60	+ 4
BT 99	[MIIFR]HP01-NH ₂	MIIFRPGPPPPGKP Q-NH ₂	1629,9	14	(- 0.09) / 0.49	+ 3
BT 112	[MIIFR]HP01 [PRPPHPRL]	MIIFRPGPPPPGKP QPRPPHPRL-NH ₂	2580,45	14	(- 0.22) / 0.60	+ 5

• BT 95 [RWRW]HP01[PRPPHPRL]

Das bekannte CPP-Motiv RWRW zeigte wie bereits erwähnt eine deutliche Verbesserung des IC₅₀-Wertes und eine sehr gute Dosisabhängigkeit, schränkt aber ein weiteres Anfügen basischer Aminosäuren als Träger zweier kationischer Ladungen unter Berücksichtigung der Designregeln ein. Durch Anfügen dieses CPPs an HP01[PRPPHPRL] wird die gesteckte Grenze einer resultierenden Nettoladung von +5 bereits erreicht. Bei zusätzlicher Amidierung des C-Terminus wäre diese somit überschritten und die Wahrscheinlichkeit einer schlechten Zytotoxizität steigt rapide an.

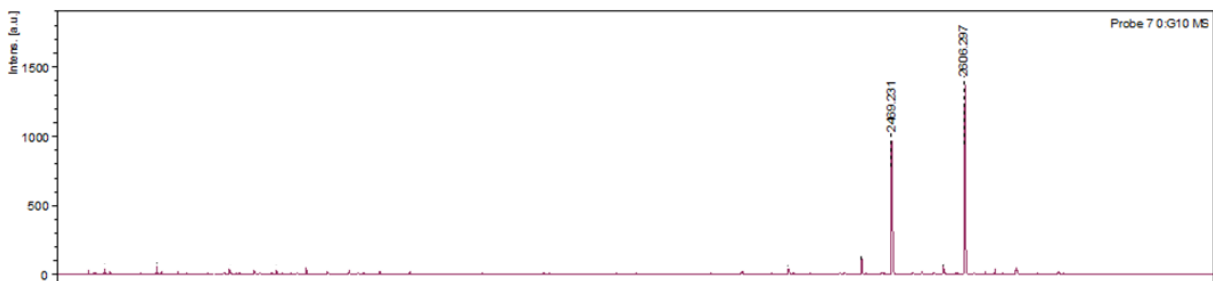
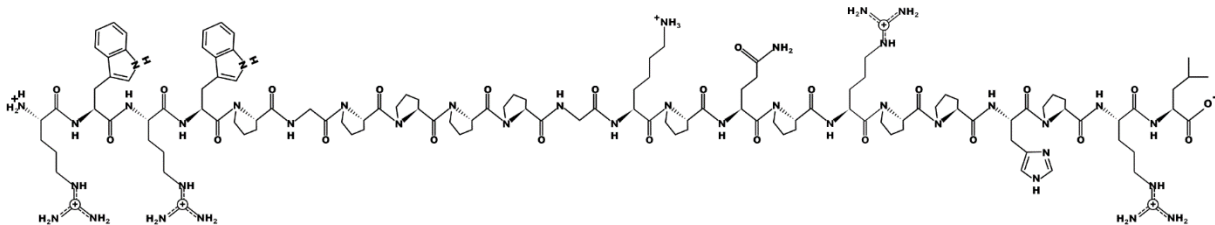


Abbildung 90: Oben: Chemische Struktur von [RWRW]HP01[PRPPHPRL]; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 2606 Da und dem Nebenprodukt bei 2469 Da ($\Delta M = -137$ Da, fehlendes Histidyl-; ca. 1000 a.u)

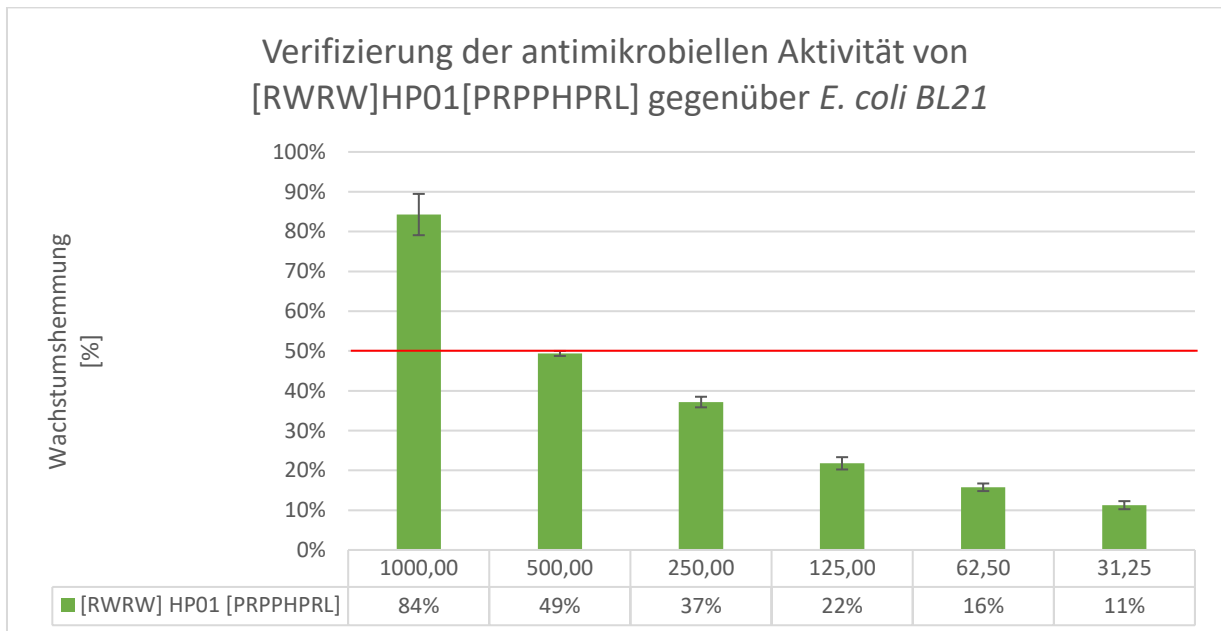


Abbildung 91: Antibakterielles Potential von [RWRW]HP01[PRPPHPRL] gegenüber dem gramnegativen *E. coli* BL21

Die Synthese des Derivates erfolgte an einem *preloaded Leu-Wang*-Harz und lieferte eine Ausbeute von 75 %. Auch in der Analyse dieser Sequenz findet sich neben dem Molpeak des Produkts bei 2606 Da im Massenspektrum ein Nebenprodukt mit der für das Fehlen des Histidins typischen Massendifferenz von – 137 Da. Die Testung der antibakteriellen Wirkung des Derivates zeigte eine sehr gute, jedoch rasch abfallende Dosisabhängigkeit und zeigte bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 1000 µg/mL eine Hemmung von etwas über 80 %. Der rasche Abfall des Dosis-Wirkungsprofil wird auch daran ersichtlich, dass der IC₅₀-Wert bereits bei 500 µg/mL erreicht ist. Somit zeigt sich durch das Anfügen dieses CPP-Motivs eine Verschlechterung der antibakteriellen Eigenschaften gegenüber HP01[PRPPHPRL] mit einer MIC₉₀ von 750 µg/mL und einem IC₅₀-Wert von 187,5 µg/mL.

Eine Erklärung könnte in der Verschlechterung der physikochemischen Eigenschaften liegen. Die Hydrophobizität ist durch den Einbau zweier Tryptophanreste um 20 % gegenüber der Leitsubstanz HP01 gestiegen und dadurch das hydrophobe Moment um die Hälfte auf 0,056 gesunken, verglichen mit dem Derivat HP01[PRPPHPRL] um 25 %. Dieser niedrige Wert für $\langle\mu_H\rangle$ spricht für schlechtere amphiphile Eigenschaften einer ausgebildeten helikalen Struktur und somit für eine schlechtere Membrantranslokation.

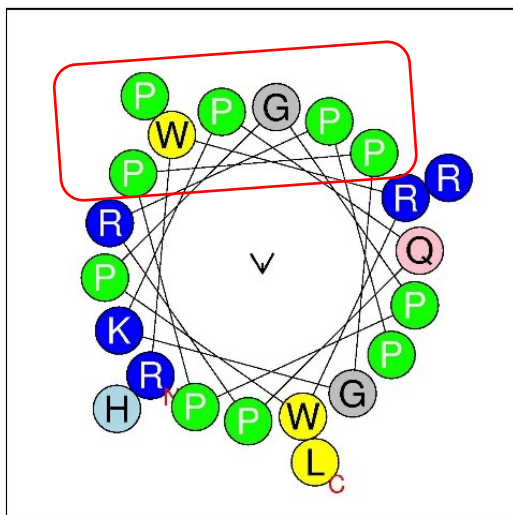


Abbildung 92: Helikale Struktur von [RWRW]HP01[PRPPHPRL] (erstellt mit HeliQuest); rot markiert die stark hydrophobe Oberflächenregion PPWPGPP

Die Modellierung der helikalen Sekundärstruktur zeigte für dieses 22mer Peptid eine deutlich hydrophobe Oberflächendomäne mit der Sequenz PWPPGPP mit einer weiteren stark hydrophoben Region auf der direkt gegenüberliegenden Seite. Trotz eines der Leitstruktur HP01 nahezu identischen Verhältnisses von polaren zu unpolaren Resten, scheint durch eine helikale Anordnung in der Sekundärstruktur keine optimalen amphiphilen Eigenschaften mehr realisierbar.

- BT 96 [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]

Das zweite interessante N-terminale CPP-Motiv MIIFR besitzt einen stark hydrophoben Charakter und mit nur einem Arginin, ist, verglichen mit dem vorherigen Motiv hinsichtlich der zytotoxikologisch bedenklichen Grenze von einer Gesamtnettoladung von +5, zu bevorzugen. Hier ist das Auftreten unspezifischer membranolytischer Effekte weniger wahrscheinlich.

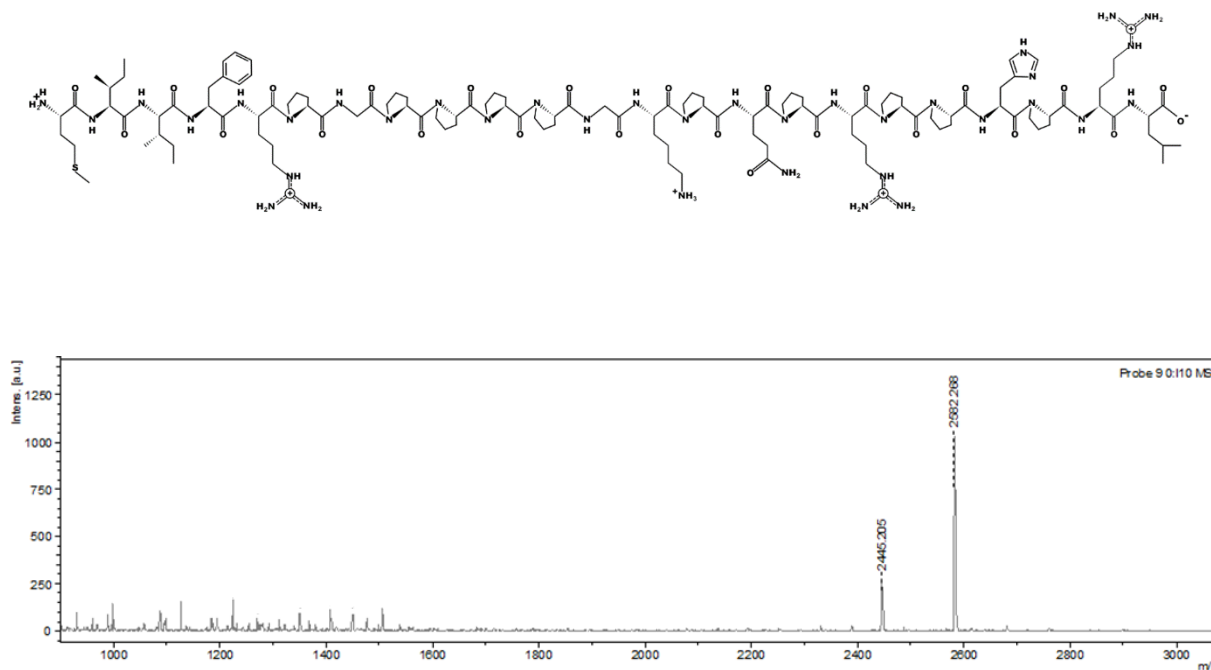


Abbildung 93: Oben: Chemische Struktur von [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 2582 Da und dem Nebenprodukt bei 2445 Da ($\Delta M = -137$ Da, fehlendes Histidyl; ca. 250 a.u.)

Die chemische Festphasensynthese von [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] erfolgte ebenfalls an einem *preloaded Leucin-Wang*-Harz und zeigte sich mit einer Ausbeute von 85 % unproblematischer wie die SPPS von [RWRW]HP01[PRPPHPRL]. Im in Abbildung 93 dargestellten Massenspektrum zeigt sich allerdings ebenfalls das Nebenprodukt mit einer Massendifferenz von -137 Da und somit, wenn auch geringer wie in den vorangegangenen Synthesen, auch hier die Problematik der Sequenzabfolge PHP im C-terminalen Teil.

Die Testung der antibakteriellen Wirkung zeigte allerdings deutliche Verbesserungen. Auch für [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] ist eine sehr gute Dosisabhängigkeit erkennbar. Der Dosis-Wirkungsverlauf lieferte einen IC_{50} -Wert von 100 $\mu\text{g/mL}$, einen MIC_{90} -Wert von 250 $\mu\text{g/mL}$ und erstmals eine minimale inhibitorische Konzentration von 500 $\mu\text{g/mL}$.

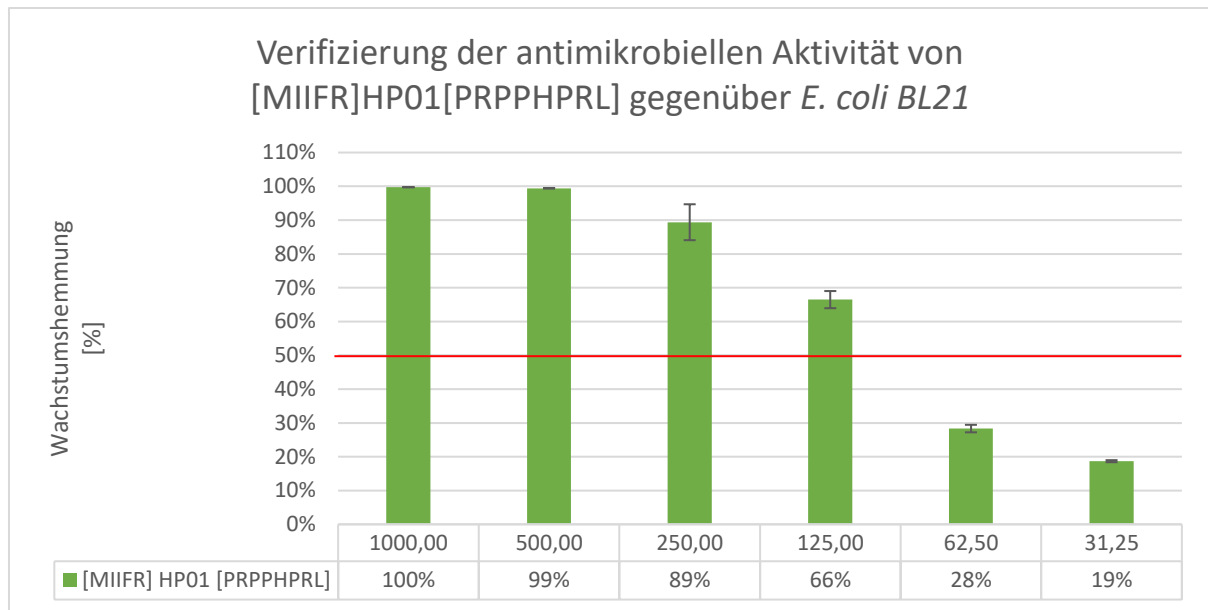


Abbildung 94: Dosis-Wirkungs-Profil der antibakteriellen Aktivität von [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]

Im Bereich der physikochemischen Eigenschaften zeigte sich eine Erhöhung der Hydrophobizität gegenüber der Leitsubstanz um 50 % auf 0,496. Dies lässt sich durch die N-terminale Sequenz MIIFR erklären, welche einen stark lipophilen Charakter aufweist. So sinkt das hydrophobe Moment auf einen Wert von 0,042. Dies entspricht eine Änderung von - 62,5 % und liegt nochmals unterhalb des Wertes von [RWRW]HP01[PRPPHPRL].

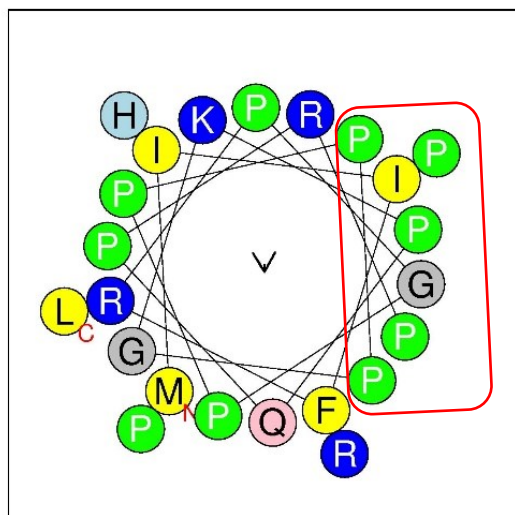


Abbildung 95: Helikale Struktur von [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] (erstellt mit HeliQuest), rot markiert die stark hydrophobe Oberflächenregion PIPPGPP auf der rechten Helixseite.

Dieses Verhältnis der helikalen Parameter scheint allerdings in besseren amphiphilen Eigenschaften zu münden. Das Verhältnis polarer zu unpolaren Aminosäuren von 33/66 sorgt für eine etwas andere helikale Sekundärstruktur. [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] besitzt auch eine stark lipophile Oberflächen-Domäne mit der Sequenz PIPGPP, allerdings zeigen sich in der modellierten Helix neben dieser Domäne keine weiteren rein hydrophoben Bereiche, wie es bei [RWRW]HP01[PRPPHPRL] der Fall war, sondern alle anderen Bereiche weisen gleichermaßen verteilte polare und unpolare Aminosäuren auf. Dies könnte für eine bessere Amphiphilie insbesondere in Bezug auf die Membrangängigkeit des Peptids sprechen und somit für ein besseres antibakterielles Potential.

- BT 99 [MIIFR]HP01-NH₂

Eine der häufigsten Modifikationen antimikrobieller Peptide stellt die Amidierung des C-Terminus dar, da dies in vielen Fällen positive Effekte auf die antimikrobielle Aktivität zeigt. Dieser Effekt lässt sich im Allgemeinen auf die größere Neigung zur Bildung von helikalen Strukturen durch Peptidamide verglichen mit ihren nicht-amidierten Analoga. Daher wurden einige Derivate in ihrer Amidform synthetisiert und getestet. Stellvertretend für diese Gruppe sollen nun die Amidformen von [MIIFR]HP01 und [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] diskutiert werden.



Abbildung 96: Oben: Chemische Struktur von [MIIFR]HP01-NH₂; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 1630 Da

Die Synthese des Derivates über SPPS erfolgte an einem *Rink-Amid*-Harz und ist mit einer Ausbeute von 95 % als unproblematische Sequenz einzustufen. Verglichen mit der nicht-amidierten Form der Peptide muss hier die Kupplung der ersten Aminosäure, in diesem Fall Leucin direkt an das Harz erfolgen, was nicht selten zu Problemen führt. Wie im Massenspektrum zu erkennen, verlief die Synthese optimal, da neben dem Molpeak bei einem m/z Verhältnis von 1630 Da keine weiteren Nebenprodukte bereits im Rohpräzipitat detektierbar sind.

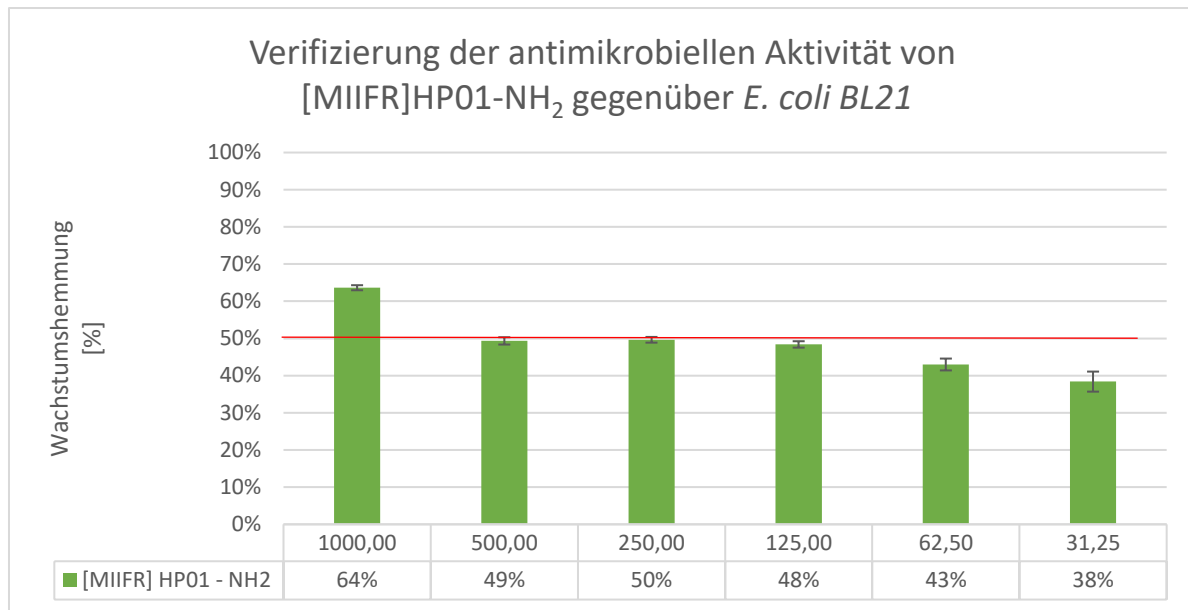


Abbildung 97: Dosisabhängige antimikrobielle Wirkung von [MIIFR]HP01-NH₂

Im antibakteriellen Mikrodilutionsassay zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung gegenüber dem gramnegativen *E. coli* BL21 mit einem IC₅₀-Wert von 250 µg/mL. Hier bestätigt sich die Theorie der besseren antibakteriellen Wirksamkeit gegenüber der nicht-amidierten Form, welche einen IC₅₀-Wert von 750 µg/mL erreichte.

Im Bereich der physikochemischen Parameter zeigte sich ein identisches Bild verglichen mit der nicht-amidierten Form. Die Hydrophobizität wurde mit 0,581 ebenso wie das hydrophobe Moment mit einem Wert für $\langle \mu H \rangle$ von 0,157 der nicht-amidierten Form gleichgesetzt. In der Modellhelix zeigte sich eine nicht optimale Form der helikalen Struktur und es konnte keine lipophile Oberflächendomäne für diese Struktur mit Hilfe des Tools HeliQuest bestätigt werden. Die Gründe für eine verbesserte antimikrobielle Aktivität werden im Anschluss an das nächste Derivat gemeinsam erläutert.

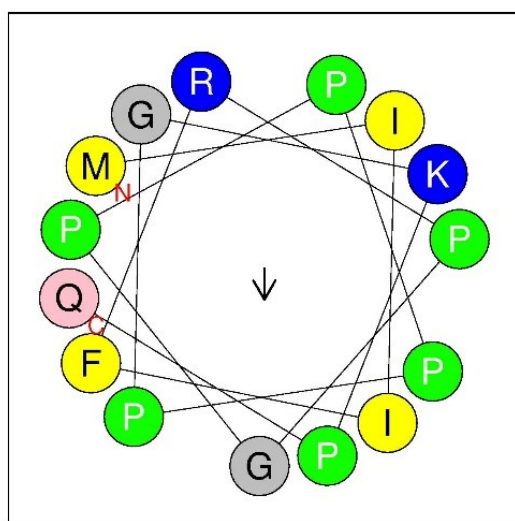


Abbildung 98: Helikale Struktur von [MIIFR]HP01 (erstellt mit HeliQuest), gut erkennbar die nicht optimale Helixstruktur

• BT 112 [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂

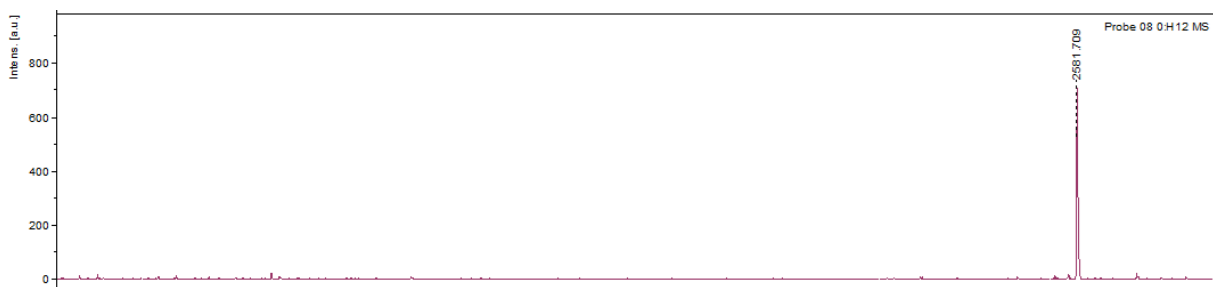
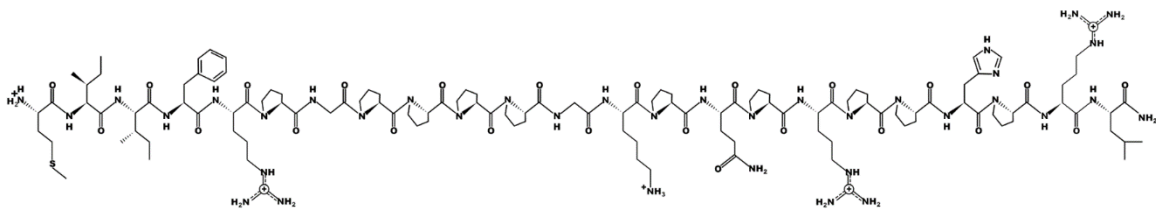


Abbildung 99: Oben: Chemische Struktur von [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂; Unten: MS-Spektrum des synthetisierten Derivats mit Molpeak bei 2580 Da

Die chemische Festphasensynthese des Derivates [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂ lieferte eine Ausbeute von 95 % und wurde ebenfalls an einem *Rink-Amid*-Harz als Festphase synthetisiert. Verglichen mit den bereits diskutierten Derivaten mit der C-terminalen konservierten Sequenz PRPPHPRL erfolgte hier die Synthese unproblematisch und es konnte kein Nebenprodukt im Massenspektrum mit einer Differenz von -137 Da zum Molpeak detektiert werden. Hier scheint die Synthese des Motivs PHP unproblematisch zu verlaufen, was unter Umständen auf die im Allgemeinen geringere Beladungskapazität der *Rink-Amid-Resins* zurückzuführen ist. Durch die größere räumliche Trennung direkt am Harz könnte für die beiden Ringsysteme des Prolins und des Histidins und die damit verbundene stereochemische Anordnung mehr Raum zur Verfügung stehen.

Im Mikrodilutionsassay zur Testung der antibakteriellen Wirksamkeit zeigte sich nochmals eine Verbesserung des IC₅₀-Wertes auf 31,25 µg/mL, MIC und MIC₉₀ blieben nahezu identisch, ebenso wie die bereits bei der nicht-amidierten Form [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] diskutierten physikochemischen Parameter. Diese zeigten ja hier bereits offenbar ein für helikale Strukturen optimales Verhältnis von Hydrophobizität <H> und hydrophoben Moment <µH>. Eine modellierte helikale Struktur mit hydrophober Oberflächendomäne ist in Abbildung 95 gezeigt.

Wie in Abbildung 100 zu sehen ändert sich durch die Amidform am C-Terminus der IC₅₀-Wert verglichen mit der nicht-amidierten Form deutlich von 100 µg/mL auf 31,25 µg/mL. Dieser Effekt lässt sich wie folgt erläutern.

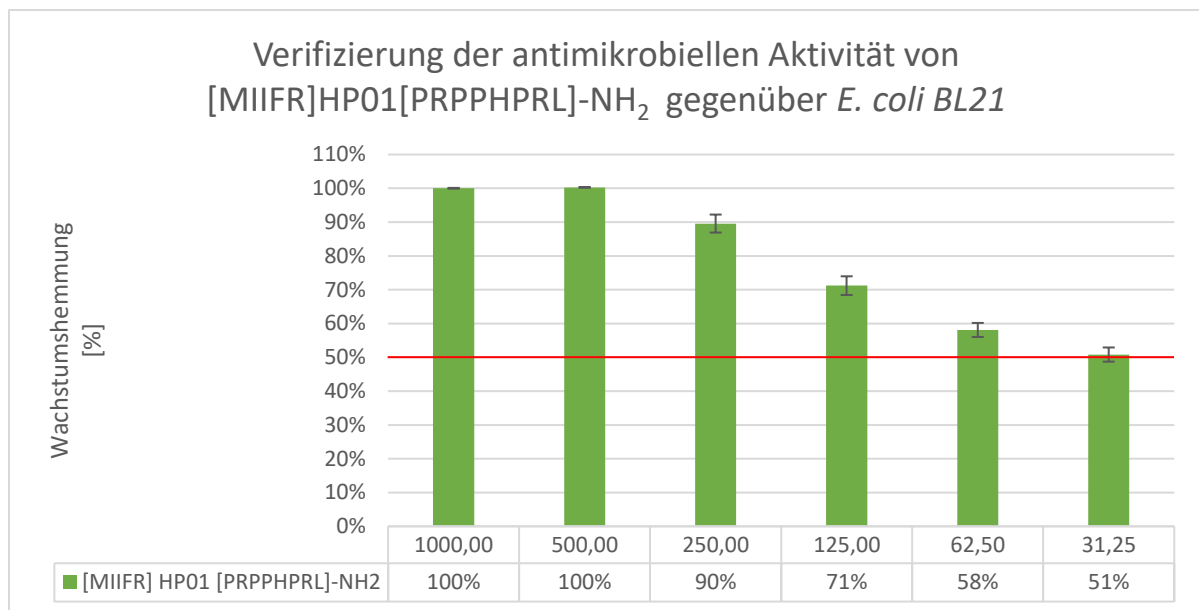


Abbildung 100: Dosisabhängige antibakterielle Wirkung der amidierten Form [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂ gegenüber dem Referenzstamm *E. coli* BL21

Der Mechanismus der AMP-Interaktion ist abhängig von der Membrenumgebung und kann derzeit nicht durch ein alleiniges Modell erklärt werden. Grundsätzlich ist jedoch bekannt, dass Targeting und Bindung des Peptids an die Membran über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den kationischen Bereichen des Peptids und seinen negativ geladenen Einheiten, wie die Phospholipide der Membran erfolgt. Sobald diese jedoch mit der Membran interagieren, ist die Stabilität der Sekundärstruktur von herausragender Bedeutung für die Membranpenetration und somit die Translokation ins Zellinnere. Cabrera *et al.* erklärten, dass die C-terminale Amidierung ein entscheidender Punkt hinsichtlich der Helixstabilität ist (dos Santos Cabrera *et al.* 2004). So zeigten Studien mit dem antibakteriellen Peptid Aurein, dass diese Peptide in Lösung zunächst keine Sekundärstrukturelemente aufweisen, sich aber in Gegenwart einer Lipidgrenzfläche helikale Strukturen ausbildeten (Mura *et al.* 2013).

Die antimikrobielle Wirkung der AMPs ist ebenfalls mit der positiven Ladung auf den Peptiden verbunden. Da bei der Amidierung die negative Ladung des C-Terminus wegfällt, erhöht sich die positive Nettoladung um +1, was ein Grund für die höhere Aktivität dieser Peptide sein könnte.

Die Peptidbindung und die Verteilung in eine Membran werden auch durch die Fähigkeit eines AMPs zur Änderung des Lipidpolymorphismus bestimmt. Neben den bereits erwähnten physikochemischen Eigenschaften spielen Aminosäuren mit mehreren C-C-Bindungen in ihren Seitenketten eine zentrale Rolle. Eine dieser Aminosäuren ist Lysin, die über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Kopfgruppen der Lipide interagiert. Der amidierte C-Terminus des Peptids kann, verglichen mit der Carboxylfunktion, ebenfalls eine größere Anzahl an Wasserstoffbrücken bilden.

Die Anwesenheit einer Amidgruppe am C-Terminus ermöglicht eine tiefere Penetration durch eine starke Wechselwirkung beispielsweise mit den 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin-Kopfgruppen der Lipiddoppelschicht eines gramnegativen Bakteriums. Besitzen die Peptide an ihrem C-

Terminus die Carboxylgruppe, so interagieren sie über den N-Terminus mit der Lipiddoppelschicht und bevorzugen eine geneigte Penetration in die Membran, welche weniger tief ist (Kubyschkin et al. 2018).

Fasst man die oben genannten Erkenntnisse zusammen, lässt sich die höhere Wirksamkeit auf eine bessere Membrangängigkeit der amidierten Peptide zurückführen.

Tabelle 53: Übersicht der helikalen physikochemischen Parameter aller Derivate

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Hydrophobizität [H]	Hydrophobes Moment [μ H]	Ratio polar/unpolare AS	Hydrophobic face
BT 1	HPO1	PGPPPPGKPQ	0,311	0,112	40/60	-
BT 27	[R][R ⁸]HPO1	RPGPPPPGRPQ	0,208	0,226	40/60	-
BT 30	[RQ][R ⁸]HPO1-NH ₂	RQPGPPPPGRPQ-NH ₂	0,155	0,105	50/50	-
BT 90	[RRIR]HPO1	RRIRPGPPPPGKPQ	0,134	0,277	50/50	-
BT 92	[RWRW]HPO1	RWRWPGPPPPGKPQ	0,399	0,097	42,86/57,14	-
BT 94	[MIIFR]HPO1	MIIFRPGPPPPGKPQ	0,581	0,157	33,33/66,67	-
BT 81	[VDKPPYLPR][R ⁸]HPO1	VDKPPYLPRPGPPPPGRPQ	0,335	0,234	36,84/63,16	PLPGPPP
BT 39	HPO1[YLPRPRPQ]	PGPPPPGKPQYLP RPRPQ	0,316	0,1	38,89/61,11	PGPPP
BT 89	HPO1[YLPRPRPK]	PGPPPPGKPQYLP RPRPK	0,273	0,136	38,89/61,11	PGPPP
BT 107	HPO1[YLPRPR]	PGPPPPGKPQYLP RPR	0,324	0,134	37,5 / 62,5	-
BT 110	HPO1[PRPPHPRL]	PGPPPPGKPQPRP PHPRL	0,322	0,084	38,89/61,11	PPPGPP
BT 95	[RWRW]HPO1 [PRPPHPRL]	RWRWPGPPPPGKPQPRPPHPRL	0,376	0,056	40,91/59,09	PWPPGPP
BT 96	[MIIFR]HPO1[PRPPHPRL]	MIIFRPGPPPPGKPQPRPPHPRL	0,496	0,042	34,78/65,22	PIPPGPP
BT 99	[MIIFR]HPO1-NH ₂	MIIFRPGPPPPGKPQ-NH ₂	0,581	0,157	33,33/66,67	-
BT 112	[MIIFR]HPO1[PRPPHPRL]-NH ₂	MIIFRPGPPPPGKPQPRPPHPRL-NH ₂	0,496	0,042	34,78/65,22	PIPPGPP

Tabelle 54: Zusammenfassung der IC₅₀ Werte, MIC₉₀ und MIC aller Derivate

Nr	Bezeichnung	Sequenz	IC ₅₀ [µg/mL]	MIC ₉₀ [µg/mL]	MIC [µg/mL]
BT 01	HP01	PGPPPPGKPQ			
BT 27	[R][R ⁸]HP01	RPGPPPPGRPQ	1000		
BT 30	[RQ][R ⁸]HP01-NH ₂	RQPGPPPPGRPQ-NH ₂	> 1000		
BT 90	[RRIR]HP01	RRIRPGPPPPGKPQ	< 1000		
BT 92	[RWRW]HP01	RWRWPGPPPPGKPQ	375		
BT 94	[MIIFR]HP01	MIIFRPGPPPPGKPQ	750		
BT 81	[VDKPPYLPR][R ⁸]HP01	VDKPPYLPRPGPPPPGRPQ	375		
BT 39	HP01[YLPRPRPQ]	PGPPPPGKPQYLPRPRPQ	375		
BT 89	HP01[YLPRPRPK]	PGPPPPGKPQYLPRPRPK	500		
BT 107	HP01[YLPRPR]	PGPPPPGKPQYLPRPR	62,5		
BT 110	HP01[PRPPHPRL]	PGPPPPGKPQPRPPHPRL	187,5	750	
BT 95	[RWRW]HP01[PRPPHPRL]	RWRWPGPPPPGKPQPRPPHPRL	500		
BT 96	[MIIFR]HP01[PRPPHPRL]	MIIFRPGPPPPGKPQPRPPHPRL	100	250	500
BT 99	[MIIFR]HP01-NH ₂	MIIFRPGPPPPGKPQ-NH ₂	250		
BT 112	[MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH ₂	MIIFRPGPPPPGKPQPRPPHPRL-NH ₂	31,25	250	500

4.3.3 Untersuchungen zur zytotoxikologischen Unbedenklichkeit ausgewählter Derivate

Wie schon mit der Leitstruktur HP01 wurde im Anschluss an die durchgeführten QSAR-Studien das zytotoxische Potential der Derivate an HeLa-Zellen getestet. Hierzu wurden die Zellen wie unter 3.2.5.1 beschrieben kultiviert und die Substanzen auf eine mögliche zytotoxische Wirkung auf diesen Zelltyp nach Methode 3.2.5.2 getestet. Als Positivkontrollen wurden, wie auch bereits im ersten Experiment das Zytostatikum Doxorubicin und das Tensid SDS eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine Lösung aus 20% PBS in Kulturmedium verwendet.

4.3.3.1 Derivate mit Modifizierung im Kern– Peptid

Vergleicht man zunächst die Derivate, welche eine Modifizierung im Kern-Peptid aufweisen, so konnte wie in Abbildung 101 ersichtlich keine wesentliche Änderung im zytotoxischen Potential in Bezug auf die absolute Konzentration nachgewiesen werden.

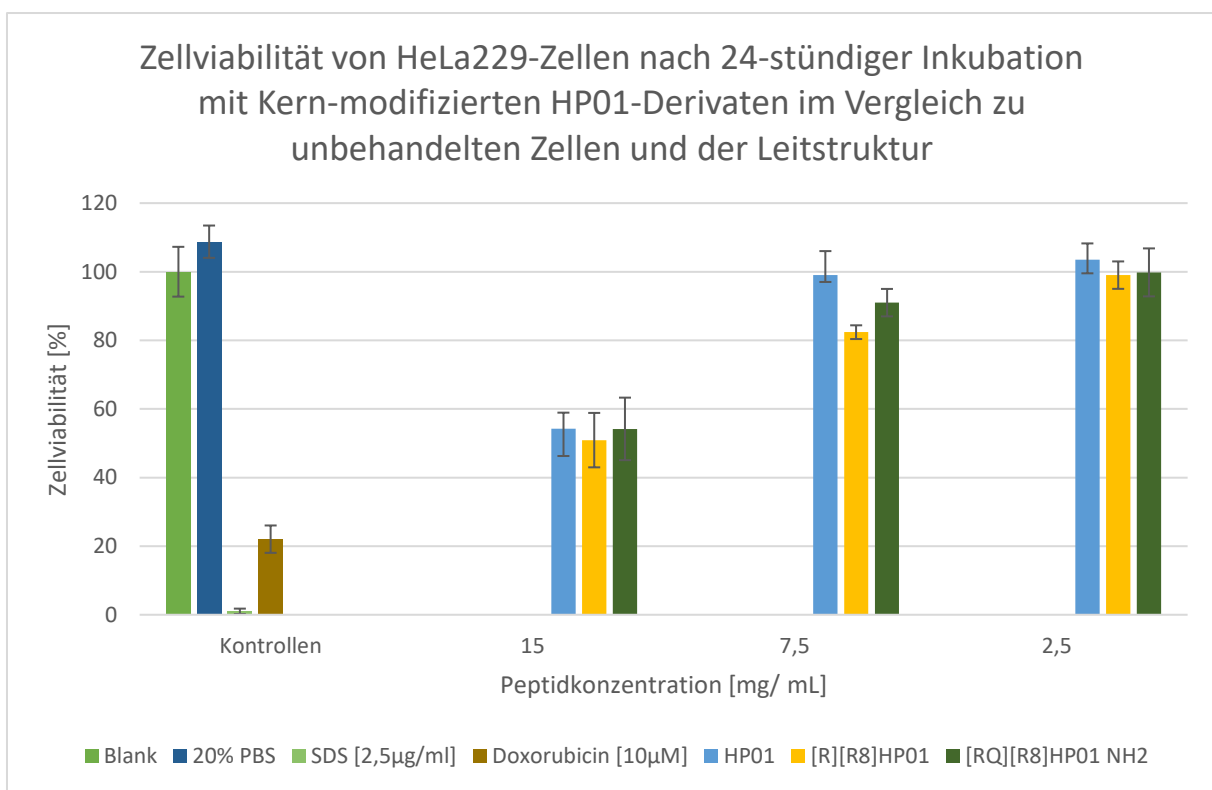


Abbildung 101: Ergebnisse des MTT-Assays zur Testung des zytotoxischen Potentials der im Kern-Peptid veränderten Derivate [R][R⁸]HP01 und [RQ][R⁸]HP01-NH₂ gegenüber Epithelzellen

In der niedrigsten eingesetzten Konzentration zeigten die Derivate [R][R⁸]HP01 und [RQ][R⁸]HP01-NH₂ keine zytotoxische Wirkung, ebenso wie die Leitstruktur HP01. In der mittleren Konzentration induzieren beide Substanzen erste zytotoxische Effekte auf die HeLa-Zellen. Hier konnte für [R][R⁸]HP01 mit ca. 80 % vitaler Zellen eine etwas höhere zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden als für [RQ][R⁸]HP01-NH₂. Im Bereich der hohen Konzentration verhielten sich beider Derivate ähnlich der Leitstruktur und zeigten mit ca. 50 % Zellviabilität deutliches zytotoxisches Potential.

Tabelle 55: Übersicht der Zellviabilität der HeLa-Zellen nach dosisabhängiger, 24-stündiger Inkubation mit Kern-Peptid-modifizierten Derivaten sowie die Vergleichskontrollen

	Substanz	IC _{50AB} [nM]	C1 15mg/mL x-fach IC ₅₀	Zellviabilität [%]	C2 7,5mg/mL x-fach IC ₅₀	Zellviabilität [%]	C3 2,5mg/mL x-fach IC ₅₀	Zellviabilität [%]
BT 1	HP01	20,6	150	54,21	75	99,02	25	103,54
BT 27	[R][R ⁸]HP01	18,2	150	50,91	75	82,38	25	99,01
BT 30	[RQ][R ⁸]HP01-NH ₂	< 16,32	150	54,19	75	90,99	25	99,81
PK1	SDS [2,5 µg/mL]			3,24				
PK2	Doxorubicin [10 µM]			22,04				
NK	20 % PBS			108,76				

Betrachtet man nun zusätzlich die IC₅₀-Werte zeigten sich im Falle der Kern-modifizierten Derivate im Vergleich zur Leitstruktur HP01 ebenfalls annähernd vergleichbare Verträglichkeiten bzw.

Zellschädigungen. So konnten innerhalb der antimikrobiellen Aktivität verbesserte Eigenschaften erreicht werden, welche nicht auf Kosten des zytotoxischen Profils der Substanzen ging und somit die hohe Verträglichkeit der Leitstruktur beibehalten werden konnte. Eine übersichtliche Darstellung dieser Daten und Parameter liefert Tabelle 55.

4.3.3.2 Derivate mit N-terminaler Modifizierung

Vergleicht man die absoluten Konzentrationen der N-terminal modifizierten Derivate mit dem zytotoxischen Potential der Leitstruktur HP01, so wird deutlich, dass die Änderungen des N-Terminus eine deutliche Steigerung der Zytotoxizität der Derivate ab einer Konzentration von 7,5 mg/mL nach sich zog.

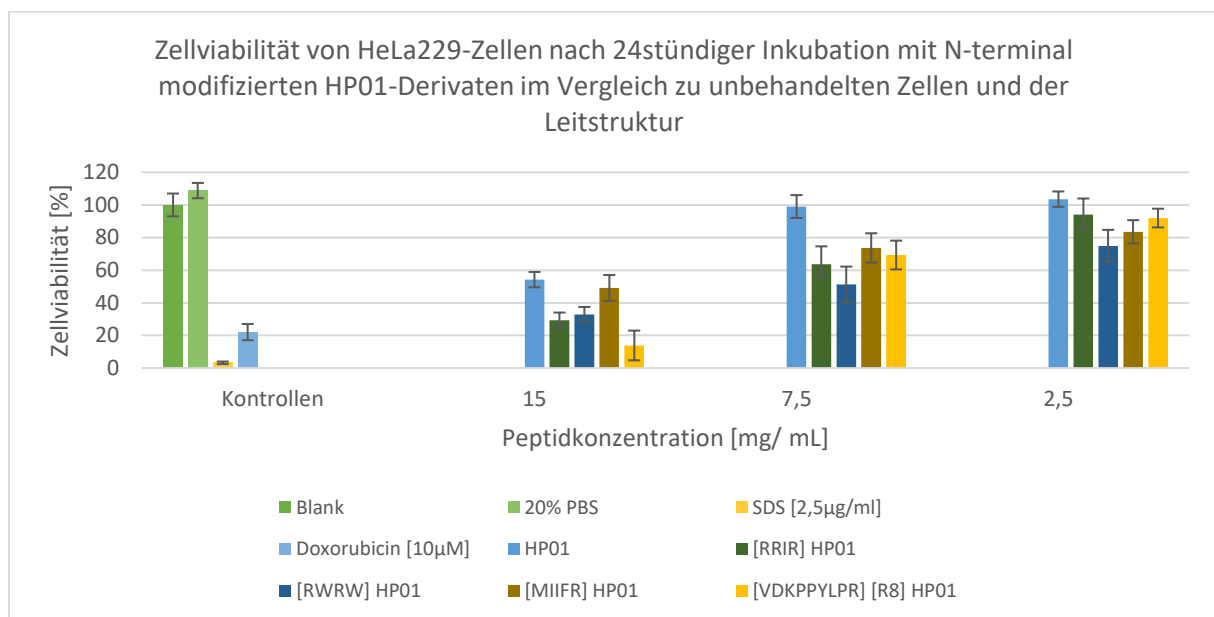


Abbildung 102: Konzentrationsabhängige zytotoxische Effekte der N-terminalen Derivate auf HeLa229-Zellen

Im Bereich der niedrigsten Konzentration von 2,5 mg/mL zeigten sich leichte bis mäßige toxische Effekte auf die HeLa-Zellen und im Bereich der hohen Konzentrationen konnte lediglich das Derivat [MIIFR]HP01 ähnliche Werte wie die Leitstruktur erreichen. Die Derivate [RRIR]HP01 und [RWRW]HP01 wirkten bereits annäherungsweise wie das zur Positivkontrolle eingesetzte Zytostatikum Doxorubicin, Derivat [VDKPPYLPR][R⁸]HP01 wirkte sogar deutlich stärker zytotoxisch wie die Vergleichssubstanz. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 102 dargestellt.

Die zur Beurteilung der zellschädigenden Wirkung festgelegten Schwellenwerte, setzen sich wie folgt zusammen:

- Keine zellschädigende Wirkung – 100 % Zellvitalität
- Leichte bis mäßige zellschädigende Wirkung – Zellvitalität > 75 %
- Deutliche zellschädigende Wirkung - Zellvitalität 45 % < X > 75 %
- Starke zellschädigende Wirkung – Zellvitalität < 45 %

Betrachtet man nun nicht nur die absoluten Konzentrationen, sondern vergleicht man anhand der oben gesetzten Schwellenwerten für die zytotoxischen Effekte in Korrelation mit den im Mikrodilutionsassay und für das Wirkstoffdesign wichtigen ermittelten IC₅₀-Werte, so zeichnen sich die untersuchten Derivate durch die unterschiedlichen Stoffmengen im Vergleich zu HP01 noch deutlicher ab.

Tabelle 56: Zytotoxische Wirkung N-terminal modifizierter Derivate auf HeLa-Zellen anhand ihrer IC₅₀-Werte

	Substanz	IC _{50AB} [nM]	C1 15mg/ mL x-fach IC ₅₀	Zellvia- bilität [%]	C2 7,5mg/ mL x- fach IC ₅₀	Zellvia- bilität [%]	C3 2,5mg/ mL x-fach IC ₅₀	Zellvia- bilität [%]
BT 1	HP01	20,1	150	54,21	75	99,02	25	103,54
BT 90	[RRIR]HP01	12,88	150	29,33	75	63,6	25	94,11
BT 92	[RWRW]HP01	4,53	400	32,76	200	51,19	100	74,91
BT 94	[MIIFR]HP01	9,19	200	49,13	100	73,63	33,4	83,51
BT 81	[VDKPPYLPR][R ⁸]HP01	3,63	400	13,88	200	69,21	66,7	91,95
PK1	SDS [2,5 µg/mL]			3,24				
PK2	Doxorubicin [10 µM]			22,04				
NK	20 % PBS			108,76				

Wie aus Tabelle 56 ersichtlich zeigte HP01, mit einem IC₅₀-Wert von 20,1 nM, erste zytotoxische Effekte ab einem 75-fachen seines IC₅₀-Wertes. [RRIR]HP01 schnitt hier im Vergleich zur Leitstruktur schlechter ab. Hier konnten bereits ab dem 25-fachen IC₅₀-Wert mit einer Zellviabilität von 94% leichte toxische Effekte beobachtet werden. Bei Derivat [RWRW]HP01 waren mit einer 75 %igen Zellviabilität in der niedrigsten eingesetzten Konzentration bereits mäßige zytotoxische Wirkungen der Substanz auf die Zellen zu verzeichnen. Mit einem 67-fachen des ermittelten IC₅₀-Wertes besaß dieses Derivat näherungsweise das gleiche zytotoxische Potential wie unsere Leitstruktur, ähnlich waren die Ergebnisse für das Derivat [VDKPPYLPR][R⁸]HP01 zu bewerten. Derivat [MIIFR]HP01 zeigte mit einer Zellviabilität von 83 % bei einer Stoffmenge des 33-fachen IC₅₀ mäßige toxische Wirkung auf die HeLa-Zellen, schnitt aber gerade in den hohen Stoffmengen von 200-fachem IC₅₀-Wert von allen N-terminal-modifizierten Derivaten optimal und ähnlich der Leitsubstanz HP01 ab.

Vergleicht man nun allerdings die IC₅₀-Werte wird deutlich, dass durch die N-terminale Modifizierung eine deutliche Verbesserung der IC₅₀-Werte erreicht werden konnte. Diese wurde bereits in Abschnitt 4.3.2.2 diskutiert.

4.3.3.3 Derivate mit C-terminaler Modifizierung

Die C-terminale Modifizierung wirkte sich hinsichtlich der zytotoxischen Eigenschaften der Derivate eindeutig positiver aus. In Abbildung 103 sind die konzentrationsabhängigen Überlebensraten der HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit den jeweiligen Derivaten dargestellt. Hier zeigten drei der vier Peptidderivate keine zytotoxische Wirkung und konnten somit der Leitsubstanz in dieser Konzentration gleichgestellt werden. Bei einer mittleren Konzentration von 7,5 mg/mL stach im Vergleich der Derivate

die Substanz HP01[PRPPHPRL] mit einer Überlebensrate von >90 % hervor. Mäßiges zytotoxisches Potential zeigten hier die Derivate HP01[YLPRPR] und HP01[YLPRPRPQ] mit 80 % respektive 73 % Zellviabilität. Deutlich schlechtere Werte mit einer Überlebensrate von 63 % zeigte Derivat HP01[YLPRPRPK], was sich auch in der höchsten Konzentration für diese Sequenz widerspiegelte. Im Vergleich zur Leitsubstanz konnte das zytotoxische Potential in der höchsten Konzentration für zwei Derivate gesenkt werden. HP01[PRPPHPRL] zeigte hier eine Überlebensrate von 60 %, HP01[YLPRPR] sogar 67 %. Im Vergleich zur Positivkontrolle Doxorubicin waren für alle Derivate in der höchsten eingesetzten Konzentration von 15 mg/mL eine deutlich geringere toxische Wirkung auf die Zellen zu verzeichnen.

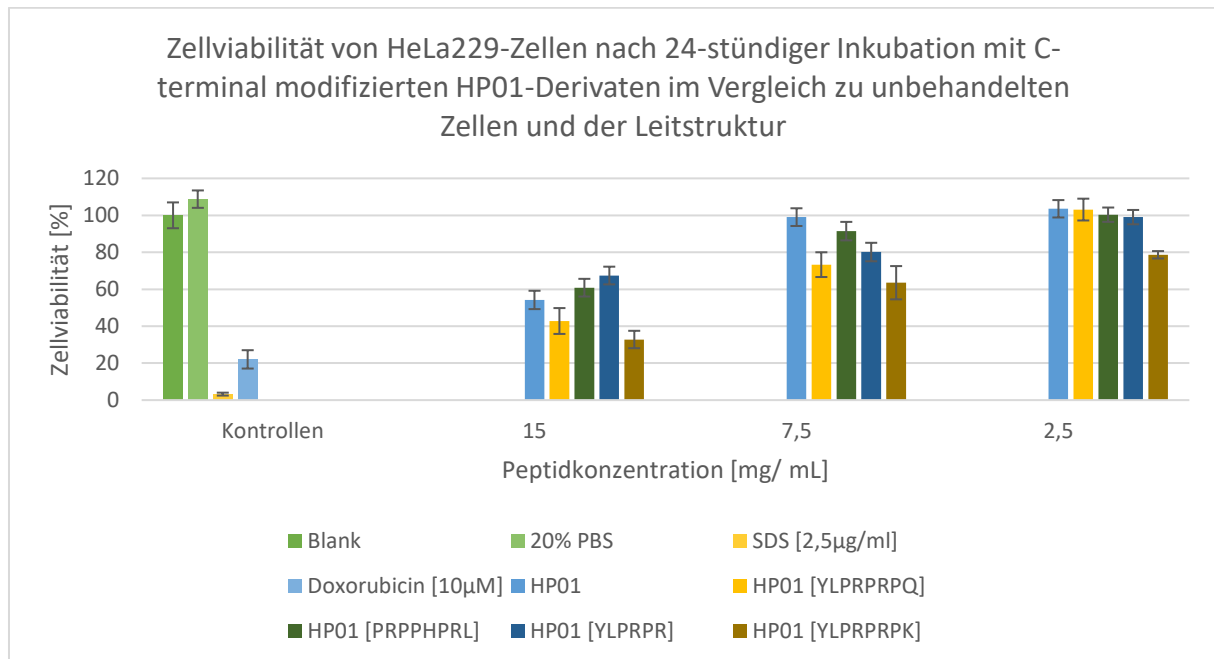


Abbildung 103: Zellschädigender Effekt der C-terminale modifizierten Peptide gegenüber HeLa-Zellen in Bezug auf die im MTT-Assay eingesetzte absolute Konzentration der Derivate

Bezieht man sich auch hier auf die in Tabelle 57 aufgezeigten IC₅₀-Werte, so werden die Vorteile der Modifizierungen noch deutlicher, da durch die C-terminale Modifizierung die IC₅₀-Werte zum Teil ebenfalls signifikant verbessert wurden. Ebenso konnte die nominell eingesetzte Stoffmenge durch die Kettenverlängerung gegenüber des 10mer Peptids gemindert werden.

HP01[YLPRPRPK] zeigte bei einer Stoffmenge des 134-fachem IC₅₀-Wertes eine Überlebensrate von 78 %, eine mäßige zytotoxische Wirkung und ab einem 400-fachen IC₅₀ deutlich zytotoxisches Potenzial.

HP01[YLPRPRPQ] wies bei dem 67-fachen des IC₅₀-Wertes keinerlei toxische Wirkung auf die Zellen auf, ab einer Stoffmenge des 20-fachen IC₅₀-Werts mit 73 % Zellviabilität allerdings schon deutliche zellschädigende Eigenschaften.

HP01[PRPPHPRL] zeigte bei einer Stoffmenge 50-fach höher seines IC₅₀-Wertes keine feststellbaren zellschädigende Einflüsse auf die HeLa-Zellen, auch bei einer Erhöhung auf das 150-fache des IC₅₀-Wertes, war lediglich eine leichte zytotoxische Wirkung bei einer Überlebensrate von 91 % zu verzeichnen. Eine deutliche Zellschädigung erzeugte erst eine Stoffmenge 300-fach höher als der IC₅₀-Wert.

Noch erfolgsversprechender zeigte sich Substanz HP01[YLPRPR] hinsichtlich einer verbesserten Verträglichkeit. Bei einer eingesetzten Stoffmenge, die 400-fach höher des IC₅₀-Wertes lag, zeigt dieses Derivat noch keinerlei zellschädigendes Potential. Mit einer Überlebensrate von 80 % stellte sich selbst bei einem 1200-fachen des IC₅₀-Wertes noch eine gute bis mäßige Verträglichkeit für die Zellen.

Tabelle 57: IC₅₀-Werte und Zellviabilitäten der zytotoxischen Untersuchungen C-terminal veränderter Peptide

	Substanz	IC _{50AB} [nM]	C1	Zellvia-	C2	Zellvia-	C3	Zellvia-
			15 mg/mL x-fach IC ₅₀	bilität [%]	7,5 mg/mL x-fach IC ₅₀	bilität [%]	2,5 mg/mL x-fach IC ₅₀	bilität [%]
BT 1	HP01	20,1	150	54,21	75	99,02	25	103,54
BT 39	HP01[YLPRPRPQ]	3,79	400	42,81	200	73,31	66,7	103,11
BT 89	HP01[PRPPHPRL]	1,95	300	60,84	150	91,45	50	100,33
BT 110	HP01[YLPRPR]	0,71	2400	67,42	1200	80,13	400	99,03
BT 107	HP01[YLPRPRPK]	5,05	800	32,8	400	63,53	133,4	78,64
PK1	SDS [2,5 µg/mL]			3,24				
PK2	Doxorubicin [10 µM]			22,04				
NK	20 % PBS			108,76				

Diese Daten ließen auf erfolgreich durchgeführte Designkonzepte bezüglich eines möglichst niedrigen zellschädigenden Effektes Konzentrationen über dem Vielfachen ihrer IC₅₀-Werte.

4.3.3.4 Derivate mit N/C-terminaler Modifizierung

Die positiven Ergebnisse der vorangegangenen Derivate galt es nun, ähnlich wie im Falle der antibakteriellen Aktivität, auch für die C- wie N-terminal modifizierten Derivate zu verifizieren. Fokussiert man sich zunächst auf die absolut eingesetzten Peptidkonzentrationen so zeigte sich hier ein vergleichbares Bild, wie es bereits im Fall der C-terminal veränderten Peptide zu sehen war. Drei der vier Substanzen wiesen bei einer Konzentration von 2,5 mg/mL keine zellschädigende Wirkung auf. Derivat [MIIFR]HP01-NH₂ konnte auch bei niedrigen Konzentrationen keine vollständige Verträglichkeit für die Zellen nachweisen und lag mit einer Überlebensrate von 80 % im Bereich einer mäßigen toxischen Wirkung auf die HeLa-Zellen. Bei einer mittleren Konzentration von 7,5 mg/mL zeigte sich für [MIIFR]HP01-NH₂ im Vergleich zu den drei anderen eine höhere Zellschädigung mit einer Zellviabilität nach 24 h Behandlung von 64 %. [RWRW]HP01[PRPPHPRL] zeigte sich hinsichtlich toxischer Effekte auf die Zellen etwas besser wie [MIIFR]HP01-NH₂, aber schlechter wie die beiden übrigen Derivate, deren Zellviabilität mit ca. 80 % vergleichbar war. Im Bereich der höchsten Konzentration von 15 mg/mL konnte das Derivat [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂ eine geringere Zellschädigung aufweisen wie HP01. In Abbildung 104 sind diese Daten grafisch zusammengefasst.

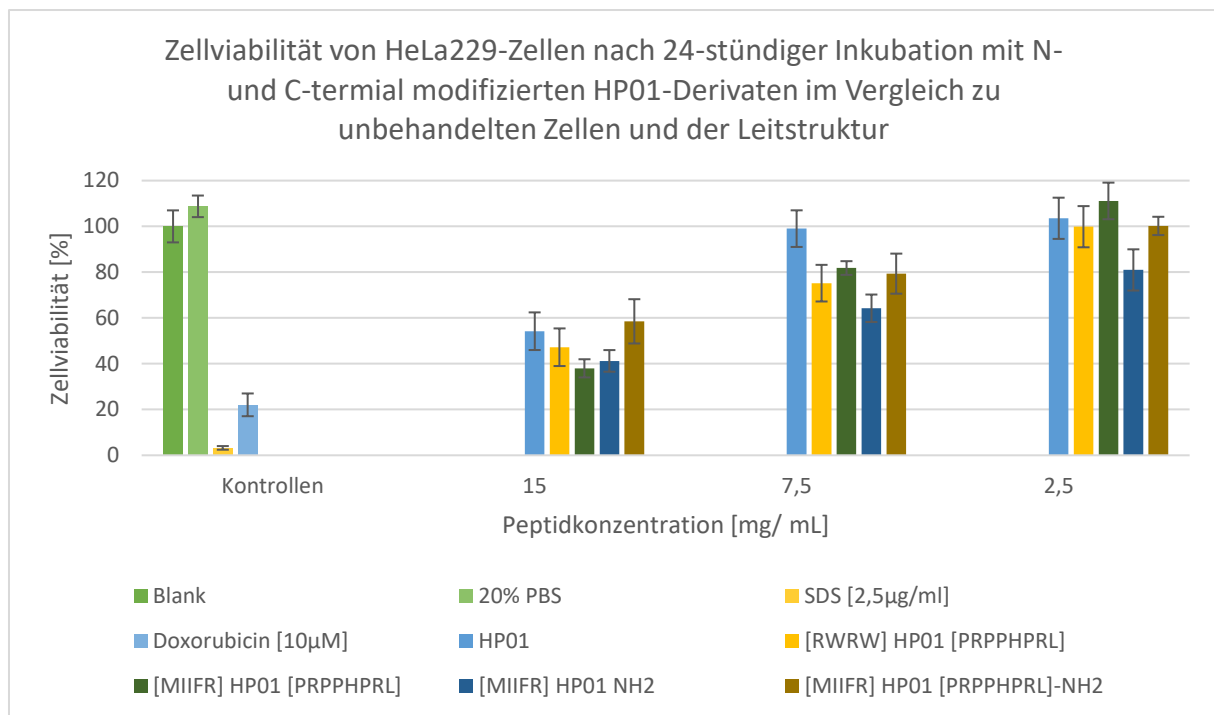


Abbildung 104: Konzentrationsabhängige zellschädigende Wirkung der Substanzen mit modifiziertem C- und N-Terminus

Die Erfolge in der strukturbasierten Weiterentwicklung der Leitstruktur lassen sich allerdings erst eindeutig erkennen, wenn man auch hier wie in den vorangegangenen Untersuchungen die ermittelten IC₅₀-Werte für das Derivat [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] und dessen amidierter Variante [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂ berücksichtigt. Eine Übersicht der wichtigsten Daten hierzu liefert Tabelle 58.

Substanz [RWRW] HP01 [PRPPHPRL] konnte bei einer eingesetzten Wirkstoffmenge entsprechend dem 80-fachen des im Mikrodilutionstest ermittelten IC₅₀-Wert keinen zellschädigenden Einfluss ausüben. Bei dem 150-fachen des IC₅₀-Wertes war noch eine mäßige Verträglichkeit der Substanz zu erkennen.

Nach einer weiteren Erhöhung auf den 300-fachen IC₅₀ Wirkstoffgehalt konnte eine starke zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden.

Vergleichsweise ähnlich verlief die Untersuchung der Verträglichkeit mit Derivat [MIIFR]HP01 NH₂. Hier konnte mit einer Wirkstoffmenge, die dem 100-fachen des IC₅₀ Wertes entspricht, eine Überlebensrate von 80 % beobachtet werden. Auch bei diesem Derivat war eine starke Zellschädigung erst bei einer Stoffmenge entsprechend dem 600-fachen des IC₅₀-Wertes zu verzeichnen.

Die vielversprechendsten Ergebnisse lieferten jedoch die Derivate [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂ und [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]. [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] zeigte bei einem Wirkstoffgehalt von 250-fach des IC₅₀ Wertes kein zytotoxisches Potential und auch bei eine 750-fachen IC₅₀-Wirkstoffmenge konnte mit einer Überlebensrate von 80 % noch eine gute Verträglichkeit aufgezeigt werden. Erst ab einer Wirkstoffmenge oberhalb dem 1500-fachen des IC₅₀-Wertes trat eine starke Zellschädigung auf.

Noch bessere Ergebnisse konnten mit der amidierter Form des eben diskutierten Derivats erreicht werden. Die Substanz [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂ zeigte bei einer Wirkstoffmenge des 800-fachen des IC₅₀-Wertes keinerlei toxische Effekte auf die Zellen, bei einer Verdreifachung der Menge auf das 2400-

fache konnte mit einer Überlebensrate von 80 % lediglich eine leicht bis mäßige zellschädigende Wirkung nachgewiesen werden.

Tabelle 58: Zellvitalitätsparameter und IC₅₀-Werte der C- und N-terminalen Modifikationen

	Substanz	IC _{50AB} [nM]	C1 15 mg/mL x-fach IC ₅₀	Zellvia- bilität [%]	C2 7,5 mg/mL x-fach IC ₅₀	Zellvia- bilität [%]	C3 2,5 mg/mL x-fach IC ₅₀	Zellvia- bilität [%]
BT 1	HP01	20,1	150	54,21	75	99,02	25	103,54
BT 95	[RWRW]HP01[PRPPHPRL]	3,84	300	47,21	150	75,2	50	99,86
BT 96	[MIIFR]HP01[PRPPHPRL]	0,77	1500	37,99	750	81,81	250	111,12
BT 99	[MIIFR]HP01-NH ₂	3,09	600	41,23	300	64,23	100	80,98
BT 112	[MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH ₂	0,24	4800	58,52	2400	79,35	800	100,2
PK1	SDS [2,5 µg/mL]			3,24				
PK2	Doxorubicin [10 µM]			22,04				
NK	20 % PBS			108,76				

Die hier vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen den Erfolg bei der Weiterentwicklung der Leitstruktur. Denn für die Derivate [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]NH₂ und [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] konnte bereits im Mikrodilutionsassay eine MIC, also eine vollständige Hemmung des bakteriellen Wachstums, ermittelt werden. Für die Weiterentwicklung solcher Substanzen zum Therapeutikum ist eine möglichst große Spanne zwischen Wirkkonzentration – hier also die MIC – und dem ersten Auftreten zellschädigender Wirkungen wichtig. Für beide Derivate konnte gezeigt werden, dass bei einer 50-fachen Wirkstoffmenge noch keine Zellschädigung auftritt und erste toxischen Effekte auf HeLa-Zellen erst ab einer 150-fachen Wirkstoffmenge auftreten.

4.4 Untersuchungen zum Wirkmechanismus

4.4.1 SPR-Studien am 70S Ribosom aus *Escherichia coli*

Das Ribosom stellt eines der am Best konservierten und hochentwickelten makromolekularen Systeme der Zelle dar. Es setzt sich aus zwei Untereinheiten unterschiedlicher Größe zusammen. In Bakterien sind dies die kleine 30S-Untereinheit und die große 50S-Untereinheit. Gemeinsam bilden sie das 70S Ribosom. Die 30S-Untereinheit decodiert alle genetischen Informationen, welche über mRNA geliefert werden. Die große 50S-Untereinheit dagegen beherbergt den sogenannten Peptidyl-Transferase-Center (PTC), innerhalb dessen die Synthese der Peptide in der Verknüpfung der Aminosäuren zu Polypeptidketten mündet. Der hochkomplexe Vorgang der ribosomalen Proteinbiosynthese bietet Antibiotika an unterschiedlichen Stellen die Möglichkeit, die Proteinbiosynthese zu inhibieren. Grob kann dieser Zyklus in vier Schritte eingeteilt werden: die Initiierung; den Elongationszyklus; die Termination sowie einen Regenerierungs-Schritt. Mit Hilfe der Kristallographie konnte das bakterielle Ribosom als Target sowie die Bindungsmodi zweier PrAMP-Klassen an das Ribosom identifiziert werden (Gagnon et al. 2016; Graf et al. 2017). Eine mögliche spezifische Wechselwirkung der im Rahmen der Arbeit synthetisierten PrAMPs mit dem Ribosom sollte nun mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie analysiert werden.

Zur Aufklärung eines ersten möglichen Targets für die neuen PrAMPs wurden Untersuchungen zur Interaktion mit dem 70S Ribosom aus *E. coli* durchgeführt. Hierzu musste zunächst das Ribosom als Ligand zur Analyse der molekularen Interaktion auf dem Sensorchip immobilisiert werden. Hierzu wurde wie unter 3.2.3.2 beschrieben die Methode der Amidkupplung genutzt, in der der Ligand kovalent durch die Ausbildung einer Amidbindung zwischen einer Carboxylgruppe der Chipoberfläche und einer Aminogruppe des Liganden gekoppelt wurde. Zur Ausbildung dieser Bindung wurden die Carboxylgruppen über eine Aktivester-Zwischenstufe aktiviert. Nach erfolgreicher Immobilisierung werden die restlichen noch aktivierten Carboxylgruppen durch Ethanolamin, einem kurzkettigen primären Amin, deaktiviert. Dieser Schritt ist nötig, um weitere Modifizierungen der Chipoberfläche durch den Analyten, der ebenfalls primäre und sekundäre Amine aufweist, zu verhindern. Abbildung 105 zeigt das Sensorgramm zum Verlauf der Immobilisierung des 70S Ribosoms aus *E. coli*.

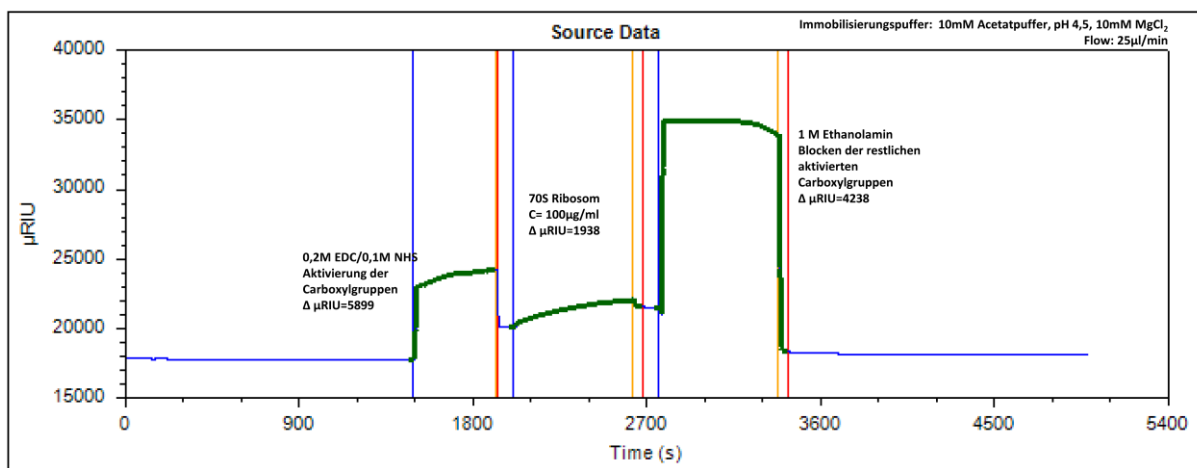


Abbildung 105: Immobilisierung des 70S Ribosoms aus *E. coli* auf einem CMD500M Sensorchip mittels Amidkupplung

Geht man davon aus, dass eine Signalzunahme um 1000 RU bzw. 1000 μ RIU eine Beladung von 1 ng Protein/ mm^2 entspricht, so wurden bei einem $\Delta\mu$ RIU von 4238 μ RIU insgesamt ca. 4,238 ng/ mm^2 des 70S-Ribosoms immobilisiert.

Nach erfolgreicher Immobilisierung des 70S Ribosoms erfolgten die Bindungsstudien wie unter 1.1.1.1 beschrieben mit einer Analytkonzentration von 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Der Analyt wurde über einen Zeitraum von 2,5 min und einem Flow von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ injiziert. Nach einer fünfminütigen Dissoziationszeit wurde der Sensorchip mit 10 mM Glycinpuffer pH 3,0 schonend regeneriert, um für eine weitere Bindungskinetik zur Verfügung zu stehen. Eine Zusammenfassung aller Interaktionsanalysen mit dem 70S Ribosom aus *E. coli* ist in Abbildung 106 zu sehen.

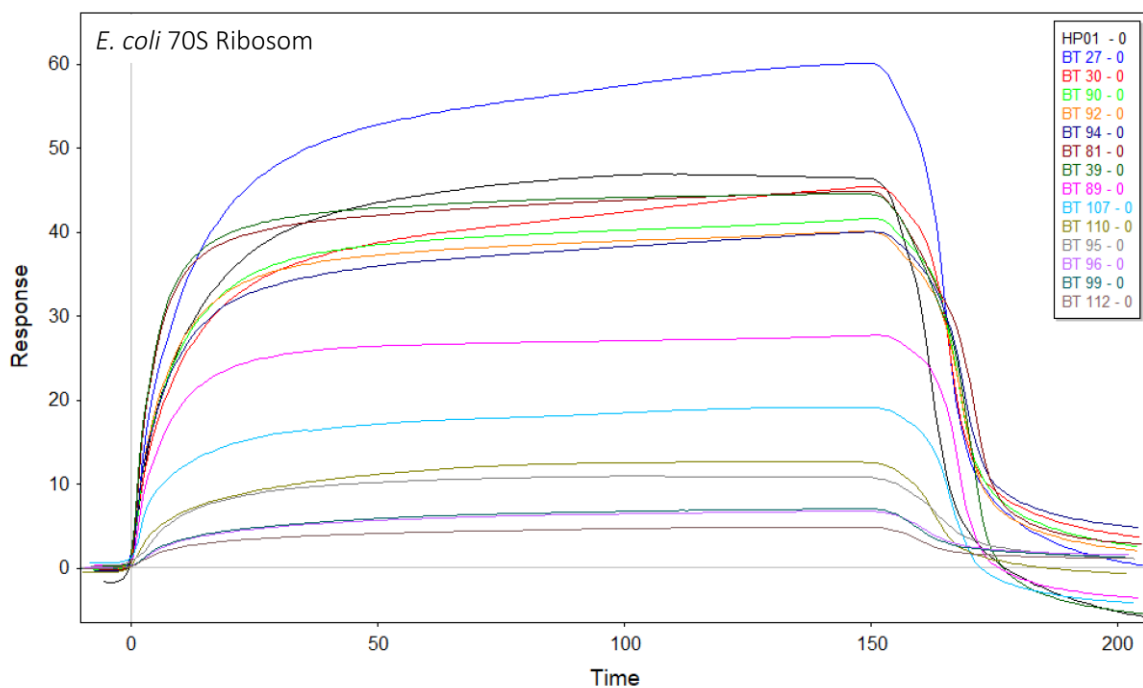


Abbildung 106: Overlay der Sensorgramme aller Derivate und der Leitstruktur HP01 aus den SPR-Versuchen mit immobilisiertem 70S Ribosom aus *E. coli*

Aus dieser ersten Darstellung wird deutlich, dass die getesteten Derivate sowie die Leitstruktur HP01 unterschiedliche Affinitäten und damit auch verschiedene K_D -Werte aufweisen. Die Assoziation zum Ribosom, ausgedrückt durch die Geschwindigkeitskonstante k_a , scheint bei allen Derivaten nahezu identisch schnell zu verlaufen. Dies wurde auch anhand der berechneten k_a -Werte, wie in Tabelle 59 dargestellt, deutlich. Die durchschnittlichen Werte für die Assoziation eines Ligand-Analyt-Komplexes liegen in einem Bereich von 10^3 bis $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Der über die Fittingsoftware *Scrubber™* ermittelte Wert lag für die hier durchgeführten Analysen bei 10^7 und scheint somit plausibel. Die K_D -Werte, welche nun als Maß für die Bindungsstärke zum 70S Ribosom angesehen werden können unterscheiden sich. Sie werden nun im Weiteren für die Gruppen „Kern-modifizierte Derivate“, „N-terminal-modifizierte Derivate“, „C-terminal-modifizierte Derivate“ und „C/N-terminal-modifizierte Derivate“ jeweils im Vergleich zu den kinetischen Parametern der Leitstruktur ins Verhältnis gesetzt.

Der K_D -Wert der Leitstruktur HP01 betrug für das 70S Ribosom von *E. coli* 1,12 nM. Dieser wurde nach Gleichung 8 berechnet. Der K_D -Wert von $[\text{RQ}][\text{R}^8]\text{HP01-NH}_2$ lag mit 1,3 nM in einem vergleichbaren

Bereich wie der der Leitstruktur. Im Vergleich zu diesen beiden Werten war der K_D -Wert für $[R][R^8]HP01$ mit 2,13 nM allerdings nahezu doppelt so hoch wie der von HP01.

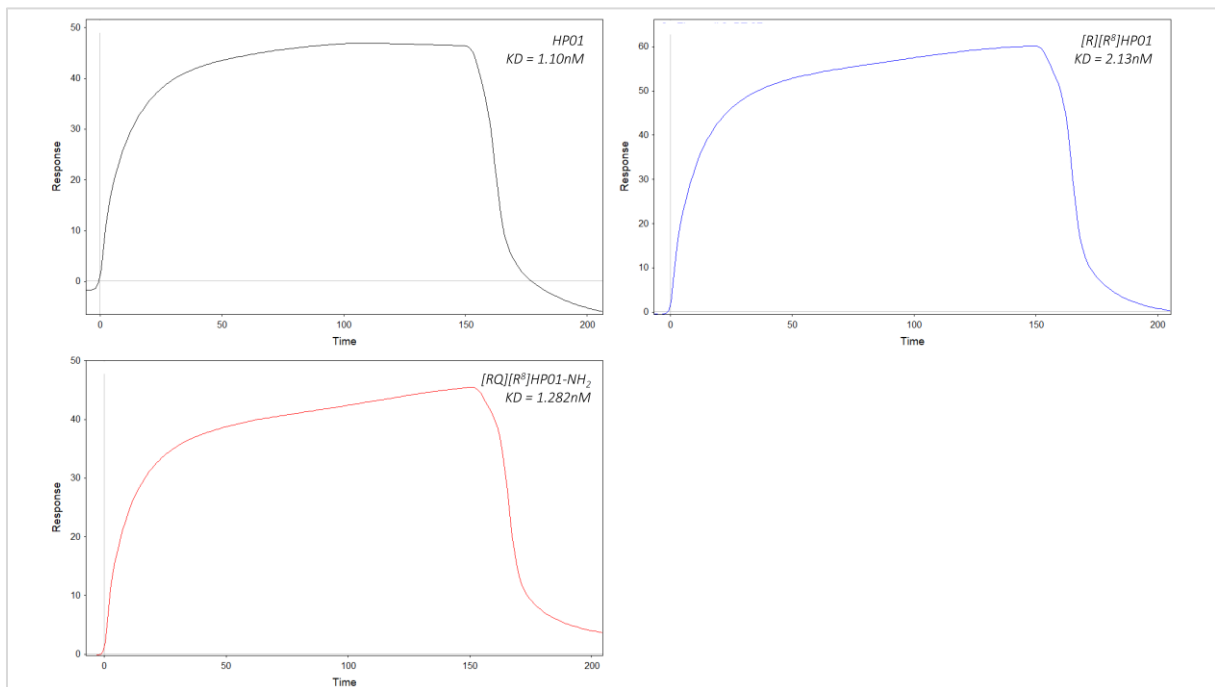


Abbildung 107: Interaktion der Leitstruktur HP01 und der Kern-modifizierten Derivate mit dem 70S Ribosom aus *E. coli*

Hieraus ließ sich schließen, dass eine einfache Substitution eines N-terminalen Arginins mit einer signifikant schlechteren Interaktion einhergeht. Die einzelnen Sensorgramme der Derivate sind Abbildung 107 zu entnehmen.

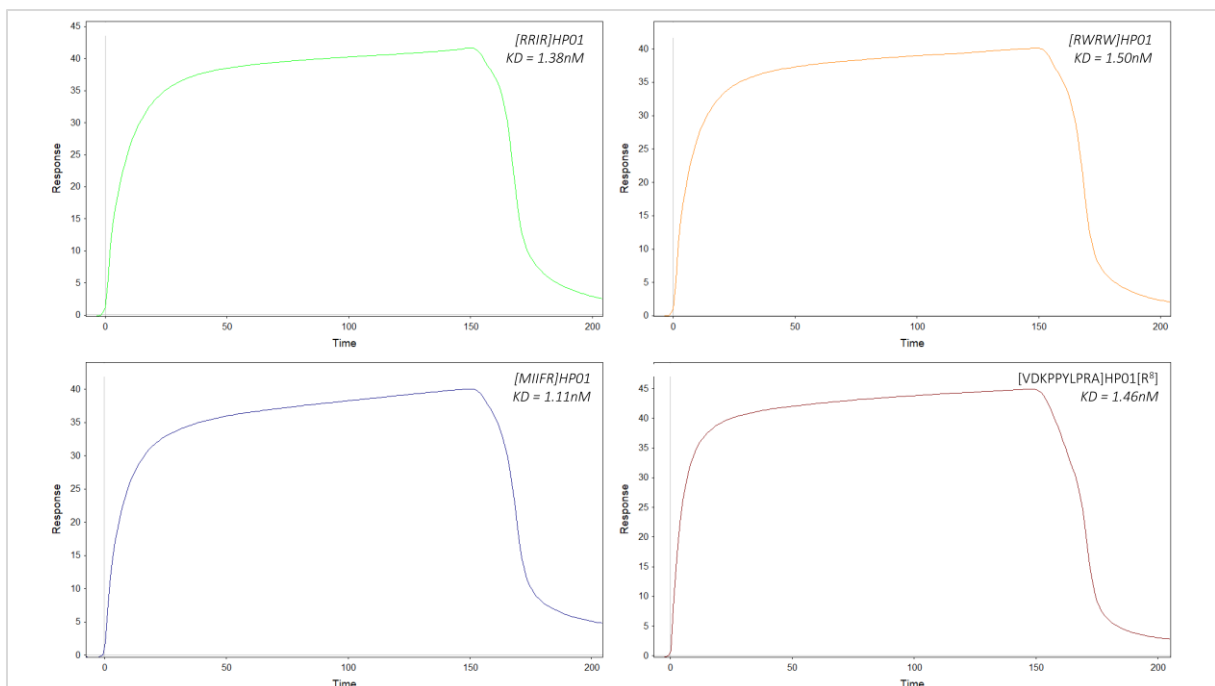


Abbildung 108: Sensorgramme der Interaktion der N-terminal modifizierten Derivate mit dem 70S-Ribosom aus *E. coli*

Im Vergleich der N-terminal-modifizierten Derivate mit der Leitstruktur zeigten sich weniger signifikante Unterschiede. Die K_D -Werte der Derivate [RRIR]HP01 (1,38 nM), [RWRW]HP01 (1,5 nM) und [VDKPPYLPR][R⁸]HP01 (1,46 nM) waren nur geringfügig erhöht gegenüber dem K_D -Wert der Leitstruktur. [MIIFR]HP01 hingegen zeigte mit einer Gleichgewichtskonstanten K_D von 1,11 nM einen nahezu identischen Wert. Aus diesen Ergebnissen konnte der Einfluss der N-terminalen Modifizierung auf die Bindungsstärke zwischen Ribosom und Peptidderivat abgeschätzt werden. Die eingeführte Änderung am N-Terminus mit dem CPP-Motiv MIIRF hatte offensichtlich keinen signifikanten Einfluss auf die Affinität zwischen Liganden und Analyt. Die Sensorgramme zur Interaktionsanalyse der N-terminal modifizierten Sequenzen sind in Abbildung 108 einzeln dargestellt.

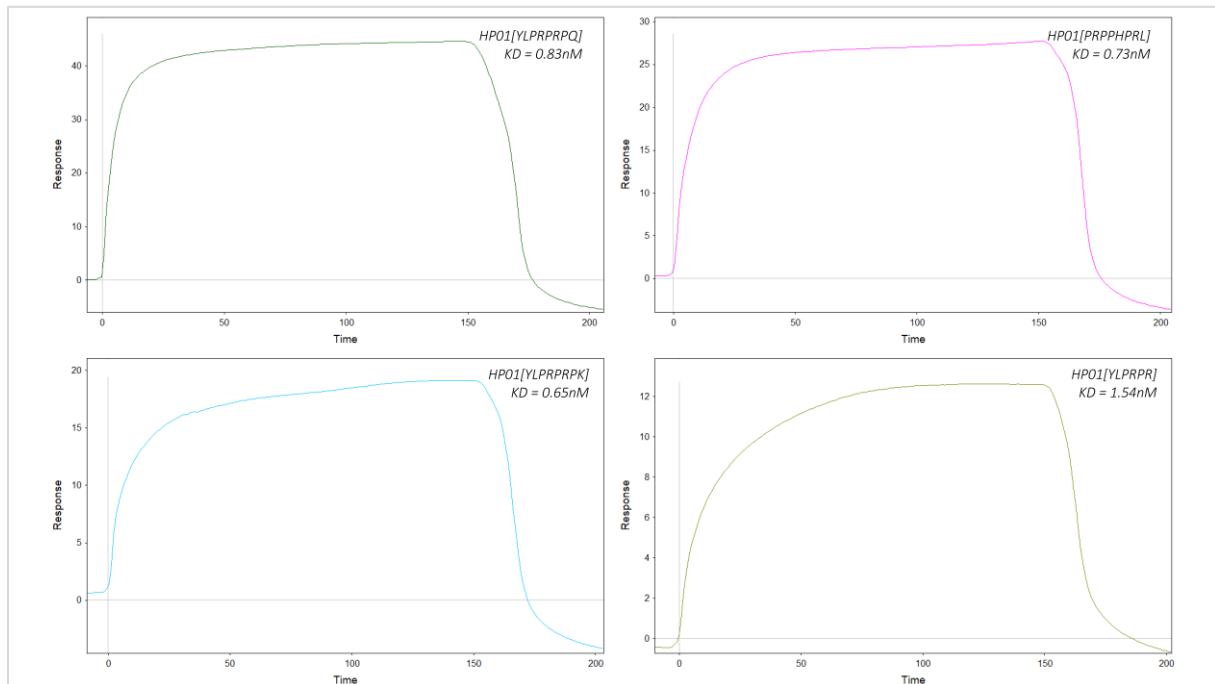


Abbildung 109: SPR-Sensorgramme zur Interaktionsanalyse der C-terminal modifizierten Derivate mit dem 70S-Ribosom aus *E. coli*

Im Folgenden wurde der Einfluss C-terminaler Sequenzänderungen auf die Bindungskinetik untersucht. Hier zeigten sich zum Teil größere Änderungen der kinetischen Parameter. Derivat HP01[YLPRPR] schnitt mit einem ermittelten K_D -Wert von 1,54 nM etwas schlechter ab als die Leitstruktur. Die anderen drei getesteten Derivate hingegen zeigten deutliche Verbesserungen im Bindungsverhalten. HP01[YLPRPRPQ] wies mit einer Gleichgewichtskonstante $K_D=0,83$ nM eine um ca. 30 % höherer Affinität zum 70S Ribosom von *E. coli* auf. Die Sequenzvariante HP01[PRPPHPRL] mit einem K_D -Wert von 0,73 nM eine fast 40 % stärkere Bindung. Die größte Affinitätssteigerung zeigte jedoch HP01[YLPRPRPK]. Hier konnte ein K_D -Wert von 0,65 nM nachgewiesen werden, was einer 56 %igen Steigerung der Affinität entsprach. Hieraus lässt sich somit ein erstes Fazit hinsichtlich des Einflusses der Termini ziehen. Die in dieser Arbeit gewählten C-terminalen Sequenzvarianten führten hinsichtlich der Affinität zum Ribosom zu einer signifikanten Steigerung. Die Einzelsensorgramme der C-terminalen Studie sind in Abbildung 109 dargestellt.

Wie bereits bei der Testung der antimikrobiellen Aktivität wurde in einer vierten Interaktionsstudie der Einfluss von Sequenzänderungen an beiden Termini untersucht. Hier zeigten drei der vier eingesetzten Derivate eine Affinitätssteigerung zum Ribosom aus *E. coli*. Für die Sequenz [RWRW]HP01[PRPPHPRL] setzte sich der bereits in der N-terminalen Modifizierung mit [RWRW] beobachtete Trend zu einer schwächeren Affinität zum Ribosom weiter durch. Hier ist der K_D -Wert mit 1,26 nM besser als der des Derivates [RWRW]HP01, dennoch zeigt sich auch hier eine Verringerung der Affinität zum Ribosom von ca. 10 % verglichen mit der Leitstruktur.

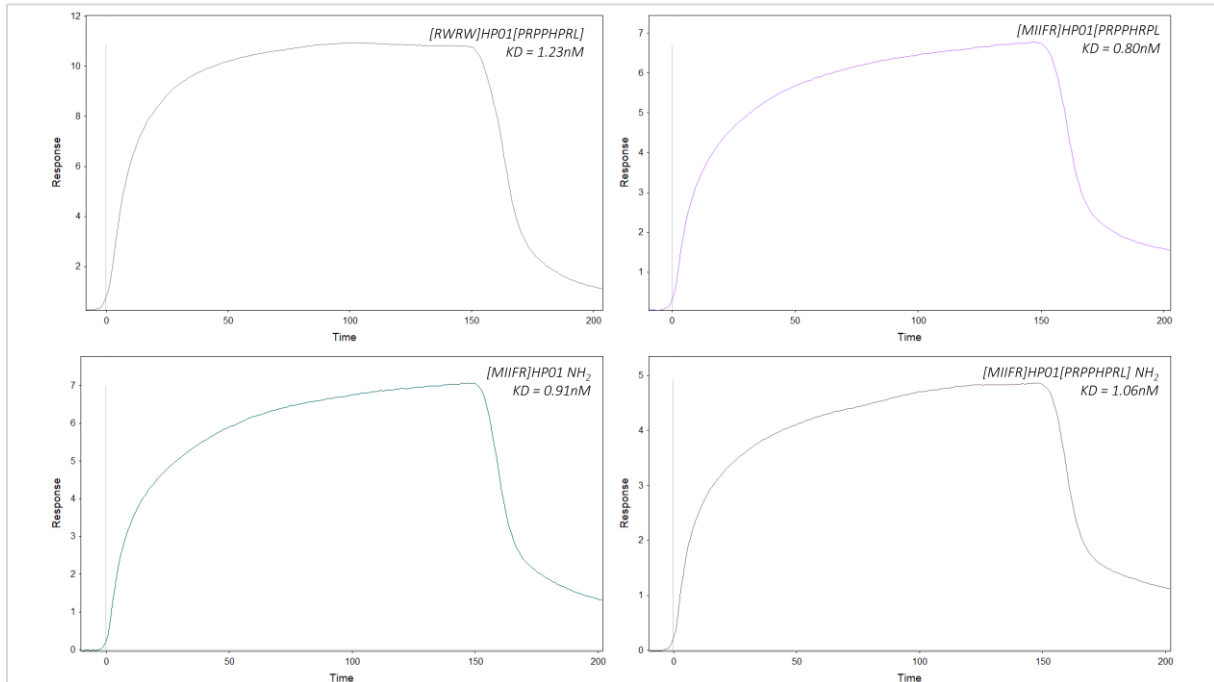


Abbildung 110: Interaktion der N-/C-terminal modifizierten Derivate mit dem auf einem CMD500M-Chip immobilisierten 70S-Ribosom aus *E. coli*

Wie schon durch Anfügen des CPP-Motives MIIFR in der vorangegangenen Studie zeigten die Derivate mit diesem Motiv, verglichen mit der Leitsubstanz HP01, eine stärkere Affinität zum Ribosom. Das Zusammenfügen dieser beiden Modifikationen führte sowohl für [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] mit einer K_D von 0,81 nM als auch für dessen amidierte Sequenzvariante [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂ zu einer ca. 30 % stärkeren Bindungsaffinität. Der K_D -Wert für die amidierte N-terminale Variante [MIIFR]HP01-NH₂ konnte eine Steigerung um 20 % erzielt werden. Hieraus konnte auch geschlossen werden, dass je nach Sequenz eine Amidierung des C-Terminus einen positiven Einfluss auch die Wechselwirkungen mit dem Ribosomen nach sich ziehen kann. Die Sensorgramme der Interaktionsanalytik sind in Abbildung 110 grafisch dargestellt.

In der nachfolgenden Tabelle sind alle wichtigen ermittelten Parameter der Bindungsstudie aufgelistet. Zur Berechnung der Werte wurde ebenfalls das Softwaretool *Scrubber™* genutzt. Die Berechnungsgrundlage bildet hier wie unter 1.1.1.1 beschrieben das Langmuir-Modell mit einer einfachen 1:1 Bindungskinetik. Alle genutzten Formeln zur Bestimmung der Parameter sind ebenfalls in diesem Abschnitt erläutert.

Tabelle 59: Kinetische Parameter zu Interaktionsanalyse der Derivate mit dem 70S Ribosom aus *E. coli*

Derivat	Stoffmenge [nM]	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	Rmax [RU]	K_D [nM]	$t_{1/2}$ [s]
BT 1 HP01	32,18	1,00E+07	1,12E-02	44,57	1,116	62,10
BT 27 [R][R ⁸]HP01	28,45	1,00E+07	2,13E-02	54,07	2,127	32,59
BT 30 [RQ][R ⁸]HP01-NH ₂	25,50	1,00E+07	1,28E-02	39,80	1,280	54,15
BT 90 [RRIR]HP01	20,12	1,00E+07	1,38E-02	40,42	1,382	50,17
BT 92 [RWRW]HP01	18,87	1,00E+07	1,50E-02	39,54	1,500	46,21
BT 94 [MIIFR]HP01	19,15	1,00E+07	1,11E-02	37,72	1,105	62,72
BT 81 [VDKPPYLPR][R ⁸]HP01	15,13	1,00E+07	1,46E-02	45,00	1,459	47,50
BT 39 HP01[YPRPRPQ]	15,79	1,00E+07	8,30E-03	46,07	0,830	83,47
BT 89 HP01[PRPPHPRL]	15,79	1,00E+07	7,28E-03	28,16	0,728	95,24
BT 107 HP01[YLPRPRPK]	17,81	1,00E+07	6,50E-03	17,82	0,650	106,60
BT 110 HP01[YLPRPR]	16,25	1,00E+07	1,54E-02	11,06	1,544	44,90
BT 95 [RWRW]HP01[PRPPHPRL]	11,99	1,00E+07	1,26E-02	10,45	1,257	55,15
BT 96 [MIIRF]HP01[PRPPHPRL]	12,10	1,00E+07	8,05E-03	5,60	0,805	86,14
BT 99 [MIIRF]HP01-NH ₂	18,78	1,00E+07	9,09E-03	5,79	0,909	76,28
BT 112 [MIIRF]HP01[PRPPHPRL]-NH ₂	11,95	1,00E+07	8,25E-03	4,13	0,825	83,98

Zur Beurteilung signifikanter Unterschiede in den Bindungskonstanten der einzelnen Peptide wurde für die Leitstruktur HP01 sowie der vier interessantesten Derivate eine Mehrfachbestimmung mit beiden Ribosomen durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung der K_D -Werte für das 70S Ribosom aus *E. coli* sind in nachfolgender Tabelle 60 aufgelistet.

Tabelle 60: Ermittelte Werte zur Bestimmung der Standardabweichung der Bindungskonstanten mit n=3

Derivat	Stoffmenge [nM]	MW _{ka} [M ⁻¹ s ⁻¹]	MW _{kd} [s ⁻¹]	MW _{Rmax} [RU]	MW _{KD} [nM]
BT 1 HP01	32,18	1,00E+07	1,15E-02	52,25	1,149 ± 3%
BT 89 HP01[PRPPHPRL]	15,79	1,00E+07	6,82E-03	14,35	0,684 ± 10%
BT 107 HP01[YLPRPRPK]	17,81	1,00E+07	6,63E-03	15,90	0,663 ± 7%
BT 96 [MIIRF]HP01[PRPPHPRL]	12,10	1,00E+07	8,76E-03	7,40	0,876 ± 7%
BT 112 [MIIRF]HP01[PRPPHPRL]NH ₂	11,95	1,00E+07	9,22E-03	6,43	0,922 ± 8%

4.4.2 SPR-Studien am 70S Ribosom aus *Thermus thermophilus*

In einer zweiten Interaktionsanalyse sollte die Affinität zum Ribosom aus dem gramnegativen Bakterium *Thermus thermophilus* untersucht werden. Durch diese Studien sollte gezeigt werden, dass die neuen PrAMPs nicht nur an *E. coli* Ribosom binden können, sondern diese Interaktion auch mit anderen gramnegativen bakteriellen Ribosomen möglich ist. Erste Rückschlüsse auf den *Mode-of-Action* wären damit möglich, weil das 70S Ribosom aus *T. thermophilus* insbesondere in der Proteinkristallographie als Modellstruktur für Affinitätsstudien gut etabliert ist (Graf et al. 2017).

Die Immobilisierung des Ribosoms erfolgte analog zum 70S Ribosom aus *E. coli* über eine kovalente Bindung mittels EDC/NHS-Kopplung. Berücksichtigt man auch hier die Faustregel, dass 1 ng Protein/mm² einer Zunahme von 1000 RU bzw. 1000 μ RIU entsprechen, so wurden bei einem $\Delta\mu$ RIU= 5420 ca. 5,420 ng/mm² Ligand immobilisiert.

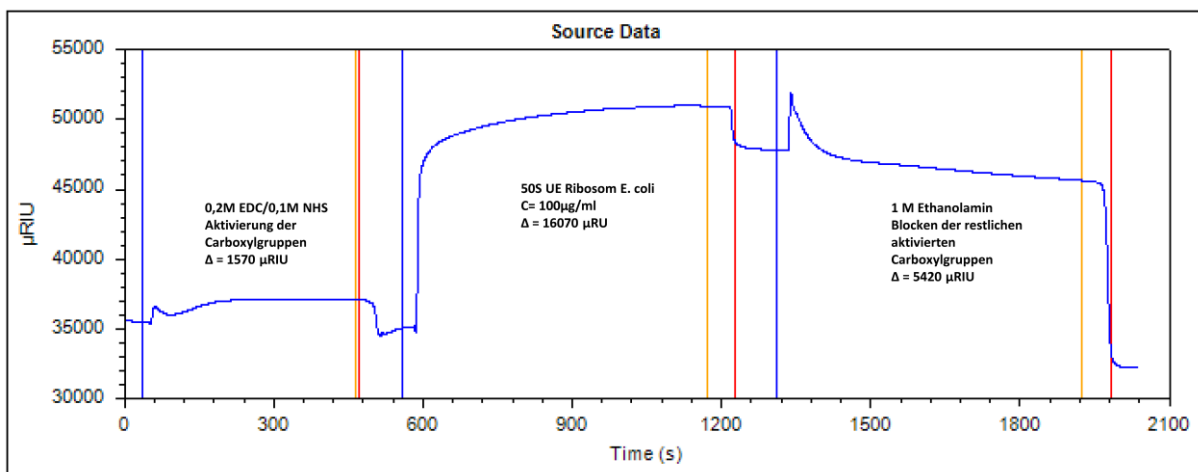


Abbildung 111: Immobilisierung des 70S-Ribosomen aus *T. thermophilus* auf einem CMD500M Sensorchip

Nach gelungener Immobilisierung des 70S Ribosoms erfolgten auch hier Bindungsstudien wie unter 1.1.1.1 beschrieben mit einer Analytkonzentration von 125 μ g/mL, die über einen Zeitraum von 2,5 min und einem Flow von 20 μ L/min injiziert wurde. Nach fünf-minütiger Dissoziationszeit wurde der Sensorchip mit 10 mM Glycinpuffer pH 3,0 schonend regeneriert, um für eine weitere Bindungskinetik zur Verfügung zu stehen. Die Überlagerung aller Interaktionsanalysen mit dem 70S Ribosom aus *T. thermophilus* ist in Abbildung 112 zusehen.

Wie schon die Bindungsstudien mit dem Ribosom aus *E. coli* zeigten, so wurde auch bei *T. thermophilus* deutlich, dass die Derivate und auch die Leitstruktur unterschiedliche Affinitäten zu diesen Ribosomen aufweisen. Auch für das Ribosom aus *T. thermophilus* werden nun im Weiteren die K_D -Werte in Analogie zu *E. coli* mit der Leitstruktur verglichen.

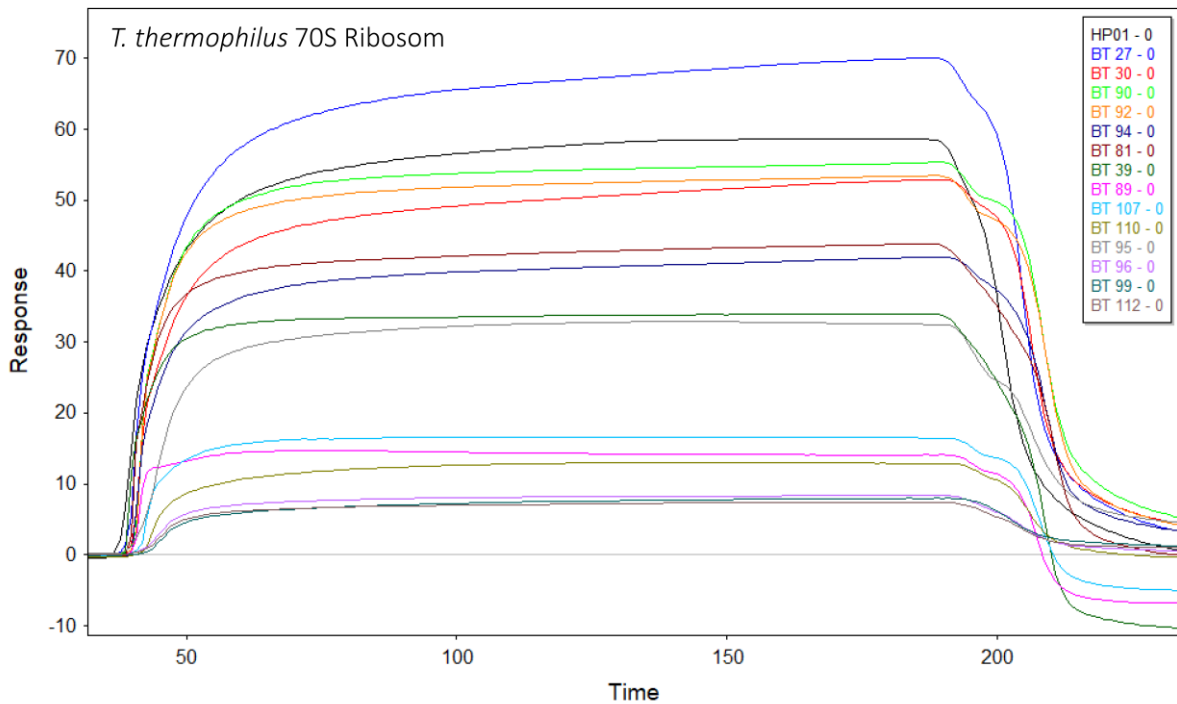


Abbildung 112: Overlay der Sensorgramme aller Derivate und der Leitstruktur HP01 aus den SPR-Versuchen mit immobilisiertem 70S-Ribosom aus *T. thermophilus*

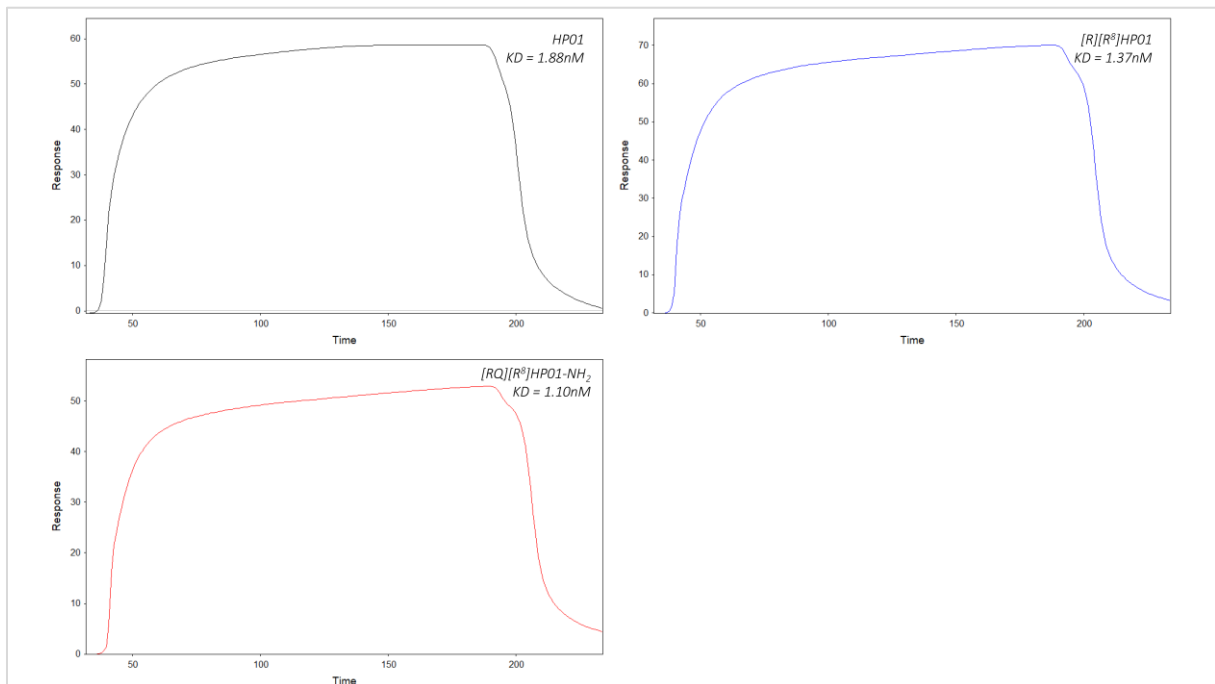


Abbildung 113: Interaktion der Leitstruktur HP01 und der Core-modifizierten Derivate mit dem 70S-Ribosom aus *T. thermophilus*

Die Leitstruktur HP01 zeigt im Vergleich zum 70S Ribosom aus *E. coli* an der *T. thermophilus* Spezies eine geringere Affinität. Mit 1,88 nM ist die Bindungsaffinität um knapp 70 % schwächer, allerdings spiegelt dieser K_D -Wert trotz allem eine hohe Affinität wider. Für die Gruppe der Kern-modifizierten Derivate

war für beide Sequenzvarianten eine stärkere Affinität zum Liganden nachweisbar. [R][R⁸]HP01 besaß mit einem K_D-Wert von 1,37 nM eine ca. 30 % stärkere Affinität als die Leitsubstanz, [RQ][R⁸]HP01 mit 1,1 nM sogar eine 40 %ige Steigerung verglichen mit HP01. Die Einzelsensorgramme der Interaktionsanalysen sind in Abbildung 113 dargestellt.

Für die Gruppe mit N-terminaler Sequenzänderung zeigten drei der vier Derivate deutlich verbesserte Affinitäten zum Ribosom. Das N-terminale Anfügen der Sequenzen für zellpenetrierende Peptide zeigte hier eine signifikante Verbesserung der Bindungsaffinität K_D. Das Derivat [RRIR]HP01 konnte mit einem K_D-Wert von 1,02 nM innerhalb dieser Gruppe die stärkste Bindung zum Ribosom nachweisen. Dieser Wert entspricht einer 45 %igen Affinitätssteigerung. Die Derivate [RWRW]HP01 und [MIIRF]HP01 weisen nahezu identische K_D-Werte mit 1,1 nM auf. Verglichen damit, wies die Sequenzvariante [VDKPPYLPR][R⁸] HP01 mit einer Gleichgewichtskonstanten K_D von 1,92 nM die schwächste Bindung innerhalb der gesamten *T. thermophilus*-Studie zum Ribosom auf. Dies geht auch aus der Abbildung der Einzelsensorgramm hervor (Abbildung 114). Interessanterweise unterscheiden sich diese Ergebnisse von denen des 70S Ribosoms aus *E. coli*. Hier wirkte sich das N-terminale Anfügen im Allgemeinen auf die Stärke der Bindungsaffinität abträglich aus.

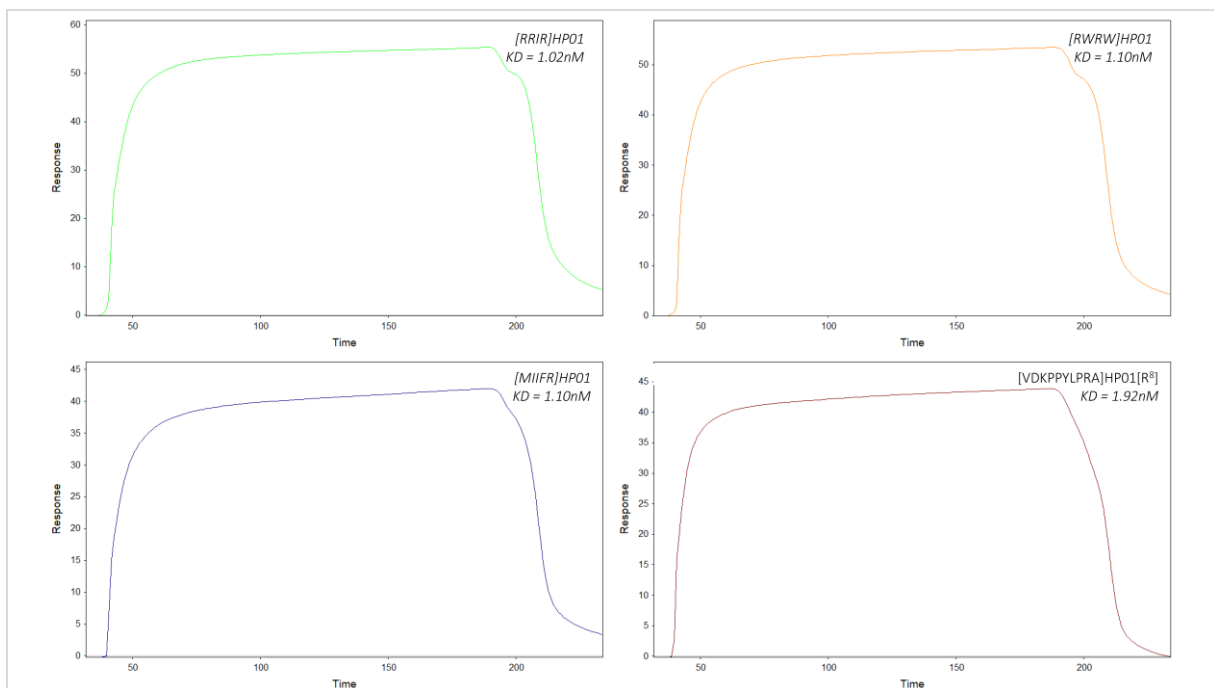


Abbildung 114: Sensorgramme der Interaktion N-terminal-modifizierter Derivate mit dem 70S Ribosom aus *T. thermophilus*

In der Gruppe der C-terminalen Sequenzänderungen zeigte sich ein vergleichbar positives Bild wie schon zuvor bei *E. coli*, jedoch mit einer noch signifikanteren Steigerung der Affinität. Hier waren alle vier vermessenen Derivate zum Teil eindeutig effizienter wie die Leitsubstanz. HP01[YLPRPR] zeigt mit einem K_D-Wert von 1,42 nM eine um 25 % verbesserte Bindungsaffinität verglichen mit HP01. Signifikant steigern konnten die drei anderen C-terminal modifizierten Derivate ihre Bindung zum Ribosom. So wies HP01[YLPRPRPQ] mit 0,43 nM eine Zunahme der Bindungsstärke um fast 80 % auf, HP01[YLPRPRPK] mit 0,34 nM und einer Zunahme von etwas mehr als 80 % eine vergleichbare Steigerung.

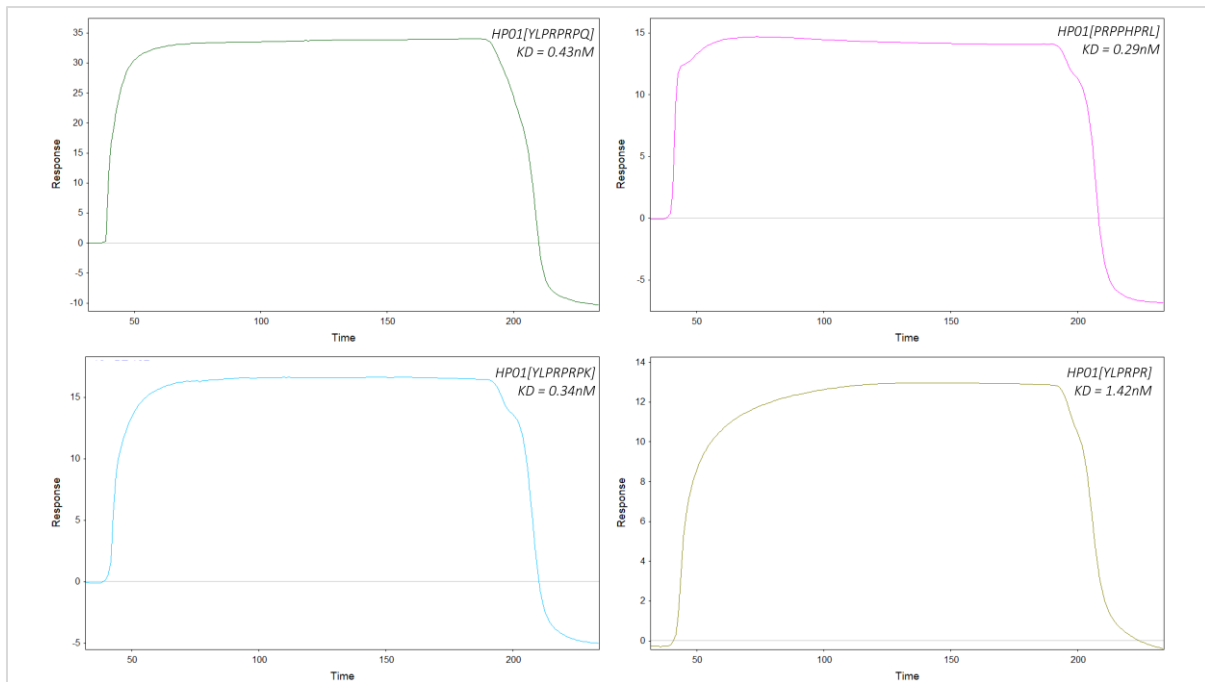


Abbildung 115: Interaktion C-terminal-modifizierter Derivate mit dem auf einem CMD500M-Chip immobilisierten 70S Ribosom aus *T. thermophilus*

Die stärkste Affinität zum Ribosom innerhalb der *Thermophilus*-Studie zeigte die Sequenzvariante HPO1[PRPPHPRL] mit einem K_D -Wert von 0,29 nM. Dieser Wert entspricht einer Affinitätszunahme von 85%. Wie auch schon innerhalb der *E. coli*-Studie zeigte sich, dass sich durch eine entsprechende Änderung der C-terminalen Region eine zum Teil deutlich stärkere Affinität zum Ribosom erzeugen ließ. Die zugehörigen Einzelsensorgramme der Bindungskinetiken sind in Abbildung 115 aufgezeigt.

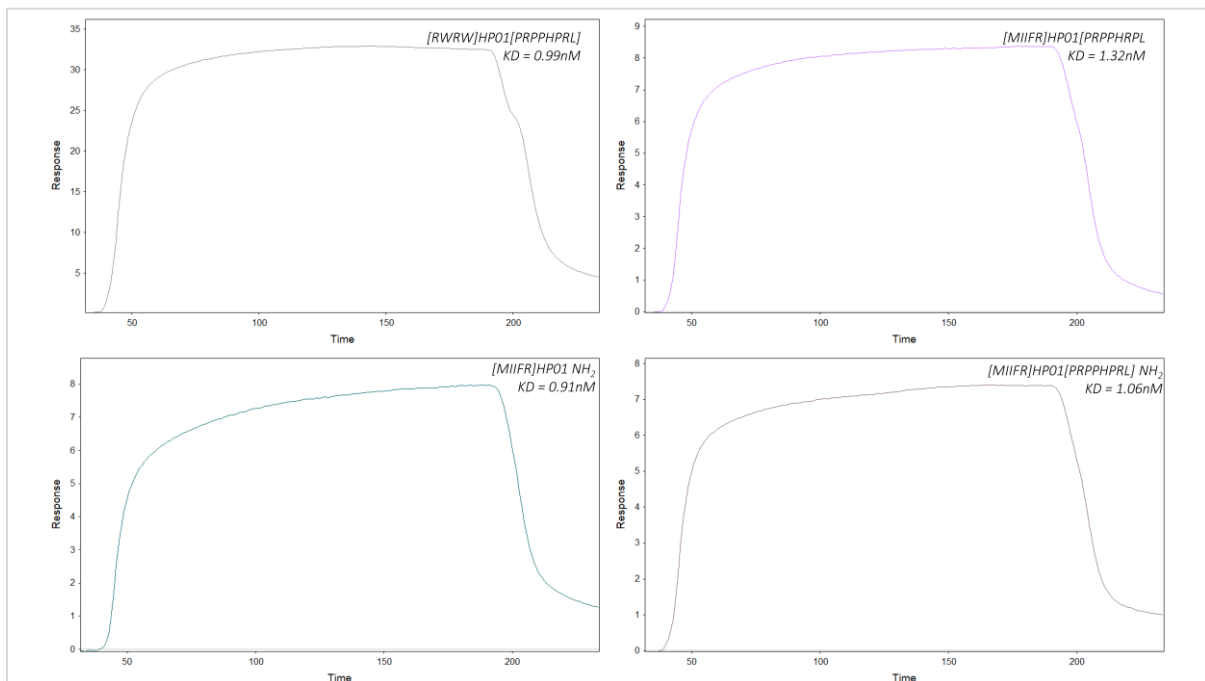


Abbildung 116: SPR-Sensorgramme zur Interaktionsanalyse N/C-terminal-modifizierter Derivate mit dem 70S Ribosom aus *T. thermophilus*

In der Gruppe der C/N-terminal veränderten Sequenzvarianten zeigten sich in allen vier Derivaten stärkere Bindungsaffinitäten verglichen mit der Leitstruktur. Derivat [MIIRF]HP01[PRPPHPRL] zeigte mit 1,32 nM innerhalb dieser Gruppe die geringste Bindungsaffinität zum 70S Ribosom, allerdings war diese noch um 3 % stärker als diejenige von HP01. Die amidierte Sequenz [MIIRF]HP01[PRPPHPRL]-NH₂ wies mit einem K_D-Wert von 1,06 nM eine um 45 % stärker Bindung zum Ribosom auf, [RWRW]HP01[PRPPHPRL] mit der Dissoziationskonstante K_D von 1,00 nM eine vergleichbare Änderung in der Bindungsaffinität. Die stärkste Wechselwirkung mit dem Ribosom zeigte die amidierte Sequenzfolge [MIIRF]HP01-NH₂. Ihre Dissoziationskonstante konnte mit 0,91 nM bestimmt werden, was einer Zunahme von mehr als 50 % entsprach. Innerhalb dieser Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass sich im Fall des 70S Ribosoms aus *T. thermophilus* eine Amidierung des C-Terminus durchwegs in einer Verbesserung der Wechselwirkung zwischen Liganden und Analyt widerspiegelte. Die Verläufe der Bindungskinetiken der C/N-terminal modifizierten Derivate sind in Abbildung 116 dargestellt.

Analog zur *E. coli*-Studie wurden auch hier Berechnungsgrundlagen aus 1.1.1.1 für ein Langmuir-Modell genutzt.

Tabelle 61: Kinetischen Bindungsparamter zur Interaktionsstudie der Peptidderivate mit dem 70S Ribosom aus *T. thermophilus*

Derivat		Stoffmenge [nM]	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k _d [s ⁻¹]	Rmax [RU]	K _D [nM]	t _½ [s]
BT 1	HP01	32,18	1,00E+07	0,01881	58,71	1,881	36,85
BT 27	[R][R ⁸]HP01	28,45	1,00E+07	0,01367	67,72	1,367	50,70
BT 30	[RQ][R ⁸]HP01-NH ₂	25,50	1,00E+07	0,01098	51,03	1,098	63,11
BT 90	[RRIR]HP01	20,12	1,00E+07	1,02E-02	57,31	1,022	67,85
BT 92	[RWRW]HP01	18,87	1,00E+07	1,10E-02	55,20	1,099	63,10
BT 94	[MIIFR]HP01	19,15	1,00E+07	1,10E-02	41,95	1,103	62,84
BT 81	[VDKPPYLPR][R ⁸]HP01	15,13	1,00E+07	1,92E-02	45,12	1,918	36,13
BT 39	HP01[YPRPRPQ]	15,79	1,00E+07	4,28E-03	36,50	0,428	162,00
BT 89	HP01[PRPPHPRL]	15,79	1,00E+07	2,91E-03	16,12	0,291	238,30
BT 107	HP01[YLPRPRPK]	17,81	1,00E+07	3,40E-03	17,86	0,340	204,20
BT 110	HP01[YLPRPR]	16,25	1,00E+07	1,42E-02	12,76	1,421	48,79
BT 95	[RWRW]HP01[PRPPHPRL]	11,99	1,00E+07	9,95E-03	33,68	0,995	69,68
BT 96	[MIIRF]HP01[PRPPHPRL]	12,10	1,00E+07	1,32E-02	8,31	1,320	52,53
BT 99	[MIIRF]HP01-NH ₂	18,78	1,00E+07	9,08E-03	7,16	0,908	76,35
BT 112	[MIIRF]HP01[PRPPHPRL]-NH ₂	11,95	1,00E+07	1,06E-02	7,22	1,060	65,38

Beide Ribosomenstudien zeigten für alle Derivate und auch für die unmodifizierte Leitstruktur sehr gute Bindungskinetiken und Dissoziationskonstanten, die für das *E. coli* 70S Ribosom in einem Bereich von 2,1 nM – 0,65 nM und für das *T. thermophilus* 70S-Ribosom von 1,9 nM bis 0,29 nM bestimmt wurden. K_D -Werte in diesen Bereichen verweisen auf eine starke Affinität zum Liganden. Im Allgemeinen finden sich K_D -Werte zwischen 10^{-3} und 10^{-12} M (Schasfoort 2017). Vergleiche zu anderen PrAMPs anhand von Dissoziationskonstanten sind derzeit noch nicht möglich, da bisher keine Untersuchungen von Bindungskinetiken zwischen prolinreichen antimikrobiellen Peptiden und 70S Ribosomen mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie publiziert wurden.

Vergleicht man allerdings die K_D -Werte mit den Bindungskonstanten von klassischen Antibiotika z.B. Chloramphenicol, so wird das therapeutische Potential der PrAMPs, insbesondere der Leitstruktur HP01 aus *Hirudo verbana* sowie deren Derivate deutlich. Die Dissoziationskonstante K_D für das 70S Ribosom aus *E. coli* findet sich für unterschiedliche Chloramphenicolderivate in einem Bereich von 4,3-10 μ M und liegt somit um den Faktor 10^3 oberhalb der von uns determinierten K_D -Werte (Tereshchenkov et al. 2016). Studien der Arbeitsgruppe um Svetlos konnte für Chloramphenicol und das Ribosom aus *T. thermophilus* eine Dissoziationskonstante von 4,9 nM durch einen *Equilibrium-Binding-Assay* mit radioaktivmarkierten 14 C-Antibiotikaderivaten nachweisen (Svetlov et al. 2017). Auch hier zeigten unsere Derivate im Vergleich eine zum Teil deutlich verbesserte Affinität. Die Tatsache, dass es sich bei Chloramphenicol um ein bereits zugelassenes Antibiotikum handelt, kann das enorme Potential unserer PrAMPs untermauern.

Wie schon für das *E. coli*-Ribosom wurden auch hier zur Beurteilung der signifikanten Unterschiede in den Bindungskonstanten eine Mehrfachbestimmung durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung der K_D -Werte sind in nachfolgender Tabelle 62 aufgelistet.

Tabelle 62: Statistische Parameter der Bindungskonstanten K_D für *T. thermophilus*

Derivat	Stoffmenge [nM]	MW_{ka} [$M^{-1}s^{-1}$]	MW_{kd} [s^{-1}]	MW_{Rmax} [RU]	MW_{KD} [nM]
BT 1 HP01	32,18	1,00E+07	1,92E-02	64,58	1,918 ± 5%
BT 89 HP01[PRPPHPRL]	15,79	1,00E+07	3,22E-03	17,73	0,322 ± 4%
BT 107 HP01[YLPRPRPK]	17,81	1,00E+07	3,62E-03	19,65	0,361 ± 3%
BT 96 [MIIRF]HP01[PRPPHPRL]	12,10	1,00E+07	1,26E-02	9,15	1,258 ± 6%
BT 112 [MIIRF]HP01[PRPPHPRL]NH ₂	11,95	1,00E+07	1,09E-02	7,94	1,091 ± 3%

Um eine Aussage bzgl. Spezifität der Wechselwirkungen von Leitstruktur und Derivaten mit den bakteriellen Ribosomen treffen zu können, wurden zusätzlich Sequenzen überprüft, die keine spezifische Interaktion mit den ribosomalen Strukturen aufweisen sollten.

Hierzu wurden vier Sequenzen kern-modifizierter, nicht wirksamer Derivate ausgewählt, die aufgrund fehlender bzw. nur sehr geringer antimikrobieller Wirkung innerhalb der Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen nicht weiterverfolgt wurden. Die zugehörigen Aminosäuresequenzen dieser Derivate sind in Tabelle 70 im Anhang gelistet.

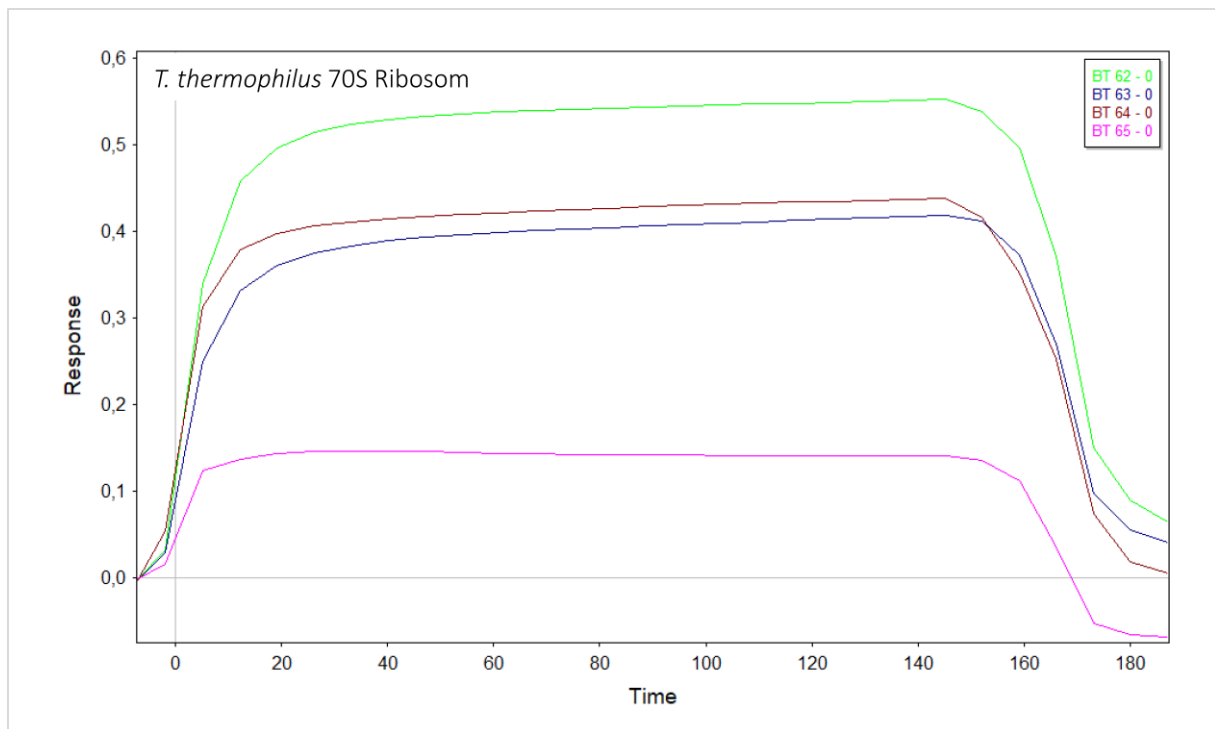


Abbildung 117: Interaktionsanalysen von Derivaten mit unspezifischer Bindung zum Ribosom

In den Bindungsstudien dieser Peptide zeigten sich deutlich höhere K_D -Werte. Verglichen mit der Leitstruktur und deren optimierten Derivate waren die Bindungskonstanten für drei der Peptide im dreistelligen μM -Bereich zu finden, für das Derivat BT 65 sogar im einstelligen mM -Bereich.

Tabelle 63: Parameter zu Wechselwirkungen unspezifischer Sequenzen mit ribosomalen Strukturen

Derivat	Stoffmenge [nM]	k_a [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	Rmax [RU]	K_D [mM]	$t_{1/2}$ [s]
BT 62 [D ²][K ³][Y ⁶][L ⁷]HP01	26,15	1,00E+10	6,63E+03	0,73	0,662	1,05
BT 63 [E ²][K ³][Y ⁶][L ⁷]HP01	26,13	9,26E+09	7,37E+03	0,69	0,796	0,94
BT 64 [E ²][K ³][Y ⁶]HP01	26,45	9,77E+09	7,50E+03	0,53	0,768	0,92
BT 65 [D ²][K ³][YL ⁶]HP01	22,42	6,62E+09	10,30E+03	0,25	1,554	0,74

Die Ergebnisse spiegeln den Anteil unspezifischer Wechselwirkungen mit ribosomalen Strukturen wider, so dass für die Bindungskonstanten der innerhalb dieser Arbeit entwickelten PrAMPs im unteren nM-Bereich von spezifischen Wechselwirkungen mit den Ribosomen ausgegangen werden kann.

4.4.3 Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur Überprüfung der Aufnahme von PrAMPs in gramnegative Zellen, die eine Aussage hinsichtlich möglicher Targets der Leitstruktur sowie deren Derivate leisten könnte, wurde die hochauflösende, konfokale Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Bakterienzellen des Stammes *E. coli* BL 21 wurden mit zuvor fluoreszenzmarkierten Peptiden inkubiert, fixiert und anschließend mit einem Zeiss LSM700 Confocal Microscope untersucht. Die Fluoreszenz des Farbstoffes Fluorescein wurde mit einem 488 nm Laser angeregt und über einen *variable secondary dichroic (VSD) Beamsplitter* detektiert. Hauptaugenmerk

dieses Ergebnisteils lag auf der Darstellung der Derivate mit einer hohen antimikrobiellen Aktivität, die zudem ein geringes zytotoxisches Potential aufwiesen. Dies waren die Derivate HPO1[PRPPHRPL] (BT 89), [MIIFR]HPO1[PRPPHRPL] (BT 96), HPO1[YLPRPR] (BT 110) und [MIIFR]HPO1[PRPPHRPL]-NH₂ (BT 112).

Wie in Abbildung 118 links ersichtlich, ist die zelluläre Aufnahme von FITC-HPO1 in die Bakterienzellen nach 8 h Inkubation nur sehr schwach sichtbar. Vereinzelt konnten leicht fluoreszierende Bakterienzellen (rote Pfeile) detektiert werden, was trotz einer 7,5-fachen Stoffmenge im Vergleich zur Testung der antimikrobiellen Aktivität für eine schlechte zelluläre Aufnahmen der Leitstruktur ins Innere der Zelle spricht. Allerdings befanden sich die fluoreszenzmarkierten Moleküle im Inneren intakter Bakterienzellen. Dies könnte gegen einen unerwünschten membranolytischen Effekt, ausgelöst durch die Leitstruktur, sprechen und somit eher auf eine spezifische Bindung an ein intrazelluläres Target hinweisen.

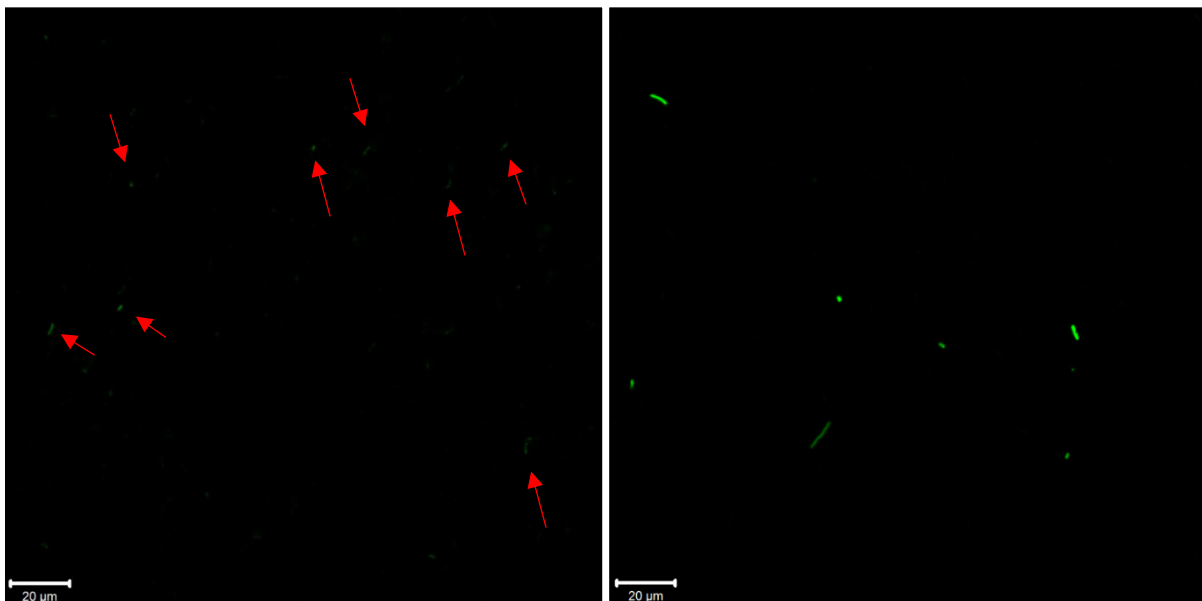


Abbildung 118: CLSM-Aufnahmen von *E. coli* BL 21-Zellen nach 8-stündiger Inkubation: Links: FITC-HPO1(BT 1, $c=154,5$ nM), rot markiert die vereinzelt, leichte Fluoreszenz durch FITC in den Bakterienzellen, Rechts: FITC-HPO1[PRPPHRPL] (BT 89, $c=18,8$ nM), einzelne stark fluoreszierende Bakterienzellen

Die C-terminale Modifizierung der Leitstruktur mit der Sequenz [PRPPHRPL] zeigte bereits im Mikrodilutionsassay eine deutliche Verbesserung des Dosis-Wirkungs-Profiles sowie eine signifikante Steigerung des IC₅₀-Wertes auf 1,95 nM im Vergleich zu einem IC₅₀-Wert von 20,6 nM der Leitsubstanz HPO1 gegenüber *E. coli* BL21. In den CLSM-Untersuchungen konnte für diese Derivat, bezogen auf die Leitstruktur, eine Steigerung der zellulären Aufnahme des FITC-markierten Peptidderivats HPO1[PRPPHRPL] erreicht werden. Dies wird in Abbildung 118 rechts durch eine deutlich gesteigerte Fluoreszenz einzelner Zellen sichtbar. Die hier eingesetzte Stoffmenge von FITC-HPO1[PRPPHRPL] lag mit 18,8 nM in etwa um das 10-fache höher als der im Mikrodilutionstest ermittelte IC₅₀-Wert gegenüber dem Bakterienstamm *E. coli* BL21. Auch hier zeigte sich deutlich die intrazelluläre Lokalisation der fluoreszierenden Moleküle innerhalb intakter Bakterienzellen. Dieser Befund lässt ebenfalls auf ein spezifisches Target im Inneren der Zelle schließen.

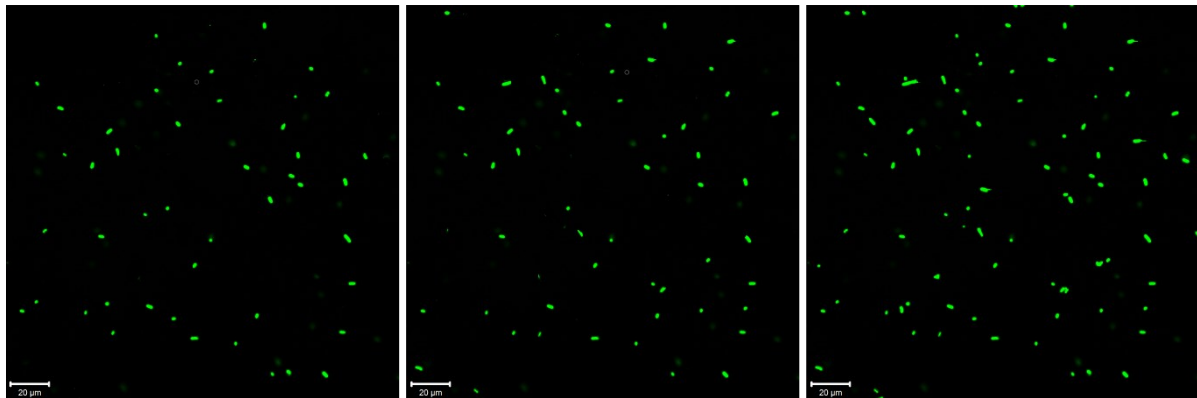


Abbildung 119: CLSM-Aufnahme von *E. coli* BL21- Zellen nach 8-stündiger Inkubation, Links: FITC-[MIIFR]HP01[PRPPHPRL] (BT 96, $c=54,4$ nM), deutlich fluoreszierende Bakterienzellen; Mitte: FITC-HP01[YLPRPR] (BT 110, $c=76,2$ nM), ebenfalls stark fluoreszierend und Rechts: FITC-[MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂ (BT 112, $c=54,3$ nM), am stärksten fluoreszierende Bakterienzellen

Desweiteren wurden die anderen drei vielversprechenden Derivate [MIIFR]HP01[PRPPHPRL], dessen amidierter Form [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂ und die C-terminal veränderte Struktur HP01[YLPRPR] mit Hilfe der hochauflösenden CLS-Mikroskopie untersucht. Hier zeigte sich im Vergleich zu beiden bereits diskutierten Derivaten eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz und somit eine offensichtliche Zunahme der intrazellulären Konzentration. In Abbildung 119 links ist die Translokation ins Zellinnere von BT 96 ([MIIFR]HP01[PRPPHPRL]) gezeigt. Nach achtstündiger Inkubation bei 37 °C und einer eingesetzten Stoffmenge von 54,4 nM war eine eindeutige Erhöhung sichtbar. Ebenfalls konnte für die Derivate BT 110 (HP01[YLPRPR]) (Abbildung 119 Mitte) und BT 112 ([MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂) eine gesteigerte Aufnahme in die Bakterienzelle gezeigt werden, welche in Abbildung 119 rechts deutlich erkennbar ist.

Tabelle 64: Eingesetzte Konzentrationen und Stoffmengen zur Untersuchung der zellulären Aufnahme

	Substanz	IC _{50AB} [nM]	C _{FITC-Peptid} [µg/mL]	x-fach IC ₅₀	x-fach MIC	t _{Inkub} [h]
BT 1	HP01	20,6	1004,76	8	-	8
BT 89	HP01[PRPPHPRL]	1,95	240,72	10	-	8
BT 96	[MIIFR]HP01[PRPPHPRL]	0,77	936,47	71	14	8
BT 110	HP01[YLPRPR]	1,25	891,12	107	-	8
BT 112	[MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH ₂	0,24	851,49	226	14	8

In allen fluoreszenzmikroskopischen Experimenten zeigten sich eindeutig die Lokalisation der FITC-markierten Peptide im Inneren der Bakterienzellen. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die antibakterielle Wirkung gegenüber dem untersuchten gramnegativen Stamm *E. coli* BL21 nicht auf eine unspezifische Interaktion der Peptide mit der Bakterienmembran durch membranolytische Effekte zurückzuführen ist. Stattdessen lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten neuen PrAMPs intrazellulär, mit dem Ribosom als mögliches Target, wirken.

5 Abschlussdiskussion

5.1 Identifizierung und Isolierung des neuen antimikrobiellen Peptids aus dem Speichel des Blutegels

Die Saliva des medizinischen Blutegels stellt auf Grund ihrer komplexen Zusammensetzung eine interessante Quelle für die Identifizierung neuer pharmazeutisch wirksamer Substanzen dar. In Arbeiten verschiedener Forschergruppen wird das Vorhandensein von bis zu 200 unterschiedlicher Proteine/Peptide postuliert (Baskova et al. 2008a; Nolte 2011), von denen zum heutigen Stand nicht viel mehr als ein Dutzend charakterisiert sind. Die biologischen Aktivitäten dieser Substanzen sind in erster Linie im Bereich der Hämostase zu finden. Diese werden durch Proteaseinhibitoren wie Hirudin, aber auch Substanzen wie bspw. Saratin, das mit dem Von-Willebrand-Faktor wechselwirkt, erzielt. Ebenso sind einige wenige Enzyme bekannt wie bspw. die Orgelase, eine Hyaluronidase, die als Penetrationsverstärker für den Speichel des Egels wirkt und somit ein tieferes Eindringen der Substanzen in das Gewebe des Wirts unterstützt. Aus dem Bereich der antimikrobiellen wirksamen Substanzen konnte bisher im Blutegelspeichel lediglich das Enzym Destabilase identifiziert werden, das eine dem Lysozym ähnelnde Wirkung besitzt (Abdullah et al. 2012; Zaidi et al. 2011). Weitere antimikrobielle Substanzen, wie bspw. AMPs sind hier noch nicht gefunden worden. In einem der *Hirudinae* verwandten Spezies, dem Entenebel, konnten französische Forscher zwei neue antimikrobielle Peptide identifizieren (Tasiemski et al. 2004).

Da der Egel lediglich eine geringe Diversität an bakteriellen Spezies in seinem Gastro-Intestinal-Trakt symbiontisch toleriert, lässt das Vorhandensein eines antimikrobiellen Abwehrsystems, ähnlich dem System der *Host Defense Peptides* in Vertebraten, vermuten (Maltz et al. 2014).

Zunächst wurde, wie unter 4.1 bereits erläutert, die Gesamtsaliva auf deren antimikrobielle Aktivität gegenüber Referenzkeimen beider Gramgruppen untersucht. Hier konnte ein IC_{50} -Wert für beide bei $62,50 \mu\text{g/mL}$ identifiziert werden, wobei die Wirkung gegenüber dem grampositiven *M. luteus* etwas besser war. Eine anschließende Fraktionierung nach Molekulargewicht sowie erneute Testung auf antibakterielle Aktivität zeigte das Potential der $<3\text{kDa}$ -Fraktion. Bei einer eingesetzten Konzentration von $140 \mu\text{g/mL}$ konnte für *E. coli* K12 eine Wachstumshemmung von 63 % und für *M. luteus* von 73 % für diese Fraktion gezeigt werden. Diese demonstrierten das Potential der sich in der Saliva befindlichen antimikrobiellen Substanzen. Das im Entenebel *Theromyzon tessulatum* identifizierte Theromacin zeigt im Dilutionsassay gegenüber *M. luteus* ein MIC von ca. 20 nM. Theromyzin, das zweite identifizierte AMP im Entenebel, wirkt bei einer MIC von 250 bis 500 nM. Beide zeigten jedoch keinerlei Wirkung gegenüber gramnegativen Spezies wie *E. coli* (Tasiemski et al. 2004).

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die niedermolekulare Fraktion der Saliva detailliert untersucht, auch, weil für die Entwicklung neuer Wirksubstanzen *Small Molecules* mit $<500 \text{ Da}$ häufig im Fokus der Forschung stehen.

Die $<3 \text{ kDa}$ -UF-Fraktion wurde mit einer RP-HPLC in zwanzig weitere Unterfraktionen aufgetrennt. Auch hier erfolgte die Testung auf antimikrobielle Wirkung im Mikrodilutionsassay, wobei zwei Fraktionen antibakterielle Aktivität gegenüber beiden Gramgruppen zeigten. Beide Fraktionen wurden weiter über LC-MS/MS analysiert und die so gewonnenen Daten über den Algorithmus Andromeda *de novo* sequenziert. In Fraktion 10 konnte so die Sequenz eines neuen antimikrobiellen Peptides identifiziert

werden. Dieses Dekamer zeigte einen ungewöhnlich hohen Prolinanteil und konnte daher der Gruppe der prolinreichen AMPs (PrAMPs) zugeordnet werden. Alle bisher bekannten PrAMPs weisen allerdings eine deutlich längere Aminosäuresequenz und einen geringeren Anteil an Prolinen auf (Bulet et al. 1999; Otvos 2002).

Die geringe Sequenzlänge von lediglich zehn Aminosäuren eignet sich sehr gut für eine kostengünstige synthetische Herstellung des Peptides nach der Methode der chemischen Festphasenpeptidsynthese. Eine erfolgreiche Synthese und gleichzeitig ein hohes Maß an strukturellen Modifikationen zur Verbesserung der biologischen Aktivität sind für Leitsubstanzen im Wirkstoffdesign essentiell. Im nächsten Schritt galt es nun die Sequenzvarianten PGPPPPGKPQ und GPPPPPGKPQ chemisch zu synthetisieren und weiterführend zu charakterisieren.

5.2 Synthese und Charakterisierung antimikrobieller Peptide

Die Etablierung der chemischen Synthese der Leitstruktur stellte einen wichtigen Schritt für alle weiteren Designansätze und Struktur-Wirkungsbeziehungen dar. Die Peptidsynthese unter Verwendung einer großen Zahl von Prolinen ist aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften nicht direkt auf einfache Kopplungsreaktionen übertragbar. Es waren daher einige Optimierungsexperimente notwendig, um die SPPS beider Derivate trotz des Tetraprolinmotivs erfolgreich zu gestalten. Proline erzeugen in der Aminosäuresequenz von Peptiden/Proteinen immer Stellen, die strukturelle Änderungen bedingen (Williamson 1994).

Die Aminosäure Prolin ist dahingehend ungewöhnlich in ihrer Struktur, da sie durch Rückführung der Seitenkette zum Aminoterminus in zyklisierter Form auftritt. Hieraus resultieren strukturelle Besonderheiten die sich auf die einzunehmenden Konformationen auswirken. Diese betreffen insbesondere die Ausbildung von helikalen Strukturen, aber auch bei der Ausbildung intramolekularer Wechselwirkungen. Dies gilt allerdings nur für einzeln vorkommende Proline in einem Sequenzabschnitt. Ab einer Länge von vier Resten kann es zur Ausbildung einer so genannten Poly-Prolin-TypII-Helix kommen, die im Vergleich zur α -Helix, einen schlankeren Verlauf mit nur drei Aminosäuren pro Windung und eine höhere Ganghöhe besitzt (Williamson 1994).

Die Synthese der beiden Sequenzvarianten HP01 (PGPPPPGKPQ) und HP02 (GPPPPPGKPQ) konnte mittels mikrowellenassoziierter, vollautomatischer Fmoc-gestützter Festphasensynthese mit Ausbeuten von ca. 90 % erfolgreich etabliert werden. HP02 zeigte wegen seines Pentaprolinmotivs etwas schlechtere Ausbeuten von 88 %.

Im Anschluss an die Synthese wurde die biologische Aktivität beider Varianten im Mikrodilutionsassay gegen die beiden Referenzkeime *E. coli* K12 und *M. luteus* getestet. Hier konnten nahezu identische IC_{50} -Werte gegen *M. luteus* von 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 10,3 nM für beide Varianten erreicht werden. Unterschiede zeigten sich in den Testungen gegen *E. coli* K12. Hier konnte HP01 mit einer IC_{50} von 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 2,5 nM bessere Wirkung zeigen wie HP02, dessen IC_{50} Wert bei 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 10,3 nM lag. Für beide Sequenzvarianten zeigte sich ein guter Dosis-Wirkungs-Verlauf.

Aufgrund der Problematik so genannter ESKAPE-Erreger wurden beide Sequenzvarianten auch auf ihre wachstumshemmende Wirkung gegen gramnegative multiresistente humanpathogene *Klebsiellen*-

Stämme getestet. Die Stämme waren Träger der Resistenzgene KPC-2, SHV-11, OXA-48 und CTX-M15, welche Codierungen für Carbapenemasen und β -Laktamasen tragen. Gegenüber einem *Klebsiellen*-Stamm mit OXA-48 und CTX-M15 konnten bei einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 20,6 nM Wachstumsreduktionen durch beide Sequenzvarianten von ca. 40 % erreicht werden. Im Fall des zweiten MRE mit den Resistenzgenen KPC-2 und SHV-11 konnte bei gleichen Konzentrationen der IC_{50} Wert erreicht werden. In Studien von Benincasa *et. al* (2004) wurden Bac7 Fragmente gegen eine Vielzahl multiresistenter klinischer Isolate getestet. Hier liegen die IC_{50} Werten von $1\mu\text{M} - 16\mu\text{M}$ gegenüber klinischen pathogenen *Klebsiellen*-Stämmen deutlich höher als dies bereits von dem unmodifizierten HP01 erreicht wird (Benincasa et al. 2004).

Aufgrund der bis zu diesem Zeitpunkt erhobenen Daten wurden alle weiteren Untersuchungen mit der Sequenzvariante HP01 (PGPPPPGKPKQ) durchgeführt.

Ein weiterer wichtiger Punkt im Verlauf einer Leitstrukturentwicklung von Peptiden ist die Überprüfung der proteolytischen Stabilität. Der ungewöhnlich hohe Anteil an Prolinen in der Sequenz wirkt sich allgemein inhibitorisch auf den proteolytischen Abbau durch unterschiedliche Enzyme aus, da sich gerade durch die Ringstruktur der Proline aus sterischen Gründen ein Enzym-Substrat-Komplex nur schwer ausbilden lässt. Insbesondere das Vorkommen als Tetraprolinmotiv und damit die Proline an Position 3 und Position 4 wirken sich positiv auf die Hydrolysestabilität gegenüber Aspartyl- und Serinproteasen aus.

Die positiven Ergebnisse aus den proteolytischen Abbaustudien einzelner Enzyme setzten sich auch in Stabilitätsuntersuchungen in humanem Serum und künstlichem Magensaft fort. Die Serumstabilität der Leitstruktur HP01 lag mit ca. 4 h deutlich über der anderer PrAMPs (Berthold et al. 2013; Noto et al. 2008). Betrachtet man beispielsweise das optimierte Designerpeptid A3-APO in 25 %igem Nagerserum mit einer Halbwertszeit von lediglich 10 min und vergleicht man dies mit der unmodifizierten Leitstruktur HP01, so wird deren Potential als neues Antibiotikum deutlich. Dieses Potential wird nochmals durch die Untersuchungen der gastrointestinalen Stabilität von HP01 untermauert. Hier konnte nach 24h Inkubation des Peptids in künstlichem Magensaft noch über 90 % intaktes Peptid gefunden werden. In der Literatur sind keine vergleichweisen Daten für PrAMPs existent. Die Tatsache, dass die Sequenz der Leitstruktur noch am Anfang rationaler Designansätze steht, verdeutlicht hier das immense Potential, das in dieser Struktur steckt. Durch die bis zu diesem Zeitpunkt gewonnen Daten lässt sich eine perorale Anwendung als Therapeutikum erhoffen.

Die Suche nach neuen Peptid-basierten Leitstrukturen erfordert neben der Serumstabilität noch eine weitere Hürde zu überwinden, die zytotoxische Unbedenklichkeit. Beim Design neuer antibakterieller Wirkstoffe ist eine toxische Wirkung auf Bakterienzellen gewünscht, allerdings sollte ein möglicher neuer Wirkstoff eine geringe zellschädigende Wirkung auf Säugerzellen ausüben. Hier scheiterten bisher häufig die Weiterentwicklungen antimikrobieller Peptide zum Therapeutikum aufgrund einer hohen Zytotoxizität. Diese lässt sich in vielen Fällen auf zu hohe positive Nettoladungen und damit verbunden zu starke unspezifische Membraninteraktionen der Peptide aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zurückführen (Huang et al. 2010). Ziel der Wirkstoffentwicklung ist es eine möglichst weite Spanne zwischen Wirkkonzentration und dem Auftreten zytotoxischer Effekte zu erreichen. Dieser Bereich liegt bei einem Großteil der AMPs bei dem 2-bis 4-fachen der Wirkkonzentration. Im *In-vitro*-Standardmodell mit HeLa-Zellen zur Testung auf zellschädigen Wirkungen konnte für HP01 eine Verträglichkeit bis zum 14-fachen der Wirkkonzentration beobachtet werden. Erst ab einer

Konzentration von 14 mg/mL konnten zellschädigende Effekte durch das Peptid nachgewiesen werden. Vergleicht man dies mit optimierten Oncocin-Derivaten, so zeigten sich hier bereits ab einer Konzentration von 0,6 mg/mL eine Verringerung der Zellviabilität von bis zu 40 % (Knappe et al. 2015). (Knappe et al. 2015).

Sowohl die Ergebnisse zur Zytotoxizität als auch die Daten im Bereich der proteolytische Stabilität zeigen einen großen Spielraum zur Optimierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen und damit zur Verbesserung der IC₅₀-Werte der Leitstruktur.

Abschließend für den Bereich der Charakterisierung der Leitstruktur wurden erste *In-vivo*-Daten im Gallerien-Modell erhoben. Hierzu wurden die Überlebensraten von Larven der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* nach Infektion mit einem humanpathogenen *E. coli*- Stamm H132 untersucht. Hierzu wurde den Larven gemeinsam mit den Bakterien Peptidlösung in drei unterschiedlichen Konzentrationen in das Hämocoelom injiziert und die Larven über sieben Tage bei 37 °C inkubiert. In drei unabhängigen Experimenten konnte bei einer Peptidkonzentration von 500 µg/mL bzw. 10,3 nM eine mittlere Überlebensrate von 80 % nach sieben Tage ermittelt werden. Eine Kontrollgruppe an Larven, die nur mit dem humanpathogenen Erreger infiziert wurden, zeigte schon nach 24 h keine Überlebenden. Für die Wirkstoffgruppe der antimikrobiellen Peptide gibt es noch keine vergleichbaren Daten im Insektenmodell. *In vivo*-Daten optimierter PrAMPs wie Oncocin werden bisher in Mausmodellen bestimmt und sind daher nicht vergleichbar (Knappe et al. 2012)

5.3 Untersuchungen zur quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung (QSAR)

Den Anfang von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (*Structure Activity Relationship, SAR*) bildet im Falle von Peptidwirkstoffen in der Regel die Identifizierung der für die biologische Wirkung essentiellen Aminosäureseitenketten innerhalb der Primärstruktur. Hierzu kann das Verfahren des *Alanine Scannings* eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um einen sukzessiven Austausch der Aminosäuren gegen die kleinste chirale Aminosäure Alanin. An kritischen Aminosäurepositionen bewirkt dies eine signifikante Änderung der biologischen Aktivität. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Sequenzvariante HP01 durchgeführt. Die Substitution der Aminosäure Alanin wirkte sich an sechs der zehn Aminosäurepositionen negativ auf die antibakterielle Aktivität aus. Zum einen betraf dies den Austausch der beiden Glycine an P2 und P7. Dies könnte in veränderten sterischen Gegebenheiten durch die zusätzliche Methylgruppe des Alanins begründet sein. Änderungen innerhalb des Tetraprolinmotivs wirkten sich ähnlich negativ aus. Grund hierfür könnte die verminderte Fähigkeit zur Ausbildung der PPII-Helix sein. Ebenso problematisch stellte sich eine Substitution des Lysins an P8 dar. Erklärungen für diese Position könnten sowohl in dem Verlust der positiven Nettoladung und damit eine verminderte initiale Membraninteraktion sein, aber auch der Austausch einer polaren gegen eine unpolare Aminosäure mag für den Verlust verantwortlich sein. Der Einfluss des PPII-Strukturelements auf die antimikrobielle Aktivität der PrAMPs lässt sich wie folgt erklären.

Die PP-II Helix stellt eine abundante Sekundärstrukturform in Peptiden/Proteinen dar und wurde erstmals in Polyprolinmotiven identifiziert (Adzhubei et al. 2013). Trotz der anfänglichen Theorie, dass diese Struktur nur von Prolinen ausgebildet werden kann, ist zwischenzeitlich bekannt, dass alle

proteinogenen Aminosäuren dazu in der Lage sind. Die Ausbildung einer PPII-Helix basiert nicht wie in anderen Sekundärstrukturelementen über Wasserstoffbrückenbindungen.

Obwohl die Poly-Prolin-Typ-II-Helix eine generische Struktur darstellt, konnte dies lange Zeit experimentell nicht bestätigt werden. Ein Hauptgrund hierfür sind die fehlenden Denaturierungsbedingungen für hydrophobe Struktur motive, die in der Lage sind die Wechselwirkungen, die hinter einer solchen strukturellen Organisation stehen, zu unterbinden. Im Vergleich zur α -Helix tritt bei einer PPII-Struktur, die für die Stabilität wichtige Interaktion zwischen den Carbonylgruppen der Reste i und $i+1$ auf. In α -helikalen Strukturen hingegen bildet sich ein aus vier Wasserstoffbrücken bestehendes Bindungsmuster zwischen den Resten $i \leftrightarrow i+4$ aus.

PPII-Motive sind gestreckte helikale Strukturen mit einer einfachen Geometrie: eine Windung besteht aus drei Aminosäureresten und einer Dimension von 3 Å pro Aminosäurerest. Untersuchungen von Kubyschkin *et al.* zeigten, dass zur Ausbildung einer transmembranen PPII-Struktur neun Aminosäurereste notwendig sind. Zahlreiche Faktoren wie Ladung der C- und N-Termini, Amphiphilie und Lipidzusammensetzungen nehmen hier allerdings entscheidend Einfluss auf die Anordnung des Peptids in der Membran. So können Peptide mit dieser Struktur sowohl in einem sogenannten *Hammcock State* parallel in die Membran eingelagert werden, wie auch im *Transmembrane State* mit einer senkrecht zur Membran eingelagerten Geometrie (Kubyschkin *et al.* 2018).

Nach der Identifizierung essentieller Seitenketten wurden nun gezielte Modifikationen der Leitstruktur vorgenommen, welche durch rationale Designkonzepte auf der Basis publizierter Daten ausgewählt wurden. So erfolgten Änderungen in der Kern-Struktur des Peptides, Änderungen des C-Terminus und des N-Terminus. Die Ergebnisse dieser SAR-Studien mündeten schließlich in der gezielten Modifikation beider Termini der Leitstruktur HP01.

Änderungen innerhalb der Kern-Struktur umfassten in erster Linie die oftmals postulierte Substitution der Aminosäure Lysin durch die zweite basische proteinogene Aminosäure Arginin. Arginin besitzt gegenüber Lysin eine höhere Basizität, was sich im Deprotonierungsverhalten der Aminogruppe niederschlägt. Diese Substitution bewirkte eine etwas günstigere Dosis-Wirkungsbeziehung, aber noch keine signifikante Änderung des IC_{50} -Wertes, der unverändert bei 20,6 nM lag. Der verbesserte Dosis-Wirkungsverlauf könnte auf die mehrfachen Wasserstoffbrückenbindungseigenschaften der Guanidingruppe in der der Seitenketten von Arginin zurückzuführen sein. Hierüber kann durch eine stärker induzierte Membrankrümmung eine verbesserte Translokation erreicht werden (Schmidt und Wong 2013; Wu *et al.* 2013). Allerdings konnte bisher in der Literatur keine allgemeine Präferenz von Arg gegenüber Lys belegt werden. Da sich die Substitution nicht signifikant auf den IC_{50} -Wert auswirkte, wurde dieser Austausch in den weiteren SAR-Studien nicht beibehalten.

Änderungen am N-Terminus eines PrAMP wirken sich auf die Membrantranslokation sowie auf das antimikrobielle Spektrum des Peptides aus (Guida *et al.* 2015). So wurden Derivate mit unterschiedlichen Sequenzvarianten synthetisiert. Die Auswahl der Motive erfolgte zum einen anhand bekannter translokationsfördernder Sequenzen, welche oftmals in den sogenannten *Cell Penetrating Peptides* konserviert vorliegen. Eine weitere Möglichkeit der Sequenzmodifikation lieferten Homologien zu den N-terminalen Regionen bereits charakterisierter PrAMPs wie Oncocin und API88 (Knappe *et al.* 2010). Ebenso wurden datenbankvermittelt die Derivate hinsichtlich der Parameter Hydrophobizität und hydrophobes Moment miteinander verglichen. Bei der Auswahl der Motive wurde insbesondere

auf den Einfluss der Nettoladung geachtet. Eine Nettoladung über +5 resultiert oftmals in einer erhöhten Zytotoxizität. Desweiteren kann eine hohe positive Nettoladung zu unerwünschten unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Gruppen in der Membran und dem AMP führen, was einen membranolytischen Effekt zur Folge hat. Diesen Wirkmechanismus verfolgen eine Vielzahl kationischer Peptide und ist bei der Entwicklung neuer Antibiotika aufgrund mangelnder Spezifität gegenüber Erregergruppen unerwünscht.

Die besten Ergebnisse konnte durch das N-terminale Anfügen der Sequenzen RWRW und MIIFR erreicht werden. Für MIIFR konnte ein IC_{50} -Wert von 9,19 nM (750 $\mu\text{g}/\text{mL}$) erreicht werden, für das Sequenzmotiv RWRW ein IC_{50} -Wert von 4,53 nM (375 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Änderungen am C-terminalen Sequenzende prolinreicher AMPs wirken sich weitaus signifikanter aus, da diese Region für die generelle antimikrobielle Aktivität verantwortlich zu sein scheint (Guida et al. 2015). So zeigten Untersuchungen an Oncocin und Bac7, dass eine Änderung innerhalb dieser Sequenzen den zum Teil vollständigen Verlust der biologischen Aktivität zur Folge hatte. Ebenfalls zeigten diese Untersuchungen, dass sich zur Transporter-assoziierten Aufnahme ins Zellinnere insbesondere bei gramnegativen Vertretern eine Sequenzlänge <16 Aminosäuren negativ auswirkte. Unter Berücksichtigung in der Literatur postulierten Designansätze wurde nun die C-terminale Region von HP01 durch Anfügen zweier verschiedener konservierter Sequenzfolgen modifiziert. Die Auswahl der Sequenzen erfolgte durch das Berücksichtigen homologer Motive wie PRPRX und PPRPX und die *in silico*-Bestimmung der wichtigen physikochemischen Parameter. Ebenso wurde hier auch das Ausbilden einer möglichen helikalen Struktur beurteilt. Unter Beachtung dieser Aspekte konnte für zwei Derivate eine signifikante Steigerung der IC_{50} -Werte erreicht werden. Das erste Derivat HP01[YLPRPR] zeigte *in silico* eine noch nicht ganz optimale helikale Struktur sowie ein ähnliches Dosis-Wirkungsprofil wie die Leitstruktur. Jedoch konnte der IC_{50} -Wert auf 0,71 nM (62,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) gesenkt werden. Das zweite vielversprechende Derivat HP01[PRPPHPRL] zeigte einen deutlich verbesserten Dosis-Wirkungsverlauf. Mit einem IC_{50} -Wert von 1,95 nM (185 $\mu\text{g}/\text{mL}$) konnte auch hinsichtlich der antibakteriellen Aktivität eine signifikante Steigerung gegenüber der Leitstruktur erreicht werden. Dies wurde durch das erstmalige Erreichen des MIC_{90} -Wertes von 9,19 nM nochmals verdeutlicht. *In silico* Darstellungen über *HeliQuest* konnten für dieses Derivat auch eine optimale helikale Struktur mit Ausbildung einer amphiphilen Struktur durch das Auftreten eines *Hydrophobic Face* mit dem Motiv PPPGPP vorhersagen.

Im letzten Schritt des rationalen Designs und der damit verbundenen QSAR-Studien erfolgte nun das Zusammenfügen der Ergebnisse aus den Modifizierungen der beiden Termini. So wurden Derivate aus den N-terminalen Motiven RWRW und MIIFR sowie aus dem C-terminalen Motiv PRPPHPRL erzeugt.

Hier zeigte sich insbesondere die Kombination aus MIIFR und PRPPHPRL als sehr erfolgreich. So konnte in einer optimalen Dosisabhängigkeit ein IC_{50} -Wert von 0,77 nM (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) erreicht werden. Ebenso zeigte sich in dieser Kombination ein MIC -Wert von 3,87 nM (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Durch Amidierung des C-Terminus konnte eine weitere Senkung des IC_{50} -Wertes auf 0,24 nM (31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) erreicht werden. Die Amidierung verbunden mit antimikrobiellen Peptiden und deren Wirkung wurde bereits in Arbeiten von Cabrera *et al.* vorgeschlagen (dos Santos Cabrera et al. 2004). Da es sich hier in erster Linie um Effekte bezgl. der Helixstabilität handelt, könnten hierzu auch die Arbeiten von Kubyschkin *et al.* zur Erstellung von Hypothesen hinzugezogen werden. Für eine transmembrane Anordnung der Peptide in der hydrophoben Membrenumgebung sind polare Gruppen entscheidend, vornehmlich an den Termini.

Dies wird durch die zusätzliche Amidgruppe am C-terminalen Ende deutlich verbessert, welche sich zu den polaren Kopfgruppen eines Bilayers ausrichten (Kubyschkin et al. 2018). Für eine erfolgreiche Membrantranslokation ist die Bildung dieser *Transmembrane State* für die antimikrobiellen Peptide essentiell, um nicht in der hydrophoben Umgebung der Membran zurückgehalten zu werden. Betrachtet man die physiko-chemischen Parameter für die beiden Derivate mit unterschiedlichen CPP-Motiven am N-Terminus, zeigt sich, dass nicht alleine die Amphiphilie der Sequenz ausschlaggebend sein muss, vielmehr müssen die sich ausbildenden Sekundärstrukturelemente in einer amphiphilen Struktur münden.

Nach erfolgreicher Aktivitätssteigerung der Leitstruktur wurden alle erzeugten Derivate nochmal auf ihre mögliche zellschädigende Wirkung untersucht. Änderungen innerhalb der Kern-Sequenz resultierte nicht in Änderungen der zytotoxischen Wirkung auf HeLa-Zellen. Im Bereich der N-terminalen Sequenzänderungen zeigten sich im Vergleich der Maximalkonzentrationen Steigerungen der zellschädigenden Wirkung. Betrachtet man allerdings die tatsächlich eingesetzte Stoffmenge anhand der IC_{50} -Werte, so zeigen sich keine Änderungen in der Zytotoxizität. Für die C-terminal modifizierten Derivate konnte, verglichen mit HP01, nochmals eine Verbesserung der Verträglichkeit erreicht werden. Für das Derivat HP01[PRPPHPRL] traten bei dem 50-fachen des IC_{50} -Wertes noch keine zellschädigenden Effekte auf. Dies entspricht verglichen mit der Leitstruktur eine Zunahme um den Faktor zwei. Für das Derivat HP01[YLPRPR] konnte mit einer Verträglichkeit des 400-fachen IC_{50} -Wertes eine sehr deutliche Steigerung um den Faktor 16 erreicht werden. Eine letzte Steigerung der Peptidtoleranz im HeLa-Modell konnte für die beiden sehr vielversprechenden Derivaten [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] sowie dessen amidierter Variante nachgewiesen werden. So zeigten sich für [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] erst ab einer Stoffmenge größer dem 250-fachen des IC_{50} -Wertes, für [MIIFR]HP01[PRPPHPRL]-NH₂ sogar erst ab dem 800-fachen des IC_{50} -Wertes. Da für beide Derivate auch eine MIC erreicht wurde, treten zellschädigende Effekte bei beiden erst ab 50-facher Wirkstoffkonzentration auf. Die zytotoxische Wirkung in der Literatur beschriebener PrAMPs tritt hingegen bei wesentlich geringeren Vielfachen der Wirkkonzentration auf. So zeigt Bac7 gegenüber Makrophagen/Monozyten-Zelllinien bereits bei dem 4-fachen der Wirkkonzentration zellschädigende Effekte (Tam et al. 2015). Ähnliche Daten liefern auch hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirkung optimierte Oncocin-Derivate (Knappe et al. 2015). In einer Studie von Hansen *et al.* wurde durch Anfügen des *Cell Penetrating Peptide* Penetratin die Steigerung der antibakteriellen Aktivität verschiedener bereits gut charakterisierter PrAMPs gesteigert. Hier zeigte sich eine erhöhte Zytotoxizität ab einer Totalkonzentration von 100 µg/mL (Hansen et al. 2012). Verglichen mit der von uns eingesetzten Totalkonzentration von 2,5 mg/mL wird der potentielle Vorteil der optimierten Derivate deutlich. Diese große Spanne zwischen Wirkkonzentration und dem Auftreten erster zytotoxischer Effekte lässt weitere umfassende Modifizierungen der Struktur hinsichtlich der Optimierung der antibakteriellen Aktivität zu.

5.4 Untersuchungen zum Wirkmechanismus

Die Untersuchungen zur Targetidentifizierung und zum Mode of Action von HP01 und dessen Derivaten erfolgten über Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) und konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM). Hierbei wurde die SPR zur Untersuchung der Wechselwirkungen mit 70S Ribosomen aus den gramnegativen Bakterien *E. coli* und *T. thermophilus* genutzt, die CLSM wurde

eingesetzt um die Internalisierung in die Bakterienzelle zu messen und damit die Möglichkeit eines spezifischen intrazellulären Targets zu untersuchen.

Die Interaktionsanalysen mit den Ribosomen zeigten für alle Derivate spezifische Wechselwirkungen zwischen Liganden (immobilisiertes Ribosom) und Analyten (PrAMPs), welche mit K_D -Werten von 0,2 nM bis 2 nM als vergleichsweise hochaffine Wechselwirkungen einzustufen waren. Somit könnte das 70S Ribosom gramnegativer Bakterien ein mögliches Target für HP01 sowie dessen Derivate darstellen. Innerhalb beider Studien zeigte sich insbesondere der Einfluss der C-terminalen Modifikationen. Hier wurden, wie oben beschrieben, konservierte Domänen bereits charakterisierter PrAMPs angefügt. Modifikationen am C-terminalen Ende sollen sich nach dem Stand der Wissenschaft auf die generelle antibakterielle Aktivität auswirken (Guida et al. 2015). Gerade die beiden gewählten Sequenzen YLPRPRPX aus dem PrAMP Oncocin und die Sequenz PRPPHPRL aus Apidaecin konnten zu einer Zunahme der Affinität führen. Mögliche Erklärungsansätze könnte man in protein-kristallographischen und strukturbioologischen Daten aus Arbeiten von Seefeldt *et al.*, Gagnon *et al.* und Graf *et al.* finden (Seefeldt et al. 2015; Gagnon et al. 2016; Graf et al. 2017).

In einigen Publikationen wurde gezeigt, dass PrAMPs mit dem Chaperon DnaK interagieren könne, was darauf hindeutete, dass PrAMPs das Bakterienwachstum hemmen könnten, indem sie die DnaK-vermittelte Proteinfaltung stören (Otvos et al. 2000). Krizsan *et al.* wiesen jedoch nach, dass PrAMPs ebenso wirksam gegenüber Bakterienstämmen waren, bei denen das für DnaK kodierende Gen inaktiviert war (Krizsan et al. 2014). Die Bindung an DnaK konnte also nicht die entscheidende Wechselwirkung für die antibakterielle Aktivität sein und deutete darauf hin, dass ein weiteres intrazelluläres Target für PrAMPs existieren muss. Tatsächlich zeigte sich, dass PrAMPs an Ribosomen binden können und somit die Proteinsynthese *in vivo* und *in vitro* hemmen (Krizsan et al. 2015b; Mardirossian et al. 2014). Für die meisten der bisher identifizierten PrAMPs gibt es keine Untersuchungen zum tatsächlichen Wirkmechanismus. Für die bereits charakterisierten PrAMPs wurden mittels röntgenkristallographischer Methoden zwei verschiedene Wirkmechanismen postuliert, die beide eine Hemmung der Proteinsynthese beinhalten. Die Oncocin-ähnlichen PrAMPs oder Typ I PrAMPs ermöglichen eine Translationshemmung, verhindern aber den Übergang in die Elongationsphase (Graf et al. 2017), während die Apidaecin-ähnlichen PrAMPs oder Typ II PrAMPs eine Translationsinitiierung und Elongation ermöglichen, aber die Translationsphase blockieren (Florin et al. 2017).

Zu den Typ I PrAMPs zählen neben dem Namensgeber Oncocin auch die Peptide Pyrrhocoricin, Bactenecin 7 und Metalnikowin-1. Wie aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu erwarten, binden diese PrAMPs mit ähnlich ausgedehnten Konformationen innerhalb des Ausgangstunnels an das Ribosoms, der zwischen der Verbindungsstelle von 30S und 50S Untereinheit liegt. Die Ausrichtung der Typ I PrAMPs ist bezüglich einer entstehenden Polypeptidkette invertiert, so dass sich der N-Terminus im Peptidyl-Transferase-Center (PTC) befindet und der C-Terminus in den ribosomalen Tunnel hineinragt. In Übereinstimmung mit biochemischen Studien zeigt die Struktur, dass sich die PrAMPs vom Typ I nicht signifikant mit der Bindungsstelle einer P-Site tRNA überschneiden und somit eine Translationseinleitung ungehindert erfolgen kann (Seefeldt et al. 2015; Gagnon et al. 2016). Im Gegensatz dazu überlappt die N-terminale Region der PrAMPs sterisch die Bindungsstelle des CCA-Endes einer A-site tRNA. Dies deutet darauf hin, dass diese PrAMPs den Übergang von der Initiierung zur Elongation verhindern, indem sie die Bindung und Aufnahme der aa-tRNA am PTC auf der großen

Untereinheit blockieren (Graf et al. 2017). Betrachtet man die Sequenz und die Bindung von Onc, so befindet sich der homologe Bereich PYPRPRPX, der hier C-terminal an HP01 angefügt wurde, in der Sequenzmitte. Die Bindung im Exit-Tunnel des Ribosoms dieses Sequenzabschnittes ist der Spalte der A-Site zuzuordnen. Sollten die Derivate HP01[YLPRPRPQ], HP01[YLPRPRPK] und HP01[YLPRPR] einen ähnlichen Wirkmechanismus und eine Bindung im ribosomalen Tunnel aufweisen, wäre die schwächere Bindung von HP01[YLPRPR] durch die mangelnde Länge und damit das nicht vollständige Abdecken der A-Site Spalte zu erklären. Diese homologe Sequenz könnte dafür verantwortlich sein, das Peptid im Ribosomalen Tunnel in die bevorzugte Position zu bringen. Wechselwirkungen innerhalb dieses Bereiches verlaufen hauptsächlich über das PRP-Motiv mit den Nukleotiden U2506 und G2061 über die Argininseitenketten durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen.

Die PrAMPs vom Typ II umfassen bisher nur die Insekten-PrAMPs der Unterfamilie Apidaecin. Das am besten charakterisierte Peptid ist Api137, ein Derivat des natürlich vorkommenden PrAMP-Apidaecins 1b der Honigbiene. Strukturstudien zeigten, dass ähnlich wie bei Typ I PrAMPs auch Typ II PrAMPs, wie z.B. API137, innerhalb des Exittunnels binden. Die Ausrichtung von Typ II PrAMPs ist jedoch in Bezug auf Typ I umgekehrt. Typ II hat die gleiche Ausrichtung wie eine sich im Aufbau befindliche Polypeptidkette, wobei sich der C-Terminus im Peptidyl-Transferase-Center (PTC) befindet und der N-Terminus durch den ribosomalen Tunnel verläuft. Obwohl sich die Bindungsstelle von API137 mit Typ I PrAMPs überschneidet, besteht ein wesentlicher Unterschied darin, dass API137 den Eintrag der A-Site tRNA in den PTC nicht blockiert. Stattdessen ist der C-Terminus von API137 so positioniert, dass ein direkter Kontakt mit dem Release-Faktor RF1 und RF2 in der A-Stelle auftreten kann. Insbesondere kann Arg17 von API137 direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit der Seitenkette von Q235 des konservierten GGQ-Motivs des Ribosoms bilden. Darüber hinaus befindet sich die C-terminale Carboxylatgruppe von API137 innerhalb des H-Brücken-Bindungsabstandes zur Ribose-Hydroxylgruppe von A76 der deacylierten P-Site tRNA, die auch zum Fixieren von RF1/RF2 beitragen könnte, indem sie verhindert, dass das Ribosom den RF3-stimulierten Übergang in den für die RF1- und RF2-Dissoziation erforderlichen Rotationszustand durchläuft (Florin et al. 2017).

Es ist zu beachten, dass die Anzahl der Ribosomen in einer Bakterienzelle, wie z. B. *E. coli*, viel größer ist als die Anzahl der RF1- und RF2-Moleküle (um das 200- und 25-fache) und API137 daher RF1 und RF2 nur in einer kleinen Untergruppe der verfügbaren Ribosomen einfangen kann. Dennoch führt dies zu einer Dezimierung der freien Speicher von RF1 und RF2 in der Zelle, so dass die überwiegende Mehrheit der Ribosomen während des Translationsprozesses zum Erliegen kommt. Aufgrund der Abwesenheit von RF1 und RF2 wird eine erhöhte Ableserate des Stop-Codons den terminierten, blockierten Ribosomen beobachtet. Überraschenderweise ist die Ableserate des Stop-Codon bei API137 deutlich höher als diejenige des klassischen Antibiotikums Streptomycin. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PrAMPs vom Typ II wie API137 eine duale Wirkungsweise besitzen, um einerseits RF1 und RF2 in einer Minderheit der Ribosomen innerhalb der Zelle zu binden und andererseits eine Mehrheit der Ribosomen in der Terminierungsphase aufgrund des Fehlens verfügbarer RFs zu blockieren, was wiederum die Ableserate des Stopcodon erhöht (Florin et al. 2017). Dieser postulierte Wirkmechanismus könnte sich auf die Derivate mit der homologen Sequenz PRPPHPRL übertragen lassen.

Zur genauen Aufklärung des Wirkmechanismus am Ribosom müssten allerdings für die in dieser Thesis betrachteten Derivate strukturbiochemische Untersuchungen mittels Kristallographie oder Cryo-Elektronenmikroskopie erfolgen, um ein Modell für die exakte Bindung des Wirkstoffes am Target zu

entwickeln. Solche Daten sind auch für die strukturbasierte Weiterentwicklung der Derivate bzw. der Leitstruktur HP01 von essentieller Bedeutung.

Die konfokale Laserscanning Mikroskopie konnte die intrazelluläre Aufnahme aller Peptidderivate in unterschiedlicher Intensität nachweisen. Die Daten korrelierten dabei mit dem im Mikrodilutionsassay auftretenden Trend. Es zeigte sich durch Modifizierung der C- oder N-terminalen Sequenzen eine deutliche Verbesserung der IC_{50} -Werte bzw. das Erreichen des MIC-Wertes. Die Derivate, für die eine signifikante Verbesserung in der antimikrobiellen Aktivität erreicht werden konnte, zeigten auch eine wesentlich bessere zelluläre Aufnahme. [MIIFR]HP01[PRPPHPRL] sowie dessen amidierter Variante zeigten hier gemeinsam mit HP01[YLPRPR] die besten Ergebnisse nach 8-stündiger Inkubation.

Zur effizienteren Weiterentwicklung könnte die strukturelle Aufklärung des Target-Wirkstoffkomplexes beitragen. Ebenso könnten weitere Untersuchungen zur effektiven zellulären Aufnahme mit weiteren CPP-Motiven oder Signalsequenzen die Effizienz steigern, auch über das Design einer Pro-Drug könnte nachgedacht werden. So könnte man die zum Teil schwächeren Wechselwirkungen der N-terminal modifizierten Derivate mit dem Ribosom durch das Kopplung des Motivs über eine Esterbindung unterbinden oder eine spezifische Linker-Sequenz für bakterielle Proteasen einfügen. Die Freisetzung des eigentlichen Wirkstoffes könnte so nach intrazellulärer Aufnahme durch hydrolytische Spaltung erfolgen.

Zusammenfassend ist es mit dieser Arbeit gelungen, ein neues antimikrobielles Peptid zu identifizieren und zu charakterisieren das ein großes Potential als Leitstruktur zur Entwicklung aussichtsreicher antibakterieller Wirkstoffe besitzt.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, die Identifizierung und Charakterisierung eines neuen antimikrobiellen Peptides aus dem medizinischen Blutegel *Hirudo verbana*, sowie Untersuchungen zu dessen Wirkmechanismus und Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen, konnte in vier Arbeitspaketen realisiert werden.

- **Arbeitspaket 1 – Identifizierung des AMPs aus dem Speichelsekret des Blutegels**

Antimikrobielle Resistenzen (AMR), und damit unmittelbar verbunden der Anteil multiresistenter mikrobieller Infektionserreger (MRE), nehmen kontinuierlich zu und stellen weltweit eines der bedeutendsten Probleme im öffentlichen Gesundheitssystem dar. Das European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) schätzt, dass in den 27 Mitgliedstaaten jedes Jahr rund vier Millionen Patienten an einer nosokomialen Infektion erkranken von denen etwa 37000 tödlich verlaufen. Dies betrifft insbesondere Intensivstationen. Ein großer Teil dieser Todesfälle, schätzungsweise 25000, kann direkt den relevantesten MRE wie methicillinresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycinresistenten *Enterokokken* (VRE), Extended-Spektrum β -Laktamase-Bildnern (ESBL), sowie multiresistenten *Pseudomonas* und *Acinetobacter*-Spezies zugerechnet werden.

Ein weiterer besonders besorgniserregender Trend ist laut EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) die Entstehung und Ausbreitung von, besonders in Krankenhäusern gefürchteten, Carbapenemase-produzierenden *Enterobacteriaceae* (CPE). Diese Bakterien sezernieren Enzyme wie *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) oder die New Delhi Metallo- β -Laktamase (NDM), die hocheffizient β -Lactam-Antibiotika hydrolysieren können. Carbapeneme werden in der Humanmedizin zur Therapie von schweren nosokomialen Infektionen eingesetzt und sind gemäß der WHO in der Liste der „critically important substances“ aufgeführt (WHO international 2018). In der Veterinärmedizin werden diese Wirkstoffe nur bei bestehendem Therapienotstand („off-label“ use) und ausschließlich bei nicht-lebensmittelliefernden Tieren eingesetzt. Hingegen zeigen sich bei einer Gegenüberstellung der sogenannten „critically important substances“ in der Human- und Veterinärmedizin Überlappungen u.a. in der Einstufung von Cephalosporinen und Fluoroquinolonen. Die therapeutische Anwendung unterschiedlicher Substanzen aus diesen Wirkstoffklassen sowohl bei Nutztieren als auch bei kleinen Haustieren hat in der jüngsten Vergangenheit zahlreiche Diskussionen darüber entfacht, inwieweit MREs über Tiere selektiert werden und ein potentiell Reservoir und somit Zoonoserisiko darstellen.

Die Suche nach neuen antimikrobiellen Wirkmechanismen und -substanzen gehört nach Meinung aller Experten zu den bedeutendsten globalen Aufgaben in der Gesundheitsforschung. Hier rückt die Molekülklasse der antimikrobiellen Peptide, insbesondere derer mit spezifischen intrazellulären Targets in den Fokus der Forschung. Als potentielle Quelle für solche neuen AMPs haben wir den medizinischen Blutegel *Hirudo medicinalis* bzw. dessen nahen Verwandten *Hirudo verbana* ausgewählt. Im Lebensraum des Blutegels finden sich ein hohes Maß an organischem Material sowie eine große Diversität an Mikroorganismen. Den Magen- und Darmtrakt des Blutegels besiedeln allerdings lediglich zwei bakterielle Vertreter, nämlich *Aeromonas veronii* und *Rikinellaceae* spp., die symbiotisch mit dem Wirt

zusammenwirken (Nyholm und Graf 2012). Dies rechtfertigt die Annahme, antimikrobielle Substanzen mit hoher Aktivität und breiter Selektivität zu finden.

Erste Untersuchungen innerhalb dieser Thesis zeigten hier signifikante antimikrobielle Wirkung sowohl gegenüber gramnegativen als auch grampositiven Erregern. Hier konnten gegenüber *M. luteus* ein IC₅₀-Wert von >31,25 µg/mL und gegenüber *E. coli BL21* ein IC₅₀-Wert von 62,50 µg/mL nachgewiesen werden. Nach Fraktionierung des Speichels in vier unterschiedliche Molekulargewichtsfractionen konnte insbesondere mit der Niedermolekulargewichtsfraction deutliche Wachstumshemmungen von 70% gegenüber *M. luteus* und 60% gegenüber *E. coli BL21* verzeichnet werden. Aus diesem Grunde wurde weitere chromatographische Aufreinigungen durchgeführt, die schließlich in einer LC-MS/MS-Analyse mit anschließender Andromeda-basierter *De-novo*-Sequenzierung zweier hochaktiver HPLC-Fractionen mündete. Hier konnte eine bisher nicht bekannte Peptidsequenz eines Dekamers identifiziert werden, welche durch ihren hohen Prolinanteil der Molekülgruppe der prolinreichen antimikrobiellen Peptiden (PrAMPs) zugeordnet werden konnte. Die neu identifizierte Sequenz wurde nun im weiteren Verlauf der Arbeit chemisch synthetisiert und alle weiteren antimikrobiellen Aktivitäten ausschließlich gegenüber gramnegativen Erregern getestet.

- **Arbeitspaket 2 – Synthese und Charakterisierung von HP01**

Um das antibakterielle Potential der identifizierten Sequenz verifizieren zu können, ist die erfolgreiche chemische Synthese des identifizierten Dekamers Voraussetzung. Außerdem stellt die chemische Synthese die Grundlage für ein weiteres strukturbasiertes Wirkstoffdesign dar. Daher stand im zweiten Arbeitspaket zunächst die chemische Synthese der identifizierten Sequenzen im Fokus. Einer der Goldstandards zur Herstellung synthetischer Oligopeptide mit einer Sequenzlänge bis ca. 50 AS ist die Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese. Hier wird die Peptidsequenz von C- nach N-Terminus, gegenläufig der Proteinbiosynthese, an einer festen Trägerphase synthetisiert. Hierbei wiederholt sich nach Kopplung der ersten Aminosäure an das Harz ein Zyklus aus Entschützen der α-Aminoschutzgruppe der bereits am Harz gekoppelten AS, anschließende Aktivierung der Carboxylfunktion am C-terminalen Ende der neuen AS durch Oxyma/DIC und anschließende Kupplung. Die Synthese wird in rein organischer Phase, meist in Dimethylformamid durchgeführt. Nach vollständiger Synthese erfolgt nach einem letzten Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen der AS eine Spaltung von der festen Phase sowie eine Präzipitation des in der flüssigen Phase befindlichen Peptides. Die so gewonnenen Peptide wurden via RP-HPLC und Massenspektroskopie analysiert. Eine deutliche Verbesserung hinsichtlich Ausbeuten und Unterdrückung unerwünschter Racemisierung erbrachten vollautomatische Peptidsynthesizer der nächsten Generation, welche mikrowellenunterstützt arbeiten. Durch die mikrowellengestützte Synthese und dem Einsatz von *preloaded resins* konnten Ausbeuten von ca. 90% für HP01 erreicht werden.

Diese in der Saliva des Blutegels identifizierte Sequenz wurde in zwei Varianten synthetisiert und deren antimikrobielle Wirkung wiederum gegen Referenzkeime beider Gramgruppen bestimmt. Beide Sequenzen konnten die bereits identifizierten Aktivitäten bestätigen. So konnten für *M. luteus* im Fall beider Sequenzvarianten IC₅₀-Werte von 10,3 nM erreicht werden. Für den gramnegativen Vertreter *E. coli K12* zeigten sich Differenzen in den IC₅₀-Werten der beiden Varianten. HP01 konnte einen IC₅₀-Wert von 2,6 nM erreichen, der IC₅₀-Wert von HP02 hingegen lag wie schon bei *M. luteus* bei 10,3 nM.

Zusätzlich wurde die antimikrobielle Wirkung beider Sequenzvarianten auf multiresistente Erreger der ESKAPE-Familie getestet. Gegenüber multiresistenter *Klebsilla pneumoniae* mit den Resistenzgenen SHV-11 und KPC-2 sowie OXA-48 und CTX-M15 konnten Wachstumshemmungen von bis zu 50 % erreicht werden. Da sich hier auch die Sequenzvariante HP01 als überlegen erwies, wurden aller weiteren Untersuchungen lediglich mit dieser Variante durchgeführt.

Nach Abschluss der Verifizierung der antimikrobiellen Wirkung des synthetischen Peptides, wurde dessen proteolytische Stabilität näher untersucht. Die so gewonnenen Daten könnten erste Aussagen über eine mögliche perorale Applikation geben, die für eine gute Compliance unerlässlich ist. Die Leitstruktur HP01 zeigte gute Stabilität gegenüber Serinproteasen, Aspartylproteasen und auch Matrixmetalloproteasen. Diese gute proteolytische Stabilität gegenüber einzelnen Proteasen, spiegelte sich sowohl in den Experimenten zur Untersuchung der Serumstabilität als auch in der Studie zur Stabilität in künstlichem Magensaft (SGF) wider. In Humanserum zeigte das neue AMP eine Halbwertszeit von 4 h und liegt damit deutlich über dem Wert für bekannte AMPs wie Api88, Lfcin und A3-APO, die im Schnitt zwischen 10 und 30 min liegt. Noch besser stellte sich die Stabilität in SGF dar. Hier konnte nach 24-stündiger Inkubation keine signifikante Abnahme der Wirkstoffkonzentration gefunden werden.

Die gute Proteolyseresistenz könnte sich mit dem hohen Anteil der Aminosäure Prolin in Form eines Tetraprolinkerns erklären lassen. Diese Prolin-Multimere stellen sich für die untersuchten Proteasen als stereochemisch ungünstig für die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes dar.

Ein weiterer wichtiger Pfeiler der Wirkstoffentwicklung und oftmals eine große Hürde für viele antimikrobielle Peptide stellt der Nachweis der zytotoxischen Unbedenklichkeit dar. Für die Entwicklung neuer antibakterieller Substanzen ist es wichtig, dass der Wirkstoff eine toxische Wirkung gegenüber der Bakterienzelle aufweist, jedoch nicht gegenüber Säugerzellen. Viele AMPs wirken membranolytisch gegenüber Bakterien und weisen hier oft ein sehr hohes zytotoxisches Potential gegenüber Säugern auf. AMPs mit intrazellulärem Target müssen auch zunächst die Membran überwinden und nutzen elektrostatische Wechselwirkung für einen initialen Kontakt mit der Bakterienzelle aus. Hier besteht ebenfalls die Gefahr, einer zu hohen zytotoxischen Wirkung. Für eine effiziente Weiterentwicklung einer Leitstruktur ist es aus diesen Gründen wichtig, eine möglichst große Spanne zwischen Wirkkonzentration und dem Auftreten ersten zellschädigender Effekte zu besitzen. Einer der etabliertesten *in vitro* Methoden zur Untersuchung der zytotoxischen Unbedenklichkeit ist das HeLa-Zellen-Modell. Dieses Zellkulturmodell wurde auch zur Untersuchung unserer Peptide eingesetzt. Als Kontrollsubstanzen dienten hier das Tensid Natriumdodecylsulfat und das Zytostatikum Doxorubicin. Erste zellschädigende Wirkungen traten für die Leitstruktur HP01 erst ab einer Wirkstoffmenge von 13,4 mM auf, diese entspricht dem 14-fachen der Wirkkonzentration. Bereits hier wird das große Potential dieser Leitstruktur deutlich, da im Allgemeinen bei AMPs erste zytotoxische Effekte schon ab dem 2-bis 4-fachen der Wirkkonzentration auftreten.

In einer letzten Studie dieses Arbeitspaketes wurden erste *In-vivo*-Daten für HP01 erzeugt. Hierzu wurde ein Infektionsmodell mit Larven der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* gewählt. Einer der Hauptvorteile für dieses Infektionsmodell ist die Möglichkeit, Untersuchungen von bakteriellen Infektionen bei einer Temperatur von 37 °C durchführen zu können, da Larven auch bei diesen humanphysiologischen Bedingungen problemlos kultivierbar sind. Diese Möglichkeit bieten andere

Modelle nicht. Die Gallerienstudie wurde in zwei Teilversuche unterteilt. Zum einen wurden die Larven mit einem humanpathogene *E. coli*-Stamm infiziert und das antibakterielle Potential des Peptids in drei verschiedenen Konzentrationen getestet. In der höchsten eingesetzten Konzentration konnte nach sieben Tagen eine mittlere Überlebensrate von 80 % erreicht werden, während ohne Zugabe von HP01 eine Letalität von 100 % in diesem Zeitraum beobachtet wurde. Eine zweite Versuchsreihe innerhalb dieser Studie diente der Untersuchung der Toxizität des Peptides gegenüber den Larven der Wachsmotte. Hier konnte in keiner eingesetzten Konzentration eine toxische Wirkung auf die Gallerien nachgewiesen werden.

- **Arbeitspaket 3 – Rationales Design und QSAR-Studien**

Eine moderne Methode in der Weiterentwicklung eines Wirkstoffes stellt das strukturbasierte Wirkstoffdesign dar. Hier werden im Allgemeinen, basierend auf der 3D Struktur eines Targets, rechnergestützt zunächst Substanzbibliotheken erstellt und diese in der Regel *in silico* über *Docking*-Studien hinsichtlich Bindungsaffinität zwischen Liganden und makromolekularen Zielstrukturen überprüft. In der vorliegenden Arbeit wurden nun in einem dritten Arbeitspaket verschiedene Derivate via SPPS synthetisiert und deren antimikrobielles Potential getestet. Die Auswahl der Sequenzen erfolgte aufgrund literaturbasierter rationaler Designkonzepte, da für das neue PrAMP noch kein Target identifiziert wurde. Die ausgewählten Derivate wurden nun anhand ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehung bewertet. Hauptaugenmerk lag hierbei auf einer rechnergestützten Bestimmung wichtiger physikochemischer Parameter wie Amphiphilie, Hydrophobizität, Helizität und Nettoladung. Zur Bestimmung der Parameter wurden frei zugängliche Softwaretools genutzt.

Den ersten Schritt im strukturbasierten Wirkstoffdesign in der Molekülklasse der Peptidtherapeutika stellt die Beurteilung kritischer Aminosäurepositionen dar. Diese kann man durch einen sogenannten Alanin-Scan bestimmen. Nach sukzessivem Austauschen der einzelnen AS gegen die kleinste chirale AS Alanin, können Positionen in der Primärsequenz identifiziert werden, die für eine biologischen Aktivität essentiell sind. Für die Leitstruktur HP01 konnten mit Hilfe dieser Technik vier besonders kritische Positionen innerhalb der Dekamers identifiziert werden. Insbesondere der Austausch eines Gly nach einem Tetraprolinteil zeigte sich hier als besonders problematisch durch einen drastischen Abfall der antimikrobiellen Aktivität. Aber auch der Austausch innerhalb des viergliedrigen Prolinkerns wirkte sich negativ aus.

Nach Identifizierung der kritischen Positionen folgten nun insgesamt vier Modifikationsstudien um eine Steigerung der antibakteriellen Aktivität zu erreichen. Zunächst wurden Modifikationen innerhalb des zentralen Teils durchgeführt, die in erster Linie auf die Substitution des Lysins durch ein Arginin zielten. Hierdurch konnte jedoch entgegen publizierten Daten nur eine geringfügige Verbesserung erreicht werden, die sich in erster Linie in Form eines besseren Dosis-Wirkungsprofils widerspiegelte.

In einer zweiten Modifizierungsserie wurden Änderungen am N-terminalen Ende vorgenommen. Der N-Terminus nimmt Einfluss auf die Membrantranslokation vieler AMPs. Hier wurden in unseren Arbeiten verschiedene CPP-Motive getestet, sowie homologe Sequenzabschnitte bereits bekannter PrAMPs. Es konnte neben einer deutlich verbesserten Dosisabhängigkeit auch eine Verbesserung der antibakteriellen Aktivität erreicht werden

Daran schloss sich eine dritte Studie an, welche eine Modifizierung der C-terminalen Region zum Ziel hatte. Die C-terminale Region hat einen Einfluss auf die allgemeine antimikrobielle Wirkung und wird in der Literatur auch mit dem Wirkungsspektrum in Verbindung gebracht. So konnte über diese Sequenzen auch die postulierte Minimallänge für PrAMPs für die Translokation via SmbA oder andere Transportersysteme wie sie in gramnegativen Spezies vorkommen, erreicht werden. Hierzu wurden homologe Sequenzen sowie abgewandelte Varianten an die Leitstruktur C-terminal angefügt. Diese Modifizierungen zeigten weitere Verbesserungen hinsichtlich der antimikrobiellen Aktivität.

In einem finalen Modifizierungslauf wurden schließlich die sich positiv auswirkenden Sequenzen sowohl an den C- wie N-terminalen Enden angefügt. Die Änderung beider Termini brachte eine signifikante Verbesserung der antimikrobiellen Wirkung mit sich. So konnte nach Durchlaufen aller Schritte durch das Zusammenfügen zweier Motive an HP01 eine Steigerung des IC_{50} -Wertes von 20,6 nM von HP01 auf 0,24 nM für Derivat BT 112 erreicht werden. Ebenso konnte eine MIC für BT 112 von 3,83 nM nachgewiesen werden.

Den abschließenden Teil des Arbeitspaketes drei umfasste nun noch eine zweite Studie zur zytotoxischen Unbedenklichkeit der erzeugten Derivate. Im Zuge der Modifikationen wurden verschiedene, insbesondere hinsichtlich der zytotoxischen Eigenschaften wichtige, Parameter geändert. Nach den eingangs durchgeführten zytotoxischen Studien an HP01 wurde eine breite Spanne zwischen Wirkkonzentration und dem Auftreten erster zellschädigender Effekte verzeichnet. Zusammenfassend kann für alle Derivate gesagt werden, dass sich keine der Modifikationen negative hinsichtlich zytotoxischer Verträglichkeit auswirkte. So konnte auch hier nach Abschluss der Studie eine Verbesserung der Verträglichkeit des Derivates BT 112 erreicht werden. Erste zellschädigende Effekte zeigten sich erst ab einer 50-fachen Konzentration im Vergleich zur IC_{50} -Wirkkonzentration.

- **Arbeitspaket 4 – Untersuchungen zum Mode of Action und der Targetidentifizierung**

Die zentrale Rolle des Ribosoms und seine Bedeutung für die Proteinbiosynthese sowie die geringe Mutationsneigung aufgrund von Redundanz der ribosomalen RNA (rRNA)-Gene im bakteriellen Genom, machen es zu einem idealen Target für antimikrobielle Wirkstoffe. So nutzen in der Tat eine große Anzahl klassischer Antibiotika diesen Angriffspunkt durch Interaktion mit funktionellen Stellen des Ribosoms. Die Kenntnis der Struktur des Ribosoms und einer Reihe von Ribosom-Antibiotikakomplexen, ermöglichen das rationale Design neuer Inhibitoren, die hochwirksam gegen bakterielle Krankheitserreger sind. Der Vormarsch resistenter Bakterien stellt jedoch eine enorme Herausforderung für das Gesundheitssystem dar, der mit der entsprechenden Entwicklung neuer wirksamer Antibiotikaklassen noch nicht begegnet wurde. Dieser besorgniserregende Trend hat das Interesse im Bereich Forschung und Entwicklung neuer Therapeutika wiedererweckt, insbesondere solcher Wirkstoffe, die sich gegen gramnegative Bakterien richten.

Im Gegensatz zu einem Großteil der AMPs, deren Target die bakterielle Membran darstellt, wird die Mehrheit der eukaryotischen PrAMPs durch spezifische Transportsysteme wie SbmA in gramnegativen Bakterien aktiv über die Bakterienmembran in das Zytoplasma transportiert. In jüngster Zeit wurde berichtet, dass die PrAMPs wie Oncocin und Apidaecin bevorzugt das bakterielle Ribosom angreifen und hemmen. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten unserer Leitstruktur und deren Derivate zu diesen

beiden PrAMPs wurden Untersuchungen zu möglichen Interaktionen mit dem 70S Ribosom aus *E. coli* und *T. thermophilus* durchgeführt. Hierzu wurde erstmal die Technik der Oberflächenplasmonresonanz genutzt und das Ribosom über eine EDC/NHS vermittelte Amidkupplung auf der Goldoberfläche eines SPR-Sensorchips kovalent immobilisiert. In daran anschließenden Bindungsstudien wurde nun die spezifische Wechselwirkung der Leitstruktur sowie deren Derivate mit den 70S Ribosomen beider gramnegativer Mikroorganismen untersucht. Hier konnte für alle Derivate ebenso wie für die Leitstruktur eine spezifische Wechselwirkung identifiziert werden. Der K_D -Wert für die Leitstruktur gegenüber des 70SRibosoms aus *E. coli* konnte mit 1,12 nM bestimmt werden. Die Modifikationen der Leitstruktur zeigten auch hier einen positiven Einfluss auf die Bindungskonstante. Hier konnten für das Derivat BT 112 ein K_D -Wert von 0,83 nM erreicht werden. Ähnlich positiv wirkten sich die Modifikationen auf die K_D -Werte bzgl. der Affinität der Peptide zum 70S Ribosom von *T. thermophilus* aus. Hier konnte für die Leitstruktur eine Bindungskonstante von 1,88 nM erreicht werden, für das Derivat BT 112 betrug der K_D -Wert 1,06nM. Betrachtet man nun kristallographische Aufnahmen der Ribosomen-PrAMP-Komplexe für API88 und Oncocin eines 70S *T. thermophilus* Ribosoms so könnte man auf eine Mischung beider postulierter Bindungsmodi für unsere Peptide schließen.

Die Wechselwirkung der Peptide mit einem intrazellulären Target setzten eine ausreichende Aufnahme in das Zellinnere der Peptide und somit eine erfolgreiche Membrantranslokation voraus. Zur Untersuchung der intrazellulären Aufnahme der Peptide wurde innerhalb dieser Thesis die konfokale Laserscanningmikroskopie genutzt. Mit deren Hilfe kann die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Peptidderivate ins Zellinnere verfolgt werden. Hierzu wurden die Peptide mit einem Fluoreszenzmarker modifiziert und in einer *E. coli* BL21 Bakteriensuspension inkubiert. Es konnte für alle Peptide eine Aufnahme ins Zellinnere der intakten, vitalen *E. coli*-Zellen nachgewiesen werden, allerdings in sehr unterschiedlicher Intensität. Die quantitative Aufnahme korrelierte mit der antimikrobiellen Wirkung der verschiedenen Peptidderivate. So konnte für die Leitstruktur HP01 lediglich ein geringes Maß an Fluoreszenz beobachtet werden, wohingegen die Bakterienzellen nach Aufnahme von BT 112 sehr intensiv fluoreszierten.

Abschließend lässt sich folgendes zusammenfassen:

Die von uns neu identifizierte Leitstruktur HP01 aus dem Speichel des medizinischen Blutegels besaß auch in Form des synthetischen Analogons antimikrobielle Aktivität gegenüber beider Gramgruppen. Ebenso konnte für HP01 eine sehr gute proteolytische Stabilität gegen über Serumproteasen sowie künstlichem Magensaft nachgewiesen werden. Für die Leitstruktur ließ sich ebenfalls eine sehr gute *In-vivo*-Wirkung im Infektionsmodell mit *Galleria mellonella* zeigen.

Nach erfolgreicher Modifikation der Leitstruktur konnten sowohl die IC_{50} -Werte gegenüber *E. coli* BL21 signifikant gesenkt werden, als auch das zytotoxische Potential.

Untersuchungen zur zellulären Aufnahme zeigten, dass alle Peptide ins Zellinnere aufgenommen werden können und somit die antibakterielle Wirkung vermutlich nicht auf unerwünschter Membranolyse beruht, sondern ein intrazelluläres Target als wahrscheinlich gilt. Abschließend konnte hinsichtlich des *Mode of Actions* erste Daten gesammelt werden und nach erfolgreichem Abschluss von SPR-Bindungsstudien das 70S Ribosom als ein mögliches Target identifiziert werden. Insgesamt konnte das vielversprechende Potential dieser Leitstruktur für die mögliche therapeutische Anwendung gezeigt werden.

7 Summary

The overall aim of this thesis was the identification and characterization of a novel antimicrobial peptide of the medicinal leech *Hirudo verbana* as well as investigations of its mode of action and studies on structure – activity relationships. This could be realized in four work packages.

- **First work package – Identification of the AMP in leech salivary secretions**

Antimicrobial resistances (AMR) are directly associated with the presence of multi-resistant microbial pathogens (MRE). They are continuously increasing and represent one of the most important problems in the public health care worldwide. The European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) predicts that about four million patients in the 27 Member States suffer a nosocomial infection every year, approximately 37.000 are lethal. Especially intensive care units are affected. A significant quantity of the lethal cases, approximately 25,000, can be directly associated with the most relevant MRE such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE), Extended Spectrum β lactamase producers (ESBL), multidrug-resistant *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species.

According to EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) another alarming trend is the appearance and expansion of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE), which are especially prevalent in hospitals. These organisms excrete enzymes such as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) or New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM), which can hydrolyze β -lactam antibiotics with high efficiency. Carbapenems are used in human medical care to treat serious nosocomial infections and, according to the WHO, are classified as critically important substances (WHO international 2018). In veterinary medicine, such agents are only applied for off-label use and only for non-food animals. In contrast, a comparison of so-called "critically important substances" in human and veterinary medicine reveals overlaps in the ratings of cephalosporins and fluoroquinolones. Recently, the therapeutic application of different molecules from these drug classes in both livestock animals and pets has triggered numerous controversies about the selectivity of MREs in animals and their role as a potential reservoir and risk of zoonosis. According to all experts, the discovery of novel antimicrobial mechanisms and compounds belongs to the most important global challenges in healthcare.

In this context, the class of antimicrobial peptides, in particular those with specific intracellular targets, is entering the focus of research. We have chosen the medical leech *Hirudo medicinalis* or its close relative *Hirudo verbana* as a potential source for such new AMPs. The natural habitat of leeches contains high levels of organic material as well as a huge diversity of microorganisms. However, only two bacterial species, namely *Aeromonas veronii* and *Rikinellaceae spp.*, colonize the stomach and intestinal tract of the leech and interact symbiotically with the host. This leads to the conclusion that antimicrobial compounds with a high-level activity and wide selectivity could be discovered (Nyholm und Graf 2012).

Initial studies within this thesis demonstrated a significant antimicrobial effect against both gram-negative and gram-positive pathogens. An estimated IC_{50} value of $>31.25 \mu\text{g/mL}$ for *M. luteus* and $62.50 \mu\text{g/mL}$ for *E. coli K12* respectively were determined. After splitting the saliva into four different molecular weight fractions, the low-molecular weight fraction in particular demonstrated significant

growth inhibition of about 70 % versus *M. luteus* and 60 % versus *E. coli* K12. Therefore, further chromatographic separation steps were performed, which finally resulted in an LC-MS/MS analysis with subsequent *Andromeda*-based *de novo* sequencing of two highly active RP-HPLC fractions. A previously unknown peptide sequence was identified, which was sequentially associated to the PrAMP compound class according to its large proline moiety. Throughout the project, the newly identified sequence of a decamer was chemically synthesized and all additional antimicrobial activities were tested exclusively against gram-negative pathogens.

- **Second work package – Synthesis and characterization of HP01**

To verify the antibacterial properties of the identified sequence, a successful chemical synthesis of the discovered decamer is required. Furthermore, the chemical synthesis is the basis for structure-based drug design. Hence, the second part of the thesis initially focused on the chemical synthesis of the identified sequences. A gold standard for the production of synthetic oligopeptides with a sequence length up to approx. 50 AS is the Fmoc-based solid phase peptide synthesis. Here, the peptide sequence is synthesized from C-Terminus to N-Terminus, in retrospect of protein biosynthesis, to a solid support. After coupling of the first amino acid to the resin, a cycle consisting of deprotection of the alpha amino protecting group of the already coupled AS, ensuing activation of the carboxyl function at the C-terminal end of the new AS by Oxyma/DIC and following the coupling will be repeated. Synthesis is carried out in a strictly organic phase, mostly using dimethylformamide. After complete synthesis, a final cleavage of the side chain protection groups of the AS is followed by cleavage from the solid phase and precipitation of the peptide located in the liquid phase. The obtained peptides were analyzed via RP-HPLC and mass spectroscopy. A significant increase in yields and reduction of unwanted racemization was achieved by the use of the next generation fully automated microwave-assisted peptide synthesizers. The microwave-assisted synthesis and the use of preloaded resins resulted in peptide yields of about 90 %.

The sequence which was identified in the saliva of the leech was synthesized as two derivatives and its antimicrobial effects were tested against reference bacteria of both gram groups. Each sequence confirmed the activities that were already identified. IC_{50} values of 10.3 nM could be obtained for both sequence variants for *M. luteus*. For the gram-negative representative *E. coli* K12 differences in the IC_{50} values were observed. HP01 achieved an IC_{50} value of 2.6 nM, while the IC_{50} value of HP02 remained at 10.3 nM, similar to *M. luteus*. Furthermore, the antimicrobial effect of both sequence variants was investigated on multi-resistant members of the ESKAPE family. Compared to multi-resistant *Klebsilla pneumoniae* with resistance genes SHV-11 and KPC-2 as well as OXA-48 and CTX-M15, growth inhibitions up to 50 % could be achieved. As the sequence variant HP01 showed the more promising results in this study, all further investigations were carried out with this sequence variant exclusively.

Subsequent to the confirmation of the antimicrobial effects of the synthetic peptide, its proteolytic stability was analysed more closely. The results obtained in these tests supported to initial conclusions about the possibility of peroral applications, which are essential to achieve good compliance. The HP01 lead structure demonstrated good resistance to serine proteases, aspartyl proteases and matrix metalloproteases. This high proteolytic resistance to individual proteases was confirmed in studies on serum stability as well as in studies on stability in simulated gastric fluid (SGF).

In human serum, the new AMP achieved a half-life of four hours and is therefore significantly better than the average of well-established peptides such as Api88, Lfcin and A3-APO, respectively ranging from 10 to 30 minutes. The resistance in SGF was even better. After 24 hours of incubation no significant decrease of the active compound could be observed.

The excellent proteolysis resistance could be explained by the high prevalence of the amino acid proline in a continuous array of a tetraproline core. For the investigated proteases, these proline multimers are stereochemically inappropriate for establishing an enzyme substrate complex.

Cytotoxic safety is a further key aspect in drug development and frequently a major challenge for many antimicrobial peptides. The development of novel antibacterial drugs depends on the fact that the active compound has a toxic effect on bacterial cells, however, not on mammalian cells. Many AMPs act membranolytically on bacteria and therefore demonstrate a significant cytotoxic potential against mammals. Intracellular targeting AMPs first translocate the membrane and use electrostatic interaction for the initial contact with the bacterial cell. Here, too, the risk of a high cytotoxic effect exists. In order to achieve an efficient enhancement of a lead structure, a broad window between applied drug concentration and first cytotoxic effects is essential. The HeLa cell model is one of the most established *in vitro* methods for the testing of cytotoxic safety. We used this cell culture model for the characterization of our peptides. The surfactant sodium dodecyl sulfate and the cytostatic drug doxorubicin served as control compounds. For HP01 first cell-damaging side-effects were observed above concentrations of 13.4 mM, which is 14 times the administered drug concentration. We can conclude at this point that this lead structure offers great potential, since generally the first cytotoxic effects associated with AMPs occur from 2-4 times the drug concentration.

In a final study included in this work package, first *in vivo* data were generated for HP01. For this purpose, an infection model with larvae of the large wax moth *Galleria mellonella* was used. This model offers several advantages compared to the often-used animal models in mice or rats. One of the major advantages to this infection model is the ability to test bacterial infections at a temperature of 37 °C, since larvae can easily be cultured at these human physiological conditions. This possibility is not provided by other models. The gallery study was split into two partial experiments. First, the larvae were infected with a human pathogenic *E. coli* strain and the antibacterial potential of the peptide was tested at three different concentrations. At the highest concentration used, a mean survival rate of 80 % was observed after seven days. A second test series within this study served to examine the toxicity of the peptide to the larvae of the wax moth. There was no indication of a toxic effect on the galleria at any concentration applied.

- **Third work package – Rational design elements and QSAR – studies**

Structure-based drug design represents a modern approach towards the advanced development of an active ingredient. Generally, following 3D structural analysis of a target, compound libraries are first generated and usually screened *in silico* via so-called docking studies with respect to the computed binding affinity between ligands and macromolecular targets. In this thesis, several derivatives were synthesized via SPPS and tested for their antimicrobial potential within a third working package. Sequences were selected based on already published rational design concepts whereby no target had

yet been identified for the new PrAMP. Subsequently, the selected derivatives were rated on the basis of their structure-activity relationship. The main focus thereby has been on a computer-aided evaluation of key physicochemical parameters such as amphiphilicity, hydrophobicity, helicity and net charge. Freely accessible software tools were used to determine the parameters.

A first step in structure-based drug design for peptidic therapeutics is the evaluation of critical side-chain residues. This can be done by an alanine scan. After successively replacing the AS with the small chiral AS alanine, it is possible to identify positions in the primary sequence necessary for biological activity. With this technique, four particularly critical positions were identified within the decamers with regard to the HP01 lead structure. Especially the replacement of Gly following a tetraproline moiety presented itself as particularly problematic in a drastic decrease of antimicrobial activity. Also, the replacement within the prolinecore had negative effects.

Once the critical positions had been identified, a series of four modification trials were carried out to increase antibacterial activity. Initially, sequence modulations were carried out within the core aiming mainly to substitute lysine by arginine. As a result, however, only a slight improvement could be achieved, reflected predominantly in a better dose-response profile.

A second series of alterations included changes at the N-terminus. In many AMPs, the N-terminus affects membrane translocation. Several CPP motifs have been screened in our work, as well as homologous sequence fragments of existing PrAMPs. Besides a significantly increased dose-dependence, antibacterial activity was significantly improved. Subsequently, a third study was carried out with the objective of improving the C-terminal region. The C-terminal region affects the general antimicrobial activity and has been associated with its spectrum of efficacy reported in literature. The postulated minimum length for PrAMPs for translocation via SmbA or other transporter systems present in gram-negative species was also achieved via these sequences. For this purpose, homologous sequences and modulated variants were attached directly to the lead structures C-terminal region. This modification revealed a further increase in antimicrobial activity.

In a final modification process, the optimal sequence resulting for the C- and N-terminal alterations were combined. Changing both terms significantly improved the antimicrobial effect. In this way, an increase in the IC_{50} value from 20.6 nM of HP01 to 0.24 nM for derivative BT 112 was achieved by combining two motifs with HP01. Similarly, a MIC for BT 112 of 3.83 nM could be determined.

The final part of work package three included a second study on the cytotoxic compatibility of the generated derivatives. During the design stages, various parameters of particular importance with respect to cytotoxic properties have been changed. According to the cytotoxic studies on HP01 performed at the beginning, a wide range of drug concentration the occurrence of first cell-damaging effects has been observed. As final conclusion we can state that none of the modifications had a negative effect on cytotoxic tolerance. Thus, an increase in the tolerance of BT112 could also be achieved after termination the study. First cell-damaging side-effects started to appear at 50 times the amount of active substance being used.

- **Fourth work package – Investigations on mode of action and target identification**

The major function of the ribosome and its importance in protein biosynthesis as well as the low tendency towards mutation due to the redundancy of ribosomal RNA (rRNA) genes in the bacterial genome makes the ribosome an ideal target for antimicrobial agents. In fact, large numbers of classical antibiotics use this target by interacting with ribosomal functional sites. Understanding the structure of the ribosome and a variety of ribosome antibiotic complexes allows rational design of novel inhibitors highly effective against bacterial pathogens. However, the rise of resistant bacteria poses a tremendous challenge to the public health care system, for which the development of new classes of potent antibiotics has not yet been achieved. This alarming development has sparked renewed interest in research and development of novel therapeutics, in particular those targeting gram-negative bacteria.

In contrary to the majority of AMPs which target the bacterial membrane, the majority of eukaryotic PrAMPs are actively translocated to the cytoplasm via specific transport systems such as SbmA in gram-negative bacteria. Recently, it has been reported that PrAMPs such as oncocin and apidaecin predominantly target and inhibit the bacterial ribosome. Based on structural similarities among our lead structure and its derivatives with these two PrAMPs, studies were performed on possible interactions with the 70S ribosome of *E. coli* and *T. thermophilus*.

For this, surface plasmon resonance was used initially. The ribosome was covalently immobilised onto the gold surface of a SPR sensor chip via an EDC/NHS-mediated amide coupling. Thereafter, binding studies were performed investigating the specific interaction of the lead structure and its derivatives to the 70S ribosomes of both gram-negative microorganisms. A specific interaction was identified for all derivatives as well as for the lead structure.

The K_D value of the lead structure for the 70S ribosome of *E. coli* was estimated at 1.12 nM. The modifications of the lead structure also demonstrated a positive influence on the binding constant. A K_D value of 0.83 nM could be generated for BT 112. The modifications had a similar beneficial effect on the K_D values regarding the affinity of the peptides towards the 70S ribosome of *T. thermophilus*. Here, a binding constant of 1.88 nM could be reached for the lead structure and for BT 112 the K_D value amounted 1.06 nM. Looking at protein crystallographic data of the ribosome PrAMP complexes for API88 and Oncocin for 70S *T. thermophilus* ribosomes, a combination of both postulated binding modes could be expected regarding our peptides. Peptide interaction with an intracellular target requires sufficient uptake into the cell and therefore successful membrane translocation. Confocal laser scanning microscopy was used to study the intracellular uptake of the peptides. The uptake of fluorescence-labelled peptide derivatives into the cell can be tracked by this method. The peptides were modified with a fluorescence label and incubated with a bacterial suspension of *E. coli* BL21. The uptake of all peptides into intact, vital *E. coli* cells could be demonstrated, however, showing very different intensities. Quantitative uptake correlated with the antimicrobial effect of the different peptide derivatives. Thus, for HP01 only a small level of fluorescence could be observed, compared to the intensive fluorescence of the bacterial cells after uptake of BT 112.

Finally, it can be summarised:

The novel identified lead structure HP01 found in the saliva of the medical leech demonstrated antimicrobial activity against both Gram groups. Furthermore, HP01 possessed an excellent proteolytic stability towards serum proteases and artificial gastric juice. The lead structure also performed very well *in vivo* with *Galleria mellonella*.

After successful modification of the lead structure, both the IC_{50} values compared to *E. coli* and the cytotoxic response could be significantly reduced.

Investigations on cellular uptake demonstrated that all peptides can be transported into the cell and the antibacterial effect is suspected not to be caused by undesirable membraneolysis, however, an intracellular target is suspected. Subsequently, first data concerning the mode of action were collected and after successfully performing SPR binding studies the 70S ribosome was suggested to be a possible target. Based on this, we were able to demonstrate the very promising potential of our lead structure to be used for therapeutic purposes.

8 Literaturverzeichnis

- Abdualkader, A. M.; Ghawi, A. M.; Alaama, M.; Awang, M.; Merzouk, A. (2013): Leech therapeutic applications. *Indian journal of pharmaceutical sciences* 75 (2), S. 127–137.
- Abdullah, Swaid; Dar, Latief; Rashid, Adil; Tewari, Anita (2012): Hirudotherapy /Leech therapy: Applications and Indications in Surgery. *Arch Clin Exp Surg* 1 (3), S. 172. DOI: 10.5455/aces.20120402072447.
- Adzhubei, Alexei A.; Sternberg, Michael J. E.; Makarov, Alexander A. (2013): Polyproline-II helix in proteins: structure and function. *Journal of molecular biology* 425 (12), S. 2100–2132. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.03.018.
- Amblard, Muriel; Fehrentz, Jean-Alain; Martinez, Jean; Subra, Gilles (2006): Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular Biotechnology* 33 (3), S. 239–254. DOI: 10.1385/MB:33:3:239.
- Andersson, D. I.; Hughes, D.; Kubicek-Sutherland, J. Z. (2016): Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 26, S. 43–57. DOI: 10.1016/j.drug.2016.04.002.
- Andricopulo, Adriano D.; Salum, Livia B.; Abraham, Donald J. (2009): Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Current topics in medicinal chemistry* 9 (9), S. 771–790.
- Baars, Oliver; Perlman, David H. (2016): Small Molecule LC-MS/MS Fragmentation Data Analysis and Application to Siderophore Identification. In: Jan Valdman (Hg.): Applications from Engineering with MATLAB Concepts: InTech.
- Bachere, Evelyne; Gueguen, Yannick; Gonzalez, Marcelo; Lorget, Julien de; Garnier, Julien; Romestand, Bernard (2004): Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* 198 (1), S. 149–168. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00115.x.
- Baskova, I. P.; Kharitonova, O. V.; Zavalova, L. L. (2011): Lysozyme activity of the salivary gland secretion of the medicinal leech *H. verbana*, *H. medicinalis* and *H. orientalis*. *Biomeditsinskaja khimija* 57 (5), S. 511–518.
- Baskova, I. P.; Kostjukova, E. S.; Vlasova, M. A.; Kharitonova, O. V.; Levitskiy, S. A.; Zavalova, L. L. et al. (2008a): Proteins and peptides of the salivary gland secretion of medicinal leeches *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis*. *Biochemistry Moscow* 73 (3), S. 315–320. DOI: 10.1134/S0006297908030127.
- Baskova, I. P.; Kostjukova, E. S.; Vlasova, M. A.; Kharitonova, O. V.; Levitskiy, S. A.; Zavalova, L. L. et al. (2008b): Proteins and peptides of the salivary gland secretion of medicinal leeches *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis*. *Biochemistry Moscow* 73 (3), S. 315–320.
- Bechara, Chérine; Sagan, Sandrine (2013): Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters* 587 (12), S. 1693–1702. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.04.031.

- Behrendt, Raymond; White, Peter; Offer, John (2016): Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 22 (1), S. 4–27. DOI: 10.1002/psc.2836.
- Benincasa, Monica; Pacor, Sabrina; Gennaro, Renato; Scocchi, Marco (2009): Rapid and reliable detection of antimicrobial peptide penetration into gram-negative bacteria based on fluorescence quenching. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (8), S. 3501–3504. DOI: 10.1128/AAC.01620-08.
- Benincasa, Monica; Pelillo, Chiara; Zorzet, Sonia; Garrovo, Chiara; Biffi, Stefania; Gennaro, Renato; Scocchi, Marco (2010): The proline-rich peptide Bac7(1-35) reduces mortality from *Salmonella typhimurium* in a mouse model of infection. *BMC microbiology* 10, S. 178. DOI: 10.1186/1471-2180-10-178.
- Benincasa, Monica; Scocchi, Marco; Podda, Elena; Skerlavaj, Barbara; Dolzani, Lucilla; Gennaro, Renato (2004): Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. *Peptides* 25 (12), S. 2055–2061. DOI: 10.1016/j.peptides.2004.08.004.
- Berthold, Nicole; Czihal, Patricia; Fritsche, Stefanie; Sauer, Ute; Schiffer, Guido; Knappe, Daniel et al. (2013): Novel apidaecin 1b analogs with superior serum stabilities for treatment of infections by gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (1), S. 402–409. DOI: 10.1128/AAC.01923-12.
- Berthold, Nicole; Hoffmann, Ralf (2014): Cellular uptake of apidaecin 1b and related analogs in Gram-negative bacteria reveals novel antibacterial mechanism for proline-rich antimicrobial peptides. *Protein and peptide letters* 21 (4), S. 391–398.
- Biemann, K. (1988): Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomedical & environmental mass spectrometry* 16 (1-12), S. 99–111.
- Biswas, Subhanip; Garcia De Gonzalo, Chantal V.; Repka, Lindsay M.; van der Donk, Wilfred A. (2017): Structure-Activity Relationships of the S-Linked Glycocin Sublancin. *ACS chemical biology* 12 (12), S. 2965–2969. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00819.
- Bluhm, Martina E. C.; Knappe, Daniel; Hoffmann, Ralf (2015): Structure-activity relationship study using peptide arrays to optimize Api137 for an increased antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of medicinal chemistry* 103, S. 574–582. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.09.022.
- Böhm, Hans-Joachim; Klebe, Gerhard; Kubinyi, Hugo (2002): Wirkstoffdesign. Der Weg zum Arzneimittel. Unveränd. Nachdr. d. 1. Aufl. 1996. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. (Spektrum Lehrbuch).
- Boman, H. G.; Agerberth, B.; Boman, A. (1993): Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and Immunity* 61 (7), S. 2978–2984.
- Boman, H. G.; Hultmark, D. (1987): Cell-free immunity in insects. *Annual review of microbiology* 41, S. 103–126. DOI: 10.1146/annurev.mi.41.100187.000535.

- Bowdish, Dawn M. E.; Davidson, Donald J.; Lau, Y. Elaine; Lee, Ken; Scott, Monisha G.; Hancock, Robert E. W. (2005): Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of leukocyte biology* 77 (4), S. 451–459. DOI: 10.1189/jlb.0704380.
- Breukink, E.; Wiedemann, I.; van Kraaij, C.; Kuipers, O. P.; Sahl, H. G.; Kruijff, B. de (1999): Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science (New York, N.Y.)* 286 (5448), S. 2361–2364.
- Brogden, Kim A. (2005): Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology* 3 (3), S. 238–250. DOI: 10.1038/nrmicro1098.
- Bücker Petra (2007): Integration von Rezeptoren in inerte Matrices zur markierungsfreien und quantitativen Detektion biospezifischer Wechselwirkungen mit LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen. Dissertation.
- Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, J. L.; Hoffmann, D. (1999): Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and comparative immunology* 23 (4-5), S. 329–344.
- Cabiaux, V.; Agerberth, B.; Johansson, J.; Homblé, F.; Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J. M. (1994): Secondary structure and membrane interaction of PR-39, a Pro+Arg-rich antibacterial peptide. *European journal of biochemistry* 224 (3), S. 1019–1027.
- Casteels, P.; Ampe, C.; Jacobs, F.; Vaeck, M.; Tempst, P. (1989): Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* 8 (8), S. 2387–2391.
- Casteels, P.; Tempst, P. (1994): Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199 (1), S. 339–345. DOI: 10.1006/bbrc.1994.1234.
- Chan, Y. R.; Zanetti, M.; Gennaro, R.; Gallo, R. L. (2001): Anti-microbial activity and cell binding are controlled by sequence determinants in the anti-microbial peptide PR-39. *The Journal of investigative dermatology* 116 (2), S. 230–235. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2001.01231.x.
- Chen, Yuxin; Guarnieri, Michael T.; Vasil, Adriana I.; Vasil, Michael L.; Mant, Colin T.; Hodges, Robert S. (2007): Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (4), S. 1398–1406. DOI: 10.1128/AAC.00925-06.
- Chen, Yuxin; Mant, Colin T.; Farmer, Susan W.; Hancock, Robert E. W.; Vasil, Michael L.; Hodges, Robert S. (2005): Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *The Journal of biological chemistry* 280 (13), S. 12316–12329. DOI: 10.1074/jbc.M413406200.
- Cheng, John T. J.; Hale, John D.; Elliot, Melissa; Hancock, Robert E. W.; Straus, Suzana K. (2009): Effect of membrane composition on antimicrobial peptides aurein 2.2 and 2.3 from Australian southern bell frogs. *Biophysical journal* 96 (2), S. 552–565. DOI: 10.1016/j.bpj.2008.10.012.
- Cherniack, E. Paul (2011): Bugs as drugs, part two: worms, leeches, scorpions, snails, ticks, centipedes, and spiders. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 16 (1), S. 50–58.

Coon, Joshua J.; Syka, John E. P.; Shabanowitz, Jeffrey; Hunt, Donald F. (2005): Tandem mass spectrometry for peptide and protein sequence analysis. *BioTechniques* 38 (4), 519, 521, 523. DOI: 10.2144/05384TE01.

Cox, Jürgen; Neuhauser, Nadin; Michalski, Annette; Scheltema, Richard A.; Olsen, Jesper V.; Mann, Matthias (2011): Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of proteome research* 10 (4), S. 1794–1805. DOI: 10.1021/pr101065j.

Czihal, Patricia; Knappe, Daniel; Fritsche, Stefanie; Zahn, Michael; Berthold, Nicole; Piantavigna, Stefania et al. (2012): Api88 is a novel antibacterial designer peptide to treat systemic infections with multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *ACS chemical biology* 7 (7), S. 1281–1291. DOI: 10.1021/cb300063v.

da Mata, Élide Cleyse Gomes; Mourão, Caroline Barbosa Farias; Rangel, Marisa; Schwartz, Elisabeth Ferroni (2017): Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* 23, S. 3. DOI: 10.1186/s40409-016-0089-0.

Dathe, M.; Wieprecht, T.; Nikolenko, H.; Handel, L.; Maloy, W. L.; MacDonald, D. L. et al. (1997): Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Letters* 403 (2), S. 208–212.

Dathe, Margitta; Nikolenko, Heike; Meyer, Jana; Beyermann, Michael; Bienert, Michael (2001): Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters* 501 (2-3), S. 146–150. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02648-5.

Destoumieux, D.; Bulet, P.; Strub, J. M.; van Dorsselaer, A.; Bachère, E. (1999): Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *European journal of biochemistry* 266 (2), S. 335–346.

Dhople, Vishnu; Krukemeyer, Amy; Ramamoorthy, Ayyalusamy (2006): The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochimica et biophysica acta* 1758 (9), S. 1499–1512. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.07.007.

dos Santos Cabrera, M. P.; Souza, B. M. de; Fontana, R.; Konno, K.; Palma, M. S.; Azevedo, W. F. de; Neto, J. Ruggiero (2004): Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society* 64 (3), S. 95–103. DOI: 10.1111/j.1399-3011.2004.00173.x.

Dutta, Ranjna C.; Nagpal, Sushma; Salunke, Dinakar M. (2008): Functional mapping of apidaecin through secondary structure correlation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40 (5), S. 1005–1015. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.11.005.

Eisenberg, D.; Weiss, R. M.; Terwilliger, T. C. (1982): The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* 299 (5881), S. 371–374.

Eldor, A.; Orevi, M.; Rigbi, M. (1996): The role of the leech in medical therapeutics. *Blood Reviews* 10 (4), S. 201–209. DOI: 10.1016/S0268-960X(96)90000-4.

- El-Faham, Ayman; Albericio, Fernando (2011): Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chemical reviews* 111 (11), S. 6557–6602. DOI: 10.1021/cr100048w.
- Elliott, J. Malcolm; Kutschera, Ulrich (2011): Medicinal Leeches: Historical use, Ecology, Genetics and Conservation. *Freshwater Reviews* 4 (1), S. 21–41. DOI: 10.1608/FRJ-4.1.417.
- Engelhardt, Johann; Knebel, Werner (1993): Konfokale Laserscanning-Mikroskopie. *Phys. Unserer Zeit* 24 (2), S. 70–78. DOI: 10.1002/piuz.19930240207.
- Epand, Richard M.; Walker, Chelsea; Epand, Raquel F.; Magarvey, Nathan A. (2016): Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et biophysica acta* 1858 (5), S. 980–987. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.10.018.
- Fa. Biacore / GE (2016): BiacoreSensorHandbook. Hg. v. Biacore.
- Falcao, Claudio Borges; Pérez-Peinado, Clara; La Torre, Beatriz G. de; Mayol, Xavier; Zamora-Carreras, Héctor; Jiménez, M. Ángeles et al. (2015): Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity. *Journal of medicinal chemistry* 58 (21), S. 8553–8563. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01142.
- Falla, T. J.; Karunaratne, D. N.; Hancock, R. E. (1996): Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *The Journal of biological chemistry* 271 (32), S. 19298–19303.
- Felício, Mário R.; Silva, Osmar N.; Gonçalves, Sônia; Santos, Nuno C.; Franco, Octávio L. (2017): Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in chemistry* 5, S. 5. DOI: 10.3389/fchem.2017.00005.
- Fernandez, David I.; Le Brun, Anton P.; Whitwell, Thomas C.; Sani, Marc-Antoine; James, Michael; Separovic, Frances (2012): The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 14 (45), S. 15739–15751. DOI: 10.1039/c2cp43099a.
- Fernández-Vidal, Mónica; Jayasinghe, Sajith; Ladokhin, Alexey S.; White, Stephen H. (2007): Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity. *Journal of molecular biology* 370 (3), S. 459–470. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.05.016.
- Florin, Tanja; Maracci, Cristina; Graf, Michael; Karki, Prajwal; Klepacki, Dorota; Berninghausen, Otto et al. (2017): An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome. *Nature structural & molecular biology* 24 (9), S. 752–757. DOI: 10.1038/nsmb.3439.
- Fox, Jeffrey L. (2013): Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nature biotechnology* 31 (5), S. 379–382. DOI: 10.1038/nbt.2572.
- Frank, R. W.; Gennaro, R.; Schneider, K.; Przybylski, M.; Romeo, D. (1990): Amino acid sequences of two proline-rich bactenecins. Antimicrobial peptides of bovine neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 265 (31), S. 18871–18874.
- Franken, C.; Meijer, C. J.; Dijkman, J. H. (1989): Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 37 (4), S. 493–498. DOI: 10.1177/37.4.2926127.

- Friedrich, C. L.; Rozek, A.; Patrzykat, A.; Hancock, R. E. (2001): Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. *The Journal of biological chemistry* 276 (26), S. 24015–24022. DOI: 10.1074/jbc.M009691200.
- Gagnon, Marie-Claude; Strandberg, Erik; Grau-Campistany, Ariadna; Wadhvani, Parvesh; Reichert, Johannes; Bürck, Jochen et al. (2017): Influence of the Length and Charge on the Activity of α -Helical Amphipathic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry* 56 (11), S. 1680–1695. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01071.
- Gagnon, Matthieu G.; Roy, Raktim N.; Lomakin, Ivan B.; Florin, Tanja; Mankin, Alexander S.; Steitz, Thomas A. (2016): Structures of proline-rich peptides bound to the ribosome reveal a common mechanism of protein synthesis inhibition. *Nucleic acids research* 44 (5), S. 2439–2450. DOI: 10.1093/nar/gkw018.
- Ganesan, A. (2008): The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current opinion in chemical biology* 12 (3), S. 306–317. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.03.016.
- Ge, Yigong; MacDonald, Dorothy L.; Holroyd, Kenneth J.; Thornsberry, Clyde; Wexler, Hannah; Zasloff, Michael (1999): In Vitro Antibacterial Properties of Pexiganan, an Analog of Magainin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (4), S. 782–788.
- Gennaro, R.; Skerlavaj, B.; Romeo, D. (1989): Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infection and Immunity* 57 (10), S. 3142–3146.
- Gennaro, Renato; Zanetti, Margherita; Benincasa, Monica; Podda, Elena; Miani, Monica (2002): Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Current pharmaceutical design* 8 (9), S. 763–778.
- Ghiselli, Roberto; Giacometti, Andrea; Cirioni, Oscar; Circo, Raffaella; Mocchegiani, Federico; Skerlavaj, Barbara et al. (2003): Neutralization of endotoxin in vitro and in vivo by Bac7(1-35), a proline-rich antibacterial peptide. *Shock (Augusta, Ga.)* 19 (6), S. 577–581. DOI: 10.1097/01.shk.0000055236.26446.c9.
- Gleason, Nicholas J.; Vostrikov, Vitaly V.; Greathouse, Denise V.; Koeppe, Roger E. (2013): Buried lysine, but not arginine, titrates and alters transmembrane helix tilt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (5), S. 1692–1695. DOI: 10.1073/pnas.1215400110.
- Gobbo, Marina; Benincasa, Monica; Bertoloni, Giulio; Biondi, Barbara; Dosselli, Ryan; Papini, Emanuele et al. (2009): Substitution of the arginine/leucine residues in apidaecin Ib with peptoid residues: effect on antimicrobial activity, cellular uptake, and proteolytic degradation. *Journal of medicinal chemistry* 52 (16), S. 5197–5206. DOI: 10.1021/jm900396a.
- Göblyös, Anikó; Schimmel, Kirsten J. M.; Valentijn, A. Rob P. M.; Fathers, Lorainne M.; Cordfunke, Robert A.; Chan, Hee Lam et al. (2013): Development of a nose cream containing the synthetic antimicrobial peptide P60.4Ac for eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. *Journal of pharmaceutical sciences* 102 (10), S. 3539–3544. DOI: 10.1002/jps.23695.

- Goumon, Y.; Strub, J. M.; Moniatte, M.; Nullans, G.; Poteur, L.; Hubert, P. et al. (1996): The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. *European journal of biochemistry* 235 (3), S. 516–525.
- Graf, Michael; Mardirossian, Mario; Nguyen, Fabian; Seefeldt, A. Carolin; Guichard, Gilles; Scocchi, Marco et al. (2017): Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis. *Natural product reports* 34 (7), S. 702–711. DOI: 10.1039/c7np00020k.
- Gueguen, Yannick; Bernard, Romestand; Julie, Fievet; Paulina, Schmitt; Delphine, Destoumieux-Garzón; Franck, Vandenbulcke et al. (2009): Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Molecular immunology* 46 (4), S. 516–522. DOI: 10.1016/j.molimm.2008.07.021.
- Guida, Filomena; Benincasa, Monica; Zahariev, Sotir; Scocchi, Marco; Berti, Federico; Gennaro, Renato; Tossi, Alessandro (2015): Effect of size and N-terminal residue characteristics on bacterial cell penetration and antibacterial activity of the proline-rich peptide Bac7. *Journal of medicinal chemistry* 58 (3), S. 1195–1204. DOI: 10.1021/jm501367p.
- Guido, Rafael V. C.; Oliva, Glaucius (2009): Structure-based drug discovery for tropical diseases. *Current topics in medicinal chemistry* 9 (9), S. 824–843.
- Guido, Rafael V. C.; Oliva, Glaucius; Andricopulo, Adriano D. (2008): Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Current medicinal chemistry* 15 (1), S. 37–46.
- Guilhelmelli, Fernanda; Vilela, Nathália; Albuquerque, Patrícia; Derengowski, Lorena da S.; Silva-Pereira, Ildinete; Kyaw, Cynthia M. (2013): Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in microbiology* 4, S. 353. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00353.
- Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. (2000): Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. (Chem. Rev. 2000, 100, 2091. Published on the web may 6, 2000). *Chemical reviews* 100 (10), S. 3859.
- Hancock, Robert E. W.; Brown, Kelly L.; Mookherjee, Neeloffer (2006): Host defence peptides from invertebrates--emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* 211 (4), S. 315–322. DOI: 10.1016/j.imbio.2005.10.017.
- Hancock, Robert E. W.; Chapple, Daniel S. (1999): Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (6), S. 1317–1323.
- Hancock, Robert E. W.; Haney, Evan F.; Gill, Erin E. (2016): The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nature reviews. Immunology* 16 (5), S. 321–334. DOI: 10.1038/nri.2016.29.
- Hancock, Robert E. W.; Sahl, Hans-Georg (2006): Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology* 24 (12), S. 1551–1557. DOI: 10.1038/nbt1267.
- Haney, Evan F.; Hancock, Robert E. W. (2013): Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Biopolymers* 100 (6), S. 572–583. DOI: 10.1002/bip.22250.

Hansen, Anne; Schäfer, Ingo; Knappe, Daniel; Seibel, Peter; Hoffmann, Ralf (2012): Intracellular toxicity of proline-rich antimicrobial peptides shuttled into mammalian cells by the cell-penetrating peptide penetratin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (10), S. 5194–5201. DOI: 10.1128/AAC.00585-12.

Hawrani, Ayman; Howe, Robin A.; Walsh, Timothy R.; Dempsey, Christopher E. (2008): Origin of low mammalian cell toxicity in a class of highly active antimicrobial amphipathic helical peptides. *The Journal of biological chemistry* 283 (27), S. 18636–18645. DOI: 10.1074/jbc.M709154200.

Herlin, C.; Bertheuil, N.; Bekara, F.; Boissiere, F.; Sinna, R.; Chaput, B. (2017): Leech therapy in flap salvage: Systematic review and practical recommendations. *Annales de chirurgie plastique et esthétique* 62 (2), e1-e13. DOI: 10.1016/j.anplas.2016.06.004.

Hilchie, Ashley L.; Wuerth, Kelli; Hancock, Robert E. W. (2013): Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature chemical biology* 9 (12), S. 761–768. DOI: 10.1038/nchembio.1393.

Hildebrandt, Jan-Peter; Lemke, Sarah (2011): Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Die Naturwissenschaften* 98 (12), S. 995–1008. DOI: 10.1007/s00114-011-0859-z.

Homola, Jirí (2003): Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and bioanalytical chemistry* 377 (3), S. 528–539. DOI: 10.1007/s00216-003-2101-0.

Hong, S. (2001): The effect of charge increase on the specificity and activity of a short antimicrobial peptide. *Peptides* 22 (10), S. 1669–1674. DOI: 10.1016/S0196-9781(01)00502-2.

Honório, Káthia M.; Garratt, Richard C.; Polikarpov, Igor; Andricopulo, Adriano D. (2007): 3D QSAR comparative molecular field analysis on nonsteroidal farnesoid X receptor activators. *Journal of molecular graphics & modelling* 25 (6), S. 921–927. DOI: 10.1016/j.jm gm.2006.09.003.

Houston, M. E.; Kondejewski, L. H.; Karunaratne, D. N.; Gough, M.; Fidai, S.; Hodges, R. S.; Hancock, R. E. (1998): Influence of preformed alpha-helix and alpha-helix induction on the activity of cationic antimicrobial peptides. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society* 52 (2), S. 81–88.

Huang, H. J.; Ross, C. R.; Blecha, F. (1997): Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. *Journal of leukocyte biology* 61 (5), S. 624–629.

Huang, Yibing; Huang, Jinfeng; Chen, Yuxin (2010): Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & Cell* 1 (2), S. 143–152. DOI: 10.1007/s13238-010-0004-3.

Isidro-Llobet, Albert; Alvarez, Mercedes; Albericio, Fernando (2009): Amino acid-protecting groups. *Chemical reviews* 109 (6), S. 2455–2504. DOI: 10.1021/cr800323s.

Iwanaga, S.; Kawabata, S. (1998): Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 3, D973-84.

- Jenssen, Håvard; Hamill, Pamela; Hancock, Robert E. W. (2006): Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 19 (3), S. 491–511. DOI: 10.1128/CMR.00056-05.
- Jiang, Ziqing; Vasil, Adriana I.; Gera, Lajos; Vasil, Michael L.; Hodges, Robert S. (2011): Rational design of α -helical antimicrobial peptides to target Gram-negative pathogens, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: utilization of charge, 'specificity determinants,' total hydrophobicity, hydrophobe type and location as design parameters to improve the therapeutic ratio. *Chemical biology & drug design* 77 (4), S. 225–240. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2011.01086.x.
- Jiang, Ziqing; Vasil, Adriana I.; Hale, John D.; Hancock, Robert E. W.; Vasil, Michael L.; Hodges, Robert S. (2008): Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers* 90 (3), S. 369–383. DOI: 10.1002/bip.20911.
- Jouhet, Juliette (2013): Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in plant science* 4, S. 494. DOI: 10.3389/fpls.2013.00494.
- Kauffman, W. Berkeley; Fuselier, Taylor; He, Jing; Wimley, William C. (2015): Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides. *Trends in biochemical sciences* 40 (12), S. 749–764. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.10.004.
- Kim, Jin-Young; Park, Seong-Cheol; Yoon, Moon-Young; Hahm, Kyung-Soo; Park, Yoonkyung (2011): C-terminal amidation of PMAP-23: translocation to the inner membrane of Gram-negative bacteria. *Amino acids* 40 (1), S. 183–195. DOI: 10.1007/s00726-010-0632-1.
- Knappe, Daniel; Adermann, Knut; Hoffmann, Ralf (2015): Oncocin Onc72 is efficacious against antibiotic-susceptible *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816 in a murine thigh infection model. *Biopolymers* 104 (6), S. 707–711. DOI: 10.1002/bip.22668.
- Knappe, Daniel; Fritsche, Stefanie; Alber, Gottfried; Köhler, Gabriele; Hoffmann, Ralf; Müller, Uwe (2012): Oncocin derivative Onc72 is highly active against *Escherichia coli* in a systemic septicemia infection mouse model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 67 (10), S. 2445–2451. DOI: 10.1093/jac/dks241.
- Knappe, Daniel; Piantavigna, Stefania; Hansen, Anne; Mechler, Adam; Binas, Annegret; Nolte, Oliver et al. (2010): Oncocin (VDKPPYLPRPRPRRIYNR-NH₂): a novel antibacterial peptide optimized against gram-negative human pathogens. *Journal of medicinal chemistry* 53 (14), S. 5240–5247. DOI: 10.1021/jm100378b.
- Knappe, Daniel; Ruden, Serge; Langanke, Stefanie; Tikoo, Tarun; Ritzer, Jennifer; Mikut, Ralf et al. (2016): Optimization of oncocin for antibacterial activity using a SPOT synthesis approach: extending the pathogen spectrum to *Staphylococcus aureus*. *Amino acids* 48 (1), S. 269–280. DOI: 10.1007/s00726-015-2082-2.
- Knappe, Daniel; Zahn, Michael; Sauer, Ute; Schiffer, Guido; Sträter, Norbert; Hoffmann, Ralf (2011): Rational design of oncocin derivatives with superior protease stabilities and antibacterial activities based on the high-resolution structure of the oncocin-DnaK complex. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 12 (6), S. 874–876. DOI: 10.1002/cbic.201000792.

- Kobayashi, S.; Takeshima, K.; Park, C. B.; Kim, S. C.; Matsuzaki, K. (2000): Interactions of the novel antimicrobial peptide buforin 2 with lipid bilayers: proline as a translocation promoting factor. *Biochemistry* 39 (29), S. 8648–8654.
- Konkel, M. E.; Tilly, K. (2000): Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes and infection* 2 (2), S. 157–166.
- Kragol, G.; Lovas, S.; Varadi, G.; Condie, B. A.; Hoffmann, R.; Otvos, L. (2001): The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 40 (10), S. 3016–3026.
- Kragol, Goran; Hoffmann, Ralf; Chattergoon, Michael A.; Lovas, Sandor; Cudic, Mare; Bulet, Philippe et al. (2002): Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the proline-rich peptide, pyrrolicorin. *European journal of biochemistry* 269 (17), S. 4226–4237.
- Kreil, G. (1997): D-amino acids in animal peptides. *Annual review of biochemistry* 66, S. 337–345. DOI: 10.1146/annurev.biochem.66.1.337.
- Krizsan, Andor; Knappe, Daniel; Hoffmann, Ralf (2015a): Influence of the yjiL-mdtM Gene Cluster on the Antibacterial Activity of Proline-Rich Antimicrobial Peptides Overcoming Escherichia coli Resistance Induced by the Missing SbmA Transporter System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (10), S. 5992–5998. DOI: 10.1128/AAC.01307-15.
- Krizsan, Andor; Prah, Caroline; Goldbach, Tina; Knappe, Daniel; Hoffmann, Ralf (2015b): Short Proline-Rich Antimicrobial Peptides Inhibit Either the Bacterial 70S Ribosome or the Assembly of its Large 50S Subunit. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 16 (16), S. 2304–2308. DOI: 10.1002/cbic.201500375.
- Krizsan, Andor; Volke, Daniela; Weinert, Stefanie; Sträter, Norbert; Knappe, Daniel; Hoffmann, Ralf (2014): Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70S ribosome. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 53 (45), S. 12236–12239. DOI: 10.1002/anie.201407145.
- Kubyskhin, Vladimir; Grage, Stephan L.; Bürck, Jochen; Ulrich, Anne S.; Budisa, Nediljko (2018): Transmembrane Polyproline Helix. *The journal of physical chemistry letters* 9 (9), S. 2170–2174. DOI: 10.1021/acs.jpcclett.8b00829.
- Kustanovich, Irina; Shalev, Deborah E.; Mikhlin, Masha; Gaidukov, Leonid; Mor, Amram (2002): Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives. *The Journal of biological chemistry* 277 (19), S. 16941–16951. DOI: 10.1074/jbc.M111071200.
- Le, Cheng-Foh; Fang, Chee-Mun; Sekaran, Shamala Devi (2017): Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (4). DOI: 10.1128/AAC.02340-16.
- Lee, Dong Gun; Kim, Hee Nam; Park, Yoonkyung; Kim, Hyung Keun; Choi, Bo Hwa; Choi, Cheol-Hee; Hahm, Kyung-Soo (2002): Design of novel analogue peptides with potent antibiotic activity based on the antimicrobial peptide, HP (2-20), derived from N-terminus of Helicobacter pylori ribosomal protein L1. *Biochimica et biophysica acta* 1598 (1-2), S. 185–194.

Lee, Tzong-Hsien; Hall, Kristopher N.; Aguilar, Marie-Isabel (2016): Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current topics in medicinal chemistry* 16 (1), S. 25–39.

Leeuw, Erik de; Li, Changqing; Zeng, Pengyun; Li, Chong; Diepeveen-de Buin, Marlies; Lu, Wei-Yue et al. (2010): Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II. *FEBS Letters* 584 (8), S. 1543–1548. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.03.004.

Lehrer, Robert I.; Ganz, Tomas (2002): Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Current opinion in hematology* 9 (1), S. 18–22.

Li, Jianxu; Xu, Xueqing; Yu, Haining; Yang, Hailong; Huang, Zhongxian; Lai, Ren (2006a): Direct antimicrobial activities of PR-bombesin. *Life sciences* 78 (17), S. 1953–1956. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.08.034.

Li, Wei-Fen; Ma, Guo-Xia; Zhou, Xu-Xia (2006b): Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides* 27 (9), S. 2350–2359. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.03.016.

Li, Wenyi; Sun, Zhe; O'Brien-Simpson, Neil M.; Otvos, Laszlo; Reynolds, Eric C.; Hossain, Mohammed A. et al. (2017): The Effect of Selective D- or N α -Methyl Arginine Substitution on the Activity of the Proline-Rich Antimicrobial Peptide, Chex1-Arg20. *Frontiers in chemistry* 5, S. 1. DOI: 10.3389/fchem.2017.00001.

Li, Xian-Zhi; Plésiat, Patrick; Nikaido, Hiroshi (2015): The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews* 28 (2), S. 337–418. DOI: 10.1128/CMR.00117-14.

Lyu, Yinfeng; Yang, Yang; Lyu, Xiting; Dong, Na; Shan, Anshan (2016): Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and *Candida*. *Scientific reports* 6, S. 27258. DOI: 10.1038/srep27258.

Malanovic, Nermina; Lohner, Karl (2016): Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 9 (3). DOI: 10.3390/ph9030059.

Maltz, Michele A.; Bomar, Lindsey; Lapierre, Pascal; Morrison, Hilary G.; McClure, Emily Ann; Sogin, Mitchell L.; Graf, Joerg (2014): Metagenomic analysis of the medicinal leech gut microbiota. *Frontiers in microbiology* 5, S. 151. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00151.

Mangoni, M. E.; Aumelas, A.; Charnet, P.; Roumestand, C.; Chiche, L.; Despaux, E. et al. (1996): Change in membrane permeability induced by protegrin 1: implication of disulphide bridges for pore formation. *FEBS Letters* 383 (1-2), S. 93–98.

Mardirossian, Mario; Grzela, Renata; Giglione, Carmela; Meinel, Thierry; Gennaro, Renato; Mergaert, Peter; Scocchi, Marco (2014): The host antimicrobial peptide Bac71-35 binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis. *Chemistry & biology* 21 (12), S. 1639–1647. DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.10.009.

- Masuda, Masao; Nakashima, Hideki; Ueda, Toshihiro; Naba, Hiroyasu; Ikoma, Rie; Otaka, Akira et al. (1992): A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12,Lys7]-polyphemusin II). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189 (2), S. 845–850. DOI: 10.1016/0006-291X(92)92280-B.
- Matsuzaki, K. (1998): Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochimica et biophysica acta* 1376 (3), S. 391–400.
- Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Ishibe, N.; Ueha, M.; Nakata, S.; Miyajima, K.; Epanand, R. M. (1998): Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry* 37 (34), S. 11856–11863. DOI: 10.1021/bi980539y.
- Mattick, A.T.R.; Hirsch, A.; Berridge, N. J. (1947): FURTHER OBSERVATIONS ON AN INHIBITORY SUBSTANCE (NISIN) FROM LACTIC STREPTOCOCCI. *The Lancet* 250 (6462), S. 5–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(47)90004-4.
- Mattiuzzo, Maura; Bandiera, Antonella; Gennaro, Renato; Benincasa, Monica; Pacor, Sabrina; Antcheva, Nikolinka; Scocchi, Marco (2007): Role of the Escherichia coli SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Molecular microbiology* 66 (1), S. 151–163. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05903.x.
- Mihajlovic, Maja; Lazaridis, Themis (2012): Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* 1818 (5), S. 1274–1283. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.01.016.
- Mishra, Abhijit; Lai, Ghee Hwee; Schmidt, Nathan W.; Sun, Victor Z.; Rodriguez, April R.; Tong, Rong et al. (2011): Translocation of HIV TAT peptide and analogues induced by multiplexed membrane and cytoskeletal interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (41), S. 16883–16888. DOI: 10.1073/pnas.1108795108.
- Miyata, T.; Tokunaga, F.; Yoneya, T.; Yoshikawa, K.; Iwanaga, S.; Niwa, M. et al. (1989): Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *Journal of biochemistry* 106 (4), S. 663–668.
- Morell, Montse; Czihal, Patricia; Hoffmann, Ralf; Otvos, Laszlo; Avilés, Francesc X.; Ventura, Salvador (2008): Monitoring the interference of protein-protein interactions in vivo by bimolecular fluorescence complementation: the DnaK case. *Proteomics* 8 (17), S. 3433–3442. DOI: 10.1002/pmic.200700739.
- Mory, R. N.; Mindell, D.; Bloom, D. A. (2000): The leech and the physician: biology, etymology, and medical practice with *Hirudinea medicinalis*. *World journal of surgery* 24 (7), S. 878–883.
- Mosmann, Tim (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2), S. 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Münch, Daniela; Sahl, Hans-Georg (2015): Structural variations of the cell wall precursor lipid II in Gram-positive bacteria - Impact on binding and efficacy of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* 1848 (11 Pt B), S. 3062–3071. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.04.014.

- Mura, Manuela; Dennison, Sarah R.; Zvelindovsky, Andrei V.; Phoenix, David A. (2013): Aurein 2.3 functionality is supported by oblique orientated α -helical formation. *Biochimica et biophysica acta* 1828 (2), S. 586–594. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.08.019.
- Mura, Manuela; Wang, Jianping; Zhou, Yuhua; Pinna, Marco; Zvelindovsky, Andrei V.; Dennison, Sarah R.; Phoenix, David A. (2016): The effect of amidation on the behaviour of antimicrobial peptides. *European biophysics journal : EBJ* 45 (3), S. 195–207. DOI: 10.1007/s00249-015-1094-x.
- Nell, Marja J.; Tjabringa, G. Sandra; Wafelman, Amon R.; Verrijck, Ruud; Hiemstra, Pieter S.; Drijfhout, Jan W.; Grote, Jan J. (2006): Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. *Peptides* 27 (4), S. 649–660. DOI: 10.1016/j.peptides.2005.09.016.
- Newman, David J.; Cragg, Gordon M. (2007): Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products* 70 (3), S. 461–477. DOI: 10.1021/np068054v.
- Nguyen, Leonard T.; Chau, Johnny K.; Perry, Nicole A.; Boer, Leonie de; Zaat, Sebastian A. J.; Vogel, Hans J. (2010): Serum Stabilities of Short Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptide Analogs. *PLoS one* 5 (9). DOI: 10.1371/journal.pone.0012684.
- Niidome, T.; Mihara, H.; Oka, M.; Hayashi, T.; Saiki, T.; Yoshida, K.; Aoyagi, H. (1998): Structure and property of model peptides of proline/arginine-rich region in bactenecin 5. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society* 51 (5), S. 337–345.
- Nijnik, A.; Hancock, Rew (2009): Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerging health threats journal* 2, e1. DOI: 10.3134/ehj.09.001.
- Nolte, Hendrik (2011): Proteomanalyse der Saliva des Hirudo verbana. Bachelorarbeit.
- Noto, Paul Bart; Abbadessa, Giovanni; Cassone, Marco; Mateo, George D.; Agelan, Alexis; Wade, John D. et al. (2008): Alternative stabilities of a proline-rich antibacterial peptide in vitro and in vivo. *Protein science : a publication of the Protein Society* 17 (7), S. 1249–1255. DOI: 10.1110/ps.034330.108.
- Nyholm, Spencer V.; Graf, Joerg (2012): Knowing your friends: invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses. *Nature reviews. Microbiology* 10 (12), S. 815–827. DOI: 10.1038/nrmicro2894.
- Okada, M.; Natori, S. (1983): Purification and characterization of an antibacterial protein from haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem. J.* 211 (3), S. 727–734. DOI: 10.1042/bj2110727.
- Oren, Z.; Shai, Y. (1996): A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *European journal of biochemistry* 237 (1), S. 303–310.
- Osapay, K.; Tran, D.; Ladokhin, A. S.; White, S. H.; Henschen, A. H.; Selsted, M. E. (2000): Formation and characterization of a single Trp-Trp cross-link in indolicidin that confers protease stability without altering antimicrobial activity. *The Journal of biological chemistry* 275 (16), S. 12017–12022.

- Otvos, L. (2002): The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59 (7), S. 1138–1150.
- Otvos, L.; O, I.; Rogers, M. E.; Consolvo, P. J.; Condie, B. A.; Lovas, S. et al. (2000): Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* 39 (46), S. 14150–14159.
- Otvos, Laszlo; Cudic, Mare; Chua, Brendon Y.; Deliyannis, Georgia; Jackson, David C. (2004): An insect antibacterial peptide-based drug delivery system. *Molecular pharmaceuticals* 1 (3), S. 220–232.
- Otvos, Laszlo; Wade, John D.; Lin, Feng; Condie, Barry A.; Hanrieder, Joerg; Hoffmann, Ralf (2005): Designer antibacterial peptides kill fluoroquinolone-resistant clinical isolates. *Journal of medicinal chemistry* 48 (16), S. 5349–5359. DOI: 10.1021/jm050347i.
- Palomo, Jose M. (2014a): Solid-phase peptide synthesis. An overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Adv* 4 (62), S. 32658–32672. DOI: 10.1039/c4ra02458c.
- Palomo, Jose M. (2014b): Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Adv.* 4 (62), S. 32658–32672. DOI: 10.1039/C4RA02458C.
- Pan, Yeang-Ling; Cheng, John T-J; Hale, John; Pan, Jinhe; Hancock, Robert E. W.; Straus, Suzana K. (2007): Characterization of the structure and membrane interaction of the antimicrobial peptides aurein 2.2 and 2.3 from Australian southern bell frogs. *Biophysical journal* 92 (8), S. 2854–2864. DOI: 10.1529/biophysj.106.097238.
- Papo, Niv; Oren, Ziv; Pag, Ulrike; Sahl, Hans-Georg; Shai, Yechiel (2002): The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *The Journal of biological chemistry* 277 (37), S. 33913–33921. DOI: 10.1074/jbc.M204928200.
- Park, C. B.; Kim, H. S.; Kim, S. C. (1998): Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244 (1), S. 253–257. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8159.
- Park, C. B.; Yi, K. S.; Matsuzaki, K.; Kim, M. S.; Kim, S. C. (2000): Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (15), S. 8245–8250. DOI: 10.1073/pnas.150518097.
- Park, Yoonkyung; Park, Seong-Cheol; Park, Hae-Kyun; Shin, Song Yub; Kim, Yangmee; Hahm, Kyung-So (2007): Structure-activity relationship of HP (2-20) analog peptide: enhanced antimicrobial activity by N-terminal random coil region deletion. *Biopolymers* 88 (2), S. 199–207. DOI: 10.1002/bip.20679.
- Patrzykat, Aleksander; Friedrich, Carol L.; Zhang, Lijuan; Mendoza, Valentina; Hancock, Robert E. W. (2002): Sublethal Concentrations of Pleurocidin-Derived Antimicrobial Peptides Inhibit Macromolecular Synthesis in Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (3), S. 605–614. DOI: 10.1128/AAC.46.03.605-614.2002.

- Patterson-Delafield, J.; Szklarek, D.; Martinez, R. J.; Lehrer, R. I. (1981): Microbicidal cationic proteins of rabbit alveolar macrophages: amino acid composition and functional attributes. *Infection and Immunity* 31 (2), S. 723–731.
- Paulsen, Victoria S.; Mardirossian, Mario; Blencke, Hans-Matti; Benincasa, Monica; Runti, Giulia; Nepa, Matteo et al. (2016): Inner membrane proteins YgdD and SbmA are required for the complete susceptibility of *E. coli* to the proline-rich antimicrobial peptide arasin 1(1-25). *Microbiology (Reading, England)*. DOI: 10.1099/mic.0.000249.
- Pawley, James B. (2006): Handbook Of Biological Confocal Microscopy. Boston, MA: Springer US.
- Pedersen, Søren L.; Tofteng, A. Pernille; Malik, Leila; Jensen, Knud J. (2012): Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chemical Society reviews* 41 (5), S. 1826–1844. DOI: 10.1039/c1cs15214a.
- Pendleton, Jack N.; Gorman, Sean P.; Gilmore, Brendan F. (2013): Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert review of anti-infective therapy* 11 (3), S. 297–308. DOI: 10.1586/eri.13.12.
- Phoenix, David A.; Harris, Frederick; Mura, Manuela; Dennison, Sarah R. (2015): The increasing role of phosphatidylethanolamine as a lipid receptor in the action of host defence peptides. *Progress in lipid research* 59, S. 26–37. DOI: 10.1016/j.plipres.2015.02.003.
- Podda, Elena; Benincasa, Monica; Pacor, Sabrina; Micali, Fulvio; Mattiuzzo, Maura; Gennaro, Renato; Scocchi, Marco (2006): Dual mode of action of Bac7, a proline-rich antibacterial peptide. *Biochimica et biophysica acta* 1760 (11), S. 1732–1740. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.09.006.
- Pujals, Sílvia; Giralt, Ernest (2008): Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides. *Advanced drug delivery reviews* 60 (4-5), S. 473–484. DOI: 10.1016/j.addr.2007.09.012.
- Rabanal, Francesc; Grau-Campistany, Ariadna; Vila-Farrés, Xavier; Gonzalez-Linares, Javier; Borràs, Miquel; Vila, Jordi et al. (2015): A bioinspired peptide scaffold with high antibiotic activity and low in vivo toxicity. *Scientific reports* 5, S. 10558. DOI: 10.1038/srep10558.
- Raj, P. A.; Edgerton, M. (1995): Functional domain and poly-L-proline II conformation for candidacidal activity of bactenecin 5. *FEBS Letters* 368 (3), S. 526–530.
- Raj, P. A.; Marcus, E.; Edgerton, M. (1996): Delineation of an active fragment and poly(L-proline) II conformation for candidacidal activity of bactenecin 5. *Biochemistry* 35 (14), S. 4314–4325. DOI: 10.1021/bi951681r.
- Ramarao, Nalini; Nielsen-Leroux, Christina; Lereclus, Didier (2012): The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *Journal of visualized experiments : JoVE* (70), e4392. DOI: 10.3791/4392.
- Rapaport, D.; Shai, Y. (1991): Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers. *The Journal of biological chemistry* 266 (35), S. 23769–23775.
- Rifflet, Aline; Gavalda, Sabine; Téné, Nathan; Orivel, Jérôme; Leprince, Jérôme; Guilhaudis, Laure et al. (2012): Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the venom of the ant *Tetramorium bicarinatum*. *Peptides* 38 (2), S. 363–370. DOI: 10.1016/j.peptides.2012.08.018.

- Roepstorff, P.; Fohlman, J. (1984): Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry* 11 (11), S. 601. DOI: 10.1002/bms.1200111109.
- Rolland, J. L.; Abdelouahab, M.; Dupont, J.; Lefevre, F.; Bachère, E.; Romestand, B. (2010): Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Molecular immunology* 47 (6), S. 1269–1277. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.12.007.
- Rozek, A.; Friedrich, C. L.; Hancock, R. E. (2000): Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* 39 (51), S. 15765–15774.
- Ruggiero, Michael T.; Sibik, Juraj; Orlando, Roberto; Zeitler, J. Axel; Korter, Timothy M. (2016): Measuring the Elasticity of Poly- L-Proline Helices with Terahertz Spectroscopy. *Angew. Chem.* 128 (24), S. 6991–6995. DOI: 10.1002/ange.201602268.
- Runti, Giulia; Lopez Ruiz, Maria del Carmen; Stoilova, Tatiana; Hussain, Rohanah; Jennions, Matthew; Choudhury, Hassanul G. et al. (2013): Functional characterization of SbmA, a bacterial inner membrane transporter required for importing the antimicrobial peptide Bac7(1-35). *Journal of bacteriology* 195 (23), S. 5343–5351. DOI: 10.1128/JB.00818-13.
- Sadler, Kristen; Eom, Khee Dong; Yang, Jin-Long; Dimitrova, Yoana; Tam, James P. (2002): Translocating proline-rich peptides from the antimicrobial peptide bactenecin 7. *Biochemistry* 41 (48), S. 14150–14157.
- Schasfoort, Richard B. M. (Hg.) (2017): Handbook of surface plasmon resonance. 2nd edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1039/9781788010283>.
- Schitteck, B.; Hipfel, R.; Sauer, B.; Bauer, J.; Kalbacher, H.; Stevanovic, S. et al. (2001): Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature immunology* 2 (12), S. 1133–1137. DOI: 10.1038/ni732.
- Schmidt, Nathan W.; Wong, Gerard C. L. (2013): Antimicrobial peptides and induced membrane curvature: geometry, coordination chemistry, and molecular engineering. *Current opinion in solid state & materials science* 17 (4), S. 151–163. DOI: 10.1016/j.cossms.2013.09.004.
- Schnapp, D.; Kemp, G. D.; Smith, V. J. (1996): Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *European journal of biochemistry* 240 (3), S. 532–539.
- Schneider, M.; Dorn, A. (2001): Differential infectivity of two *Pseudomonas* species and the immune response in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Insecta: Hemiptera). *Journal of invertebrate pathology* 78 (3), S. 135–140. DOI: 10.1006/jjpa.2001.5054.
- Scocchi, M.; Skerlavaj, B.; Romeo, D.; Gennaro, R. (1992): Proteolytic cleavage by neutrophil elastase converts inactive storage proforms to antibacterial bactenecins. *European journal of biochemistry* 209 (2), S. 589–595.

- Scocchi, Marco; Lüthy, Christine; Decarli, Pietro; Mignogna, Giuseppina; Christen, Philipp; Gennaro, Renato (2009): The Proline-rich Antibacterial Peptide Bac7 Binds to and Inhibits in vitro the Molecular Chaperone DnaK. *Int J Pept Res Ther* 15 (2), S. 147–155. DOI: 10.1007/s10989-009-9182-3.
- Scocchi, Marco; Mardirossian, Mario; Runti, Giulia; Benincasa, Monica (2016): Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. *Current topics in medicinal chemistry* 16 (1), S. 76–88.
- Seefeldt, A. Carolin; Nguyen, Fabian; Antunes, Stéphanie; Pérébasquine, Natacha; Graf, Michael; Arenz, Stefan et al. (2015): The proline-rich antimicrobial peptide Onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex. *Nature structural & molecular biology* 22 (6), S. 470–475. DOI: 10.1038/nsmb.3034.
- Shai, Y.; Bach, D.; Yanovsky, A. (1990): Channel formation properties of synthetic pardaxin and analogues. *The Journal of biological chemistry* 265 (33), S. 20202–20209.
- Shai, Yechiel (2002): Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66 (4), S. 236–248. DOI: 10.1002/bip.10260.
- Sharma, Himanshu; Nagaraj, Ramakrishnan (2015): Human β -defensin 4 with non-native disulfide bridges exhibit antimicrobial activity. *PloS one* 10 (3), e0119525. DOI: 10.1371/journal.pone.0119525.
- Singh, Amrit Pal (2010): Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. *Complementary therapies in clinical practice* 16 (4), S. 213–215. DOI: 10.1016/j.ctcp.2009.11.005.
- SKARNES, R. C.; WATSON, D. W. (1957): Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriological reviews* 21 (4), S. 273–294.
- Stawikowski, Maciej; Fields, Gregg B. (2012): Introduction to peptide synthesis. *Current protocols in protein science* Chapter 18, Unit 18.1. DOI: 10.1002/0471140864.ps1801s69.
- Steiner, H.; Hultmark, D.; Engström, A.; Bennich, H.; Boman, H. G. (1981): Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292 (5820), S. 246–248.
- Strömstedt, Adam A.; Kristiansen, Per Eugen; Gunasekera, Sunithi; Grob, Nathalie; Skjeldal, Lars; Göransson, Ulf (2016): Selective membrane disruption by the cyclotide kalata B7: complex ions and essential functional groups in the phosphatidylethanolamine binding pocket. *Biochimica et biophysica acta* 1858 (6), S. 1317–1327. DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.02.013.
- Subbalakshmi, C.; Sitaram, N. (1998): Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS microbiology letters* 160 (1), S. 91–96. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12896.x.
- Svetlov, Maxim S.; Vázquez-Laslop, Nora; Mankin, Alexander S. (2017): Kinetics of drug-ribosome interactions defines the cidal activity of macrolide antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (52), S. 13673–13678. DOI: 10.1073/pnas.1717168115.
- Szabo, Dora; Ostorhazi, Eszter; Binas, Annegret; Rozgonyi, Ferenc; Kocsis, Bela; Cassone, Marco et al. (2010): The designer proline-rich antibacterial peptide A3-APO is effective against systemic *Escherichia coli* infections in different mouse models. *International journal of antimicrobial agents* 35 (4), S. 357–361. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.10.015.

- Tada, Tatsuya; Tsuchiya, Mitsuhiro; Shimada, Kayo; Nga, Tran Thi Thanh; Le Thu, Thi Anh; Phu, Truong Thien et al. (2017): Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. *BMC infectious diseases* 17 (1), S. 467. DOI: 10.1186/s12879-017-2570-y.
- Takahashi, Daisuke; Shukla, Sanjeev K.; Prakash, Om; Zhang, Guolong (2010): Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie* 92 (9), S. 1236–1241. DOI: 10.1016/j.biochi.2010.02.023.
- Tam, James P.; Wang, Shujing; Wong, Ka H.; Tan, Wei Liang (2015): Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 8 (4), S. 711–757. DOI: 10.3390/ph8040711.
- Tasiemski, Aurélie; Vandenbulcke, Franck; Mitta, Guillaume; Lemoine, Jérôme; Lefebvre, Christophe; Sautière, Pierre-Eric; Salzet, Michel (2004): Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatium*. *The Journal of biological chemistry* 279 (30), S. 30973–30982. DOI: 10.1074/jbc.M312156200.
- Tereshchenkov, A. G.; Shishkina, A. V.; Tashlitsky, V. N.; Korshunova, G. A.; Bogdanov, A. A.; Sumbatyan, N. V. (2016): Interaction of Chloramphenicol Tripeptide Analogs with Ribosomes. *Biochemistry. Biokhimiia* 81 (4), S. 392–400. DOI: 10.1134/S000629791604009X.
- Thillaivinayagalingam, Pranavan; Gommeaux, Julien; McLoughlin, Michael; Collins, David; Newcombe, Anthony R. (2010): Biopharmaceutical production: Applications of surface plasmon resonance biosensors. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 878 (2), S. 149–153. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.08.040.
- Tokunaga, Y.; Niidome, T.; Hatakeyama, T.; Aoyagi, H. (2001): Antibacterial activity of bactenecin 5 fragments and their interaction with phospholipid membranes. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 7 (6), S. 297–304. DOI: 10.1002/psc.317.
- Tominaga, Hideyuki; Ishiyama, Munetaka; Ohseto, Fumio; Sasamoto, Kazumi; Hamamoto, Tomoyuki; Suzuki, Keiji; Watanabe, Masami (1999): A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* 36 (2), S. 47–50. DOI: 10.1039/a809656b.
- Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A. (2000): Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55 (1), S. 4–30. DOI: 10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M.
- Ulm, Hannah; Wilmes, Miriam; Shai, Yechiel; Sahl, Hans-Georg (2012): Antimicrobial host defensins - specific antibiotic activities and innate defense modulation. *Frontiers in immunology* 3, S. 249. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00249.
- Uteng, Marianne; Hauge, Håvard H.; Markwick, Phineus R. L.; Fimland, Gunnar; Mantzilas, Dimitris; Nissen-Meyer, Jon; Muhle-Goll, Claudia (2003): Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* 42 (39), S. 11417–11426. DOI: 10.1021/bi034572i.
- Volke, Daniela; Krizsan, Andor; Berthold, Nicole; Knappe, Daniel; Hoffmann, Ralf (2015): Identification of Api88 Binding Partners in *Escherichia coli* Using a Photoaffinity-Cross-Link Strategy and Label-Free

Quantification. *Journal of proteome research* 14 (8), S. 3274–3283. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00283.

Vunnam, S.; Juvvadi, P.; Merrifield, R. B. (1997): Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig intestine. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society* 49 (1), S. 59–66.

Wade, D.; Boman, A.; Wåhlin, B.; Drain, C. M.; Andreu, D.; Boman, H. G.; Merrifield, R. B. (1990): All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (12), S. 4761–4765.

Wang, G., Li, X. and Wang: The Antimicrobial Peptide Database. Nucleic Acids Research. Online verfügbar unter aps.unmc.edu/AP/main.php, zuletzt geprüft am 07.02.2019.

Westerhoff, H. V.; Juretić, D.; Hendler, R. W.; Zasloff, M. (1989): Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (17), S. 6597–6601.

WHO international (2018): Antibiotic resistance. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>, zuletzt aktualisiert am Feb 2018, zuletzt geprüft am 22.04.2019.

Williamson, M. P. (1994): The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* 297 (Pt 2), S. 249–260.

Wimley, William C. (2010): Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS chemical biology* 5 (10), S. 905–917. DOI: 10.1021/cb1001558.

Wu, Zhe; Cui, Qiang; Yethiraj, Arun (2013): Why do arginine and lysine organize lipids differently? Insights from coarse-grained and atomistic simulations. *The journal of physical chemistry. B* 117 (40), S. 12145–12156. DOI: 10.1021/jp4068729.

Yang, De; Biragyn, Arya; Hoover, David M.; Lubkowski, Jacek; Oppenheim, Joost J. (2004): Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annual review of immunology* 22, S. 181–215. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104603.

Yang, De; Biragyn, Arya; Kwak, Larry W.; Oppenheim, Joost J. (2002): Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in Immunology* 23 (6), S. 291–296. DOI: 10.1016/S1471-4906(02)02246-9.

Yasin, B.; Pang, M.; Turner, J. S.; Cho, Y.; Dinh, N. N.; Waring, A. J. et al. (2000): Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 19 (3), S. 187–194.

Yeaman, Michael R.; Yount, Nannette Y. (2003): Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews* 55 (1), S. 27–55. DOI: 10.1124/pr.55.1.2.

Yin, Lois M.; Edwards, Michelle A.; Li, Jessica; Yip, Christopher M.; Deber, Charles M. (2012): Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane

interactions. *The Journal of biological chemistry* 287 (10), S. 7738–7745. DOI: 10.1074/jbc.M111.303602.

Yoo, Jejoong; Cui, Qiang (2008): Does arginine remain protonated in the lipid membrane? Insights from microscopic pKa calculations. *Biophysical journal* 94 (8), L61-3. DOI: 10.1529/biophysj.107.122945.

Yu, Hui Ming; Chen, Shui Tein; Wang, Kung Tsung (1992): Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation. *J. Org. Chem.* 57 (18), S. 4781–4784. DOI: 10.1021/jo00044a001.

Zahn, Michael; Berthold, Nicole; Kieslich, Björn; Knappe, Daniel; Hoffmann, Ralf; Sträter, Norbert (2013): Structural studies on the forward and reverse binding modes of peptides to the chaperone DnaK. *Journal of molecular biology* 425 (14), S. 2463–2479. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.03.041.

Zaidi, S. M. Abbas; Jameel, S. S.; Zaman, F.; Jilani, Shazia; Sultana, A.; Khan, Shariq A. (2011): A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 16 (1), S. 59–65.

Zairi, Amira; Tangy, Frédéric; Bouassida, Khaireddine; Hani, Khaled (2009): Dermaseptins and magainins: antimicrobial peptides from frogs' skin-new sources for a promising spermicides microbicides-a mini review. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2009, S. 452567. DOI: 10.1155/2009/452567.

Zanetti, M.; Gennaro, R.; Scocchi, M.; Skerlavaj, B. (2000): Structure and biology of cathelicidins. *Advances in experimental medicine and biology* 479, S. 203–218. DOI: 10.1007/0-306-46831-X_17.

Zasloff, M. (1987): Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (15), S. 5449–5453. DOI: 10.1073/pnas.84.15.5449.

Zasloff, Michael (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415 (6870), S. 389–395. DOI: 10.1038/415389a.

Zavalova, L. L.; Yudina, T. G.; Artamonova, I. I.; Baskova, I. P. (2006): Antibacterial non-glycosidase activity of invertebrate destabilase-lysozyme and of its helical amphipathic peptides. *Chemotherapy* 52 (3), S. 158–160. DOI: 10.1159/000092904.

Zavalova, L.L.; Artamonova, I.I.; Berezhnoy, S.N.; Tagaev, A.A.; Baskova, I.P.; Andersen, J. et al. (2003): Multiple forms of medicinal leech destabilase-lysozyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306 (1), S. 318–323. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)00896-9.

Zelezetsky, Igor; Pacor, Sabrina; Pag, Ulrike; Papo, Niv; Shai, Yechiel; Sahl, Hans-Georg; Tossi, Alessandro (2005): Controlled alteration of the shape and conformational stability of alpha-helical cell-lytic peptides: effect on mode of action and cell specificity. *The Biochemical journal* 390 (Pt 1), S. 177–188. DOI: 10.1042/BJ20042138.

Zhang, L.; Benz, R.; Hancock, R. E. (1999): Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides. *Biochemistry* 38 (25), S. 8102–8111. DOI: 10.1021/bi9904104.

Zhang, L.; Rozek, A.; Hancock, R. E. (2001): Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *The Journal of biological chemistry* 276 (38), S. 35714–35722. DOI: 10.1074/jbc.M104925200.

Zhang, Shi-Kun; Song, Jin-Wen; Gong, Feng; Li, Su-Bo; Chang, Hong-Yu; Xie, Hui-Min et al. (2016): Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. *Scientific reports* 6, S. 27394. DOI: 10.1038/srep27394.

Zhu, Chongqin; Gao, Yurui; Li, Hui; Meng, Sheng; Li, Lei; Francisco, Joseph S.; Zeng, Xiao Cheng (2016): Characterizing hydrophobicity of amino acid side chains in a protein environment via measuring contact angle of a water nanodroplet on planar peptide network. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (46), S. 12946–12951. DOI: 10.1073/pnas.1616138113.

9 Danksagung

Zum Gelingen einer solchen Arbeit tragen nicht zuletzt viele verschiedene Menschen auf unterschiedliche Weise bei. Hier möchte ich die Gelegenheit nutzen, um einigen von ihnen im Speziellen zu danken.

Ein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater **Prof. Dr. Gerhard Klebe** für die selbstverständliche Übernahme des Erstgutachtens, seine Unterstützung in vielen Situationen, die vielen fachlichen Diskussionen und Anregungen, den selbstverständlichen Zugang zu seiner Arbeitsgruppe an der Universität Marburg und damit die Möglichkeit für mich, so das spannende Feld des Wirkstoffdesigns kennenlernen zu dürfen.

Einen weiteren ganz besonderen Dank möchte ich meinem zweiten Betreuer und Mentor **Prof. Dr. Jürgen Hemberger** aussprechen. Ich danke ihm für seine langjährige, immerwährende Unterstützung und den vielen Möglichkeiten, die er mir in den vergangenen Jahren eröffnet und zugetraut hat.

Prof. Dr. Franz Cemic und **Prof. Dr. Stephanie Gokorsch** - oder einfach Franz und Steff – danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung in vielen verschiedenen Belangen, insbesondere wenn mal aufmunternde Worte nötig waren.

Prof. Dr. Günter Lochnit danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen der Derivate.

Dr. Shashank Pinnapireddy für seine Unterstützung und die Möglichkeit der Durchführung der fluoreszenzmikroskopischen CLSM-Messungen am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Marburg.

Meinen ehemaligen und jetzigen Kollegen und Kolleginnen am Institut für Biochemische Verfahren und Analysen der THM in Gießen, insbesondere sind das

Ganna Zecher - Danke für deine Unterstützung bei der Isolierung des Peptids aus der Saliva,

Hendrik Nolte - Danke für deine Unterstützung bei den Proteomanalysen der Saliva und der *De-novo*-Sequenzierungen aus den HPLC-Fractionen,

Christian Arndt, Tina Schaible, Simon Klötzing, Anna-Lena Jödt und **Anna Hauer** – ein großes Dankeschön an Euch alle für Eure Hilfe und Unterstützung bei der Peptidsynthese und Aufreinigung der vielen Derivate,

Nina Büttner – Danke für deine Hilfe bei den Fluoreszenzmarkierungen und Messungen der Peptide,

Arielle Siaka – Ganz lieben Dank für deine Hilfe bei den *In-vivo*-Gallerien-Versuchen

Neben den vielen Arbeitskollegen tragen Familie und nicht zuletzt gute Freunde zum Gelingen einer solchen Arbeit über einen längeren Zeitraum bei.

Meiner Schwiegermama **Donatella** und meinem Schwiegerpapa **Peter** ganz lieben Dank für die unglaubliche Unterstützung jeglicher Art und das selbstverständliche Rückenfreihalten, wenn es mal eng wurde, insbesondere in den letzten Monaten.

Meinen Freundinnen **Dorle Schaaf** und **Yvonne Germann** möchte ich danken für ihre unermüdliche Unterstützung, die immer offenen Ohren insbesondere in schwierigen Situationen und auch für die Ablenkung, wenn es mal nötig war.

An **Conny Keck** geht ein ganz besonderer Dank, dafür, dass sie zum richtigen Zeitpunkt einfach da war und mich auf eine ganz besondere Weise unterstützt und getragen hat. Danke für die vielen fachlichen Diskussionen, Ratschläge und deine Unterstützung auf so ziemlich allen Ebenen.

Meiner **Mama** möchte ich für alles danken, was sie für mich getan hat. Leider kannst Du nicht mehr dabei sein, aber alles was ich bin, habe ich von Dir gelernt. Du fehlst mir!

Zuletzt möchte ich meinem Mann **Franco** und meinem Sohn **Luiz** für einfach alles danke sagen. Danke für eure großartige Unterstützung, euer Rückenfreihalten und euer immenses Verständnis in den vergangenen Jahren, auch wenn das gerade für Euch beide hieß, auf mich besonders in der letzten Phase sehr oft verzichten zu müssen. Ich liebe Euch!

Und natürlich ein dickes Dankeschön an **Betty** für ihre sehr besondere Art der Unterstützung, die nötigen Pausen und das teilweise nächtelange „gemeinsame“ Auswerten der Daten!

10 Curriculum vitae

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist der Lebenslauf in der online-Version der Arbeit nicht erhalten.

11 Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Identifizierung, Charakterisierung und Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehung sowie des Mode of Action eines neuen antimikrobiellen Peptids aus *Hirudo verbana*“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 14.05.2019

.....

Daniela Müller

12 Anhang

Tabelle 65: Targets, Sequenzen, Herkunft und Referenzen bekannter antimikrobieller Peptide

Target / Wirkmechanismus	Name	Sequenz	Herkunft	Ref*
Cell division	Indolicidin	ILPWKWPWWPWRR	Rind	AP00150
	Microcin J25	GGAGHVPEYFVGIGTPISYG	<i>E. coli</i>	AP00480
	Diptericin	DDMTMKPTPPPQYPLNLQGGGGGGSG DGFQFAVQGHQKVWTSNDRHEIGLNG GYGQHLGGPYGNSEPSWKVGSTYTYRFP NF	Drosophila	AP01565
	HD5	ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLC CR	Mensch	AP00180
	PR-39	RRRPRPPYLPRRPPPPFFPRLPPRIPPGFP PRFPPRFP	Mensch	AP00396
Cell wall peptidoglycan	HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTICIYQGRLLWAF C	Mensch	AP00176
	Mersacidin	CTFTLPGGGGVCTLTSECIC	<i>B. subtilis</i>	AP01206
	Nisin	ITSISLCTPGCKTGALMGC NMKTATCNC SIHVSK	<i>L. lactis</i>	AP00204
	Copsin	QNCPTRRGLCVTSGLTACRNHCRSCHRG DVGCVRCSNAQCTGFLGTTCTCINPCPRC	Fungi	AP02440
	Plectasin	GFGCNGPWEDDMQCHNHCKSIKGYK GGYCAKGGFVCKCY	Fungi	AP00549
Chaperone	Bac 7 (1-35)	RRIRPRPPRLPRRPRPLPFPRPGPRPIPRP LPFPRPGPRPIPRPLPFPRPGPRPIPRPL	Rind	AP00010
	ApidaecinHb1a	GNNRPVYIQRPPHPRL	Biene	AP00007
	Pyrrhocoricin	VDKGSYLPRPTPPRIYNRN	Feuerwanze	AP00170
	Drosocin	GKPRPYSPRPTSHPRPIRV	Drosophila	AP00172
	Abaecin	YVPLPNVPQGRPPFTFPGQGPFNPKIK WPQGY	Biene	AP00002
	Oncocin	VDKPPYLPRPPPPRIYNNR	Wanze	AP01620
	Ixodidin	QRGSRGQRCGPGEVFNQCGSACPRVCG RPPAQAQTLQCVSGFCRRGYIRTQRGG CIPERQCHQR	Ixodes	AP01157
DNA	Buforin II	TRSSRAGLQFPVGRVHLLRK	Büffel	AP00308
	Indolicidin	ILPWKWPWWPWRR	Rind	AP00150
	Ostricacin-2	APGNKAECEREKGYCGFLKCSFPFVVS GKCSRFFFCCKNIW	Kamel	AP01321
	OaBac5	RFRPPIRPPPIRPPFRPPFRPPVPPPIRPPF RPPFRPPIGPFP	Schaf	AP00681
	Tachyplesin	KWCFRVCYRGICYRKCR	Krebs	AP00213

<i>Target / Wirkmechanismus</i>	<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Ref*</i>
DNA	Microcin B17	VGIGGGGGGGGGGGSCGGQGGGCG GCSNGCSGGNGGSGGSGSHI	<i>E. coli</i>	AP01227
	PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPP GFPPRFPPRF	Mensch	AP00396
	HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLLWA FCC	Mensch	AP00176
Outer membrane	ApidaecinHb1a	GNNRPVYIPQPRPPHRL	Biene	AP00007
	Pyrrhocoricin	VDKGSYLPRPTPPRIYNNR	Feuerwanze	AP00170
	Drosocin	GKPRPYSRPTSHRPIRV	Drosophila	AP00172
Proteases	Histatin-5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY	Mensch	AP00505
	eNAP-2	EVERKHPLGGSRGRCPTVPPGTFGH CACLCTGDASEPKGQKCCSN	Pferd	AP00295
	Ixodidin	QRGSRGQRCGPEVFNQCGSACPRV CGRPPAQLCTLCVSGCFRRGYIRT QRGGCIPERQCHQR	Ixodes	AP01157
Protein biosynthesis and metabolism	Pleurocidin	GWGSFFKAAHVKGKHAALHLYL	Fisch	AP00166
	PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPP GFPPRFPPRF	Mensch	AP00396
	HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLLWA FCC	Mensch	AP00176
	Magainin 1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	Frosch	AP00771
Ribosom	Bac 7 (1-35)	RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPGPRPI PRPLPFPRPGPRPIRPLPFPRPGPRPI PRPL	Rind	AP00010
	ApidaecinHb1a	GNNRPVYIPQPRPPHRL	Biene	AP00007
	Oncocin	VDKPPYLPRPPRRRIYNNR	Wanze	AP01620
RNA	Buforin II	TRSSRAGLQFPVGRVHLLLRK	Büffel	AP00308
	Microcin J25	GGAGHVPEYFVGIGTPISEYFYG	<i>E. coli</i>	AP00480
	HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLLWA FCC	Mensch	AP00176
other targets				
two-component system	Lactoferricin B	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF	Rind	AP00026
ABC-Transporter	Apidaecin HB 1a	GNNRPVYIPQPRPPHRL	Biene	AP00007
Aktivierung autolytischer Enzyme	HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLLWA FCC	Mensch	AP00176

Tabelle 66: Sequenzen und Herkunft membranolytisch wirkende Peptide

<i>Target / Wirkmechanismus</i>	<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Ref*</i>
Membranolyse	Aurein 1.2	GLFDIHKIAESF	Frosch	AP00013
	Aurein 2.2	GLLDIVKKVVGAFGSL	Frosch	AP00014
	LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIV QRIKDAFLRNLVPRTES	Affen	AP00310
	Cecropin	GWLKKGKIERVQNTD ATVKGLEVAQQAANVAAT VR	Insekten	AP00129
	Protegrin	RGGRLCYRRRFCVGR	Schwein	AP00195
	BMAP-27	GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVI PLLHLG	Rind	AP00366
	Polyphemusin	RRWCFRVCYRGFCYRKCR	Krabbe	AP00211
	Crotalidin	KRFKFFKVKKSVKKRLKKI FKKPMVIGVTIPF	Schlangen	AP02424
	Paradaxin	GFFALIPKIISPLFKTLLSAV GSALSSSGEQE	Hai	(Oren und Shai 1996)
	Alamethicin	PAAAAQAVAGLAPVAAEQ	Trichoderma	AP02197

* Referenznummer entstammen der Datenbank *The Antimicrobial Peptides Database* (Wang, G., Li, X. and Wang)

Tabelle 67: Sequenzdetails N-terminal-modifizierter Derivate

<i>Interne Nummer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Bezeichnung Thesis</i>
BT-12	PQGPPPPPGKPQ	1196,37	[PQ]HP02
BT-13	PQPGPPPPGKPQ	1196,37	[PQ]HP01
BT-81	VDKPPYLPRPGPPPPGRPQ	2065,67	[VDKPPYLPR][R ⁸]HP01
BT-84	VDKPPYLPRPGPPPPGKPQrP	2270,00	[VDKPPYLPR][k ⁸]HP01[rP]
BT-90	RRIRPGPPPPGKPQ	1553,04	[RRIR]HP01
BT-92	RWRWPGPPPPGKPQ	1655,93	[RWRW]HP01
BT-93	RWRWPGPPPPGRPQ	1683,94	[RWRW]HP01[R ⁸]
BT-94	MIIFRPGPPPPGKPQ	1632,24	[MIIFR]HP01

Tabelle 68: Sequenzdetails zum Alaninscan

<i>Interne Nummer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Bezeichnung Thesis</i>
BT-01	PGPPPPGKPQ	971,12	HP01
BT-02	AGPPPPGKPQ	945,09	[A ¹]HP01
BT-03	PAPPPPGKPQ	985,15	[A ²]HP01
BT-04	PGAPPPGKPQ	945,09	[A ³]HP01
BT-05	PGPAPPGKPQ	945,09	[A ⁴]HP01
BT-06	PGPPAPGKPQ	945,09	[A ⁵]HP01
BT-07	PGPPPAGKPQ	945,09	[A ⁶]HP01
BT-08	PGPPPPAKPQ	985,15	[A ⁷]HP01
BT-09	PGPPPPGAPQ	914,03	[A ⁸]HP01
BT-00	PGPPPPGKAQ	945,09	[A ⁹]HP01
BT-10	PGPPPPGKPA	914,07	[A ¹⁰]HP01

Tabelle 69: Sequenzdetails C-terminal-modifizierter Derivate

<i>Interne Nummer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Bezeichnung Thesis</i>
BT-014	PGPPPPGKPGP	1125,29	HP01[GP]
BT-015	GPPPPPGKPGP	1125,29	HP02[GP]
BT-020	PGPPPPGKPG-NH ₂	969,54	HP01-NH ₂
BT-038	PGPPPPGKPGCMSKSLC	1722,89	HP01[CMSKSLC]
BT-039	PGPPPPGKPGYLPRPRPQ	1979,57	HP01[YLPRPRPQ]
BT-070	PGPPPPLYFLPRPRPPRE	2083,71	HP01[1-6][LYFLPRPRPPRE]
BT-077	PGPPPPLYFLPrPrP	1701,25	HP01[1-6][LYFLPrPrP]
BT-089	PGPPPPGKPGPRPPHPRL	1922,52	HP01[PRPPHPRL]
BT-091	GPPPPPGKPGYLPRPRPQ	1979,57	HP02[YLPRPRPQ]
BT-107	PGPPPPGKPGYLPRPRPK	1979,61	HP01[YLPRPRPK]
BT-108	PGPPPPGKPGYLPRPRPC	1954,57	HP01[YLPRPRPC]
BT-109	KPGPPPPGKPGYLPRPRPK	2107,80	[K]HP01[YLPRPRPK]
BT-110	PGPPPPGKPGYLPRPR	1754,29	HP01[YLPRPR]

Tabelle 71: Sequenzdetails C/N-terminal modifizierter Derivate

<i>Interne Nummer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Name Thesis Dani</i>
BT-95	RWRWPGPPPPGKPQPRPPHPRL	2607,07	[RWRW]HPO1[PRPPHPRL]
BT-96	MIIFRPGPPPPGKPQPRPPHPRL	2583,14	[MIIFR]HPO1[PRPPHPRL]
BT-97	RWRWPGPPPPGKPQ-NH ₂	1653,89	[RWRW]HPO1-NH ₂
BT-98	RWRWPGPPPPGRPQ-NH ₂	1681,90	[RWRW]HPO1[R ⁸]-NH ₂
BT-99	MIIFRPGPPPPGKPQ-NH ₂	1572,10	[MIIFR]HPO1[R ⁸]-NH ₂
BT-112	MIIFRPGPPPPGKPQPRPPHPRL-NH ₂	2580,47	[MIIFR]HPO1[PRPPHPRL]-NH ₂