

Rationales Design von antimikrobiellen Peptiden für die therapeutische Anwendung und Entwicklung von Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen

vorgelegt von

Dipl.-Ing.

Karsten Rapsch

geb. in Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Leif-Alexander Garbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Neubauer

2. Gutachter: Prof. Dr. Frank F. Bier

3. Gutachter: Prof. Dr. Vera Meyer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 08.05.2015

Berlin 2015

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation selbstständig angefertigt, mich keiner fremden Hilfe bedient und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß veröffentlichtem oder unveröffentlichtem Schrifttum entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Dissertation in gleicher oder ähnlicher Fassung noch keiner anderen Universität vorgelegt wurde.

Ort, Datum

Karsten Rapsch

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	5
2.1 Antimikrobielle Peptide.....	5
2.1.1 Wirkmechanismus	7
2.1.2 Selektivität zwischen Pro- und Eukaryoten.....	11
2.1.3 Bakterielle Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden	13
2.1.4 Industrielle und therapeutische Anwendung	16
2.2 Artificielle Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften	20
2.2.1 Peptidbibliotheken	22
2.2.2 Sekundärstruktur motive von antimikrobiellen Peptiden	25
2.3 Antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen	28
2.3.1 Kovalente Oberflächenmodifikationen.....	30
2.3.2 Oberflächen mit kontinuierlicher Wirkstofffreisetzung.....	32
3 Methoden.....	35
3.1 Antimikrobielle Peptide.....	35
3.1.1 Aufbau artifizierender Peptide und Peptidbibliotheken	35
3.1.2 Peptideigenschaften und dreidimensionale Strukturmodellierung.....	36
3.2 Mikro- und Molekularbiologische Methoden	36
3.2.1 Bakterienstämme und Kultivierung.....	36
3.2.2 Eukaryotische Zellkulturen und Kultivierung	37
3.2.3 Durchflusszytometrie	38
3.2.4 Minimale inhibitorische Konzentration (MIC).....	39
3.2.5 Membran-permeabilisierende Eigenschaften von antimikrobiellen Peptiden	39
3.2.6 Zytotoxische Eigenschaften von gelösten antimikrobiellen Peptiden	40
3.2.7 Kinetik der inneren und äußeren Membranpermeabilisierung von <i>E. coli</i> ML-35p.....	41
3.2.8 Behandlung von bakteriell kontaminierten Zellkulturen	42

3.3	Antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen	42
3.3.1	Kovalente Peptidimmobilisierung.....	42
3.3.1.1	Silanisierung, Derivatisierung und Aktivierung von Glasobjektträgern.....	43
3.3.1.2	Immobilisierung von Peptiden an reaktiven Oberflächen	44
3.3.1.3	Antimikrobielle Oberflächeneigenschaften	44
3.3.1.4	Zytotoxische Oberflächeneigenschaften	45
3.3.2	Polymernetzwerke und kontinuierliche Wirkstofffreisetzung.....	45
3.3.2.1	Sukzessive Modifikation von Poly- α -L-Lysin	46
3.3.2.2	Kollagen-Modifikation	47
3.3.2.3	Antimikrobielle Eigenschaften und Wirkstofffreisetzung.....	48
3.3.2.4	Antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften von in Polymernetzwerken kovalent immobilisierten Peptiden.....	49
3.3.3	Relative Quantifizierung von Aminen an der Oberfläche mittels Epicocconone	49
3.3.4	Quantifizierung von immobilisiertem und fluoreszenzmarkiertem BMAP-27	50
3.3.5	Relative Quantifizierung von Argininen an der Oberfläche mittels 9,10-Phenanthrenequinone	50
3.3.6	Bakterielle Adhäsion	51
4	Ergebnisse.....	53
4.1	Gelöste antimikrobielle Peptide.....	53
4.1.1	Referenz-Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften.....	53
4.1.2	Artifizielles Peptiddesign	64
4.1.3	Reduktion des N- und C-Terminus	67
4.1.4	Hydrophobe Region und Anordnung der Aminosäuren	74
4.1.5	Partielle Nettoladung am C-Terminus	80
4.1.6	Peptid-Komposition	83
4.1.7	Optimierte Peptidsequenz und Behandlung von kontaminierten Zellkulturen.....	87
4.2	Antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen	93
4.2.1	Kovalente Modifikation	93
4.2.1.1	Quantifizierung von immobilisierten antimikrobiellen Peptiden	93
4.2.1.2	Antimikrobielle Oberflächeneigenschaften	95
4.2.1.3	Zytotoxizität von antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen	101
4.2.1.4	Kovalente Immobilisierung von BMAP-27 in PLL-basierten Netzwerken	104
4.2.2	Kontinuierliche Wirkstofffreisetzung.....	107
4.2.2.1	PLL-basierte Oberflächenbeschichtungen	107

5	Diskussion	113
5.1	Artifizielle antimikrobielle Peptide	113
5.1.1	Referenzpeptide	113
5.1.2	Artifiziell designete Peptide	117
5.1.3	Optimierte Peptidsequenz und Behandlung von kontaminierten Zellkulturen	122
5.2	Antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen	124
5.2.1	Vergleich zwischen löslichen und immobilisierten Peptiden	124
5.2.2	Orientierung der Peptide im immobilisierten Zustand	125
5.2.3	Peptidquantifizierung	127
5.2.4	Bakterienkonzentration und Adhäsion	128
5.2.5	Immobilisierungsstrategie	129
5.2.6	Zytotoxizität	132
5.2.7	Kontinuierliche Wirkstofffreisetzung	133
6	Zusammenfassung	137
7	Abstract	139
	Literaturverzeichnis	141
A	Materialien	155
B	Zusätzliche Abbildungen	161
C	Lizenzen für die Reproduktion von Bildern	167
D	Veröffentlichungen	169
E	Danksagung	171

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Strukturmerkmale der antimikrobiellen Peptidklassen.	7
Abbildung 2.2:	Modelle für die Membranpermeabilisierung durch antimikrobielle Peptide.	10
Abbildung 2.3:	Wirkweise von antimikrobiellen Peptiden mit bakteriostatischen Eigenschaften.	11
Abbildung 2.4:	Modifikation von bakteriellen Membrankomponenten, welche bei der Ausprägung von Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Peptiden beteiligt sind.	14
Abbildung 2.5:	Exemplarische Darstellung von kombinatorischen Peptidbibliotheken.	23
Abbildung 2.6:	Schematisch Darstellung eines amphipathischen, α -helikalen Peptids.	26
Abbildung 2.7:	Darstellung verschiedener antimikrobieller Oberflächenbeschichtungen.	30
Abbildung 4.1:	Detaillierte Darstellung der direkten zytotoxischen und zytostatischen Aktivität von Referenz-Peptiden gegenüber U-937 Zellen.	56
Abbildung 4.2:	Detaillierte Darstellung der zeitlichen Permeabilisierung der äußeren und inneren Zellmembran von <i>E. coli</i> ML-35p durch verschiedene Konzentrationen des antimikrobiellen Peptids Melittin.	58
Abbildung 4.3:	Detaillierte Darstellung der konzentrationsabhängigen Permeabilisierung von <i>E. coli</i> durch die antimikrobiellen Peptide Melittin und Protamin.	60
Abbildung 4.4:	Detaillierte Darstellung der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Analyse von Bakterien (<i>E. coli</i>), welche mit Melittin oder Protamin inkubiert wurden.	62
Abbildung 4.5:	Darstellung der dreidimensionalen Peptidstruktur von Referenz-Peptiden.	64
Abbildung 4.6:	Darstellung der dreidimensionalen Peptidstruktur von artifiziellen Peptiden mit generellem Sequenzmotiv und deren korrespondierender Substitutionsbibliothek.	67
Abbildung 4.7:	Grafische Darstellung der MIC-Werte in Abhängigkeit der Peptidsequenz.	70
Abbildung 4.8:	Grafische Darstellung der zeitabhängigen Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p in Abhängigkeit der Peptidsequenz der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek.	73
Abbildung 4.9:	Dreidimensionale Peptidstruktur der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek.	74
Abbildung 4.10:	Grafische Darstellung der MIC-Werte in Abhängigkeit des hydrophoben Bereichs und der Sequenzanordnung.	76
Abbildung 4.11:	Grafische Darstellung der zeitabhängigen Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p in Abhängigkeit der Deletion der hydrophoben Aminosäuren des zentralen Bereichs, sowie der Verschiebung der kationischen und hydrophoben Aminosäuren.	78
Abbildung 4.12:	Darstellung der dreidimensionalen Peptidstruktur der Peptidbibliotheken für die Analyse des hydrophoben Bereichs, sowie der Anordnung von kationischen und hydrophoben Aminosäuren.	80
Abbildung 4.13:	Darstellung der dreidimensionalen Peptidstruktur der C-terminalen Asparaginsäure Substitutions-Bibliothek.	83
Abbildung 4.14:	Dreidimensionale Peptidstruktur der Substitutionsbibliothek für die Analyse der Peptidkomposition.	86
Abbildung 4.15:	Dreidimensionale Peptidstruktur des antimikrobiellen Peptids O1 und seine Helixrad-Projektion.	88
Abbildung 4.16:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von kontaminierten U-937 Kulturen.	89
Abbildung 4.17:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kontaminierten L-929 Kulturen.	90

Abbildung 4.18:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von kontaminierten L-929 Kulturen nach 6 h.....	91
Abbildung 4.19:	Quantitative, durchflusszytometrische Analyse von mit antimikrobiellem Peptid behandelten Mischkulturen.	92
Abbildung 4.20:	Relative Peptidquantifizierung verschiedener antimikrobieller Peptide in Lösung unter Verwendung der PHQ und Epicocconone Methode.....	94
Abbildung 4.21:	Relative Quantifizierung von immobilisiertem BMAP-27 auf verschiedenen modifizierten Oberflächen unter Verwendung der Epicocconone Methode, sowie unter Verwendung eines peptidinternen Fluorophores.....	95
Abbildung 4.22:	Membran-permeabilisierende Eigenschaften von immobilisierten antimikrobiellen Peptiden.....	97
Abbildung 4.23:	Immobilisierungskonzentrationsabhängige Membranpermeabilisierung von <i>E. coli</i> durch BMAP-27-modifizierte Oberflächen.....	100
Abbildung 4.24:	Konzentrationsabhängige Membranpermeabilisierung von <i>E. coli</i> und U-937 Zellen durch das gelöste antimikrobielle Peptid BMAP-27.....	102
Abbildung 4.25:	Immobilisierungskonzentrationsabhängige Membranpermeabilisierung von Mischkulturen aus <i>E. coli</i> und U-937 Zellen durch BMAP-27-basierte antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen. ...	103
Abbildung 4.26:	Membranpermeabilisierung von <i>E. coli</i> aufgrund der Interaktion mit PLL- und BMAP-27-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen.....	104
Abbildung 4.27:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PLL- und BMAP-27-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen.	106
Abbildung 4.28:	Relative Quantifizierung von Oberflächen-assoziierten Aminen einzelner PLL-Schichten und ihrer Derivate, sowie der antimikrobiellen Peptide Protamin und BMAP-27.....	109
Abbildung 4.29:	Freisetzung von Protamin durch PLL-basierte Oberflächennetzwerke.....	111
Abbildung 4.30:	Freisetzung von Protamin durch PLL-modifizierte Wundauflagen.....	112
Anhang B.1:	Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers, sowie das Fluoreszenzspektrum von SYBR Green I und Propidiumiodid.....	161
Anhang B.2:	Schematische Darstellung von <i>E. coli</i> ML-35p.....	161
Anhang B.3:	Reaktionsmechanismus und Fluoreszenzspektrum von Epicocconone.....	162
Anhang B.4:	Schematische Darstellung der Reaktion zwischen PHQ und Arginin.....	162
Anhang B.5:	Silanisierung von Glasobjektträgern mittels GOPTS bzw. APTS.....	163
Anhang B.6:	Reaktion von primären Aminen mit Bernsteinsäureanhydrid.....	163
Anhang B.7:	Chemische Aktivierung von Carboxygruppen mittels EDC/NHS.....	164
Anhang B.8:	Reaktion von NHS-Estern mit primären Aminen.....	164
Anhang B.9:	Reaktion von Aldehyden mit primären Aminen.....	165
Anhang B.10:	Reaktion von Epoxiden mit primären Aminen.....	165
Anhang B.11:	Reaktion von Isothiocyanaten mit primären Aminen.....	165

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1:	Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften von natürlich vorkommenden Referenz-Peptiden.	55
Tabelle 4.2:	Membran-permeabilisierende Eigenschaften von antimikrobiellen Referenz-Peptiden.	59
Tabelle 4.3:	Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften von artifiziellen Peptiden mit generellem Sequenzmotiv und deren korrespondierender Substitutionsbibliothek.	65
Tabelle 4.4:	Membran-permeabilisierende Eigenschaften von artifiziellen Peptiden mit generellem Sequenzmotiv und deren korrespondierender Substitutionsbibliothek.	66
Tabelle 4.5:	Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek.	69
Tabelle 4.6:	Membran-permeabilisierende Eigenschaften der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek.	72
Tabelle 4.7:	Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften von Peptidbibliotheken für die Analyse des hydrophoben Bereichs, sowie der Anordnung von kationischen und hydrophoben Aminosäuren.	75
Tabelle 4.8:	Membran-permeabilisierende Eigenschaften von Peptidbibliotheken für die Analyse des hydrophoben Bereichs, sowie der Anordnung von kationischen und hydrophoben Aminosäuren.	77
Tabelle 4.9:	Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften der C-terminalen Asparaginsäure Substitutions-Bibliothek.	81
Tabelle 4.10:	Membran-permeabilisierende Eigenschaften der C-terminalen Asparaginsäure Substitutions-Bibliothek.	82
Tabelle 4.11:	Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften der Substitutionsbibliothek für die Analyse der Peptidkomposition.	84
Tabelle 4.12:	Membran-permeabilisierende Eigenschaften der Substitutionsbibliothek für die Analyse der Peptidkomposition.	85
Tabelle 4.13:	Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften der beiden optimierten antimikrobiellen Peptide O1 und O2.	87
Tabelle 4.14:	Membran-permeabilisierende Eigenschaften der beiden optimierten antimikrobiellen Peptide O1 und O2.	88
Tabelle 4.15:	Biophysikalische, antimikrobielle und Membran-permeabilisierende Eigenschaften antimikrobieller Peptide gegenüber <i>E. coli</i>	96
Tabelle 4.16:	Zusammenfassung der Aktivitäten von immobilisierten antimikrobiellen Peptiden.	99
Tabelle 4.17:	Immobilisierungskonzentrationsabhängige Inhibierung des bakteriellen Wachstums von <i>E. coli</i> durch BMAP-27-basierte antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen.	101
Anhang A.1:	Geräte.	155
Anhang A.2:	Peptide.	156
Anhang A.3:	Mikroorganismen.	157
Anhang A.4:	Puffer und Kulturmedien.	157
Anhang A.5:	Verbrauchsmaterialien.	158
Anhang A.6:	Sonstige Chemikalien und Komponenten.	159

Abkürzungsverzeichnis

∅	Therapeutische Kennzahl
°C	Grad Celsius
μ	Hydrophobizitätsmoment
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
A	Alanin
ABS	Absorption
ADC	<i>engl.</i> Analog-to-Digital-Converter (Analog-Digital-Wandler)
allg.	Allgemein
APTS	3-Aminopropyltriethoxysilan
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>engl.</i> Bovine serum albumin (Rinderalbumin)
bzw.	Beziehungsweise
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
deion.	Deionisiert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.</i> Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EGF	<i>engl.</i> Epidermal growth factor
em.	Emission
ESBL	Extended Spectrum β-Lactamase
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
ex.	<i>engl.</i> Excitation (Anregung)
F	Phenylalanin
FCS	<i>engl.</i> Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin
g	Gramm
GOPTS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan
H	Histidin
H	Hydrophobizität
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>engl.</i> High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
I	Isoleucin
k	Kilo
K	Lysin
KBE	Kolonie bildende Einheit
L	Leucin
L	Liter
LB	<i>engl.</i> Lysogeny broth
LBL	<i>engl.</i> Layer-by-Layer (Substratschichtung)
LD ₅₀	Mittlere lethale Dosis
Log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharide
M	Methionin
m	Milli (10 ⁻³)
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MHB	<i>engl.</i> Mueller-Hinton-Bouillon
MIC	<i>engl.</i> Minimal inhibitory concentration (Minimale inhibitorische Konzentration)

Abkürzungsverzeichnis

min.....	Minute
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MTK	Minimale toxische Konzentration
N.....	Asparagin
n. a.....	<i>engl.</i> Not applicable (nicht anwendbar, bzw. nicht zutreffend)
NCF.....	Nitrocefin
NHS.....	N-Hydroxysuccinimid
NK.....	Negativkontrolle
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ONPG	O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
P.....	Prolin
PBS.....	<i>engl.</i> Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDB	Protein Data Bank
PDITC	1,4-Phenyldiisothiocyanat
PEG	Polyethylenglycol
PHQ.....	9,10-Phenanthrenequinone
PLL	Poly- α -L-Lysin
PLL-COOH	Carboxyliertes Poly- α -L-Lysin
PLL-NH ₂	Poly- α -L-Lysin
PMT.....	<i>engl.</i> photomultiplier tube (Photoelektronenvervielfacher)
PNA.....	<i>engl.</i> peptide nucleic acid (Peptid-Nukleinsäure)
PP.....	Polypropylen
PS	Polystyrol
Q.....	Glutamin
R	Arginin
RPMI.....	Roswell Park Memorial Institute
S.....	Serin
<i>S. xylosus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
SPPS	<i>engl.</i> Solid-phase peptide synthesis (Festphasenpeptidsynthese)
T.....	Threonin
TRIS.....	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
V	Valin
W	Tryptophan
X-PLL	Aus X Schichten bestehendes PLL-Konstrukt
Z.....	Nettoladung
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Kontrolle und Behandlung von bakteriellen Infektionen ist in der heutigen Gesellschaft von zentraler Bedeutung. Insbesondere hat der intensive Einsatz von Antibiotika-basierten Therapien zu einer maßgeblichen Entwicklung und Steigerung von antibiotikaresistenten Bakterien geführt, zu welchen unter anderem Bakterien wie der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), sowie ESBL exprimierende *Enterobacteriaceae* gehören. Diese Bakterienklassen repräsentieren eine der größten Herausforderungen bei der Behandlung von bakteriellen Infektionen und haben sich zu einem erheblichen Problem des humanen Gesundheitswesens entwickelt. Deshalb wurde in den vergangenen Jahren die Entwicklung von alternativen, therapeutisch einsetzbaren, antimikrobiellen Substanzen intensiviert. Jedoch konnten innerhalb der letzten Jahre nur wenige neue antimikrobielle Stoffe entwickelt werden, wobei diese in vielen Fällen auf bereits bekannten und intensiv genutzten Grundstrukturen von Antibiotika beruhten. Als aussichtsreiche Alternative wurden in den vergangenen Jahren Peptide, welche sowohl über antimikrobielle als auch biologisch kompatible Eigenschaften verfügen, hinsichtlich ihres therapeutischen Potentials untersucht. Sie repräsentieren eine vielfältige Klasse von Biomolekülen, welche häufig Teil des angeborenen Immunsystems vieler pro- und eukaryotischer Organismen sind. Des Weiteren konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie im Vergleich zu traditionellen Antibiotika über andere Wirkmechanismen verfügen, welche bereits als bakterizid oder bakteriostatisch klassifiziert wurden. Aufgrund ihrer ausgeprägten, charakteristischen lytischen Eigenschaften und Interaktionsmechanismen mit prokaryotischen Membranen wird davon ausgegangen, dass eine Entwicklung von bakteriellen Resistenzen wenig wahrscheinlich ist, weshalb diese Klasse von Biomolekülen eine aussichtsreiche Alternative zu traditionellen Antibiotika darstellt. Jedoch weisen einige antimikrobielle Peptide auch ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften gegenüber eukaryotischen Zellen auf, wodurch deren klinische und industrielle Anwendung stark eingeschränkt ist. Darüber hinaus kann der Einsatz natürlich vorkommender antimikrobieller Peptide auch aufgrund ihrer hohen Fabrikationskosten, sowie ihrer schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften limitiert sein. Weiterhin besteht das Risiko, dass die klinische oder industrielle Verwendung von Peptiden, welche in einem engen Zusammenhang mit den natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptiden des Immunsystems stehen, zu einer Resistenzausbildung führen könnte. Dies würde neben dem Verlust der antimikrobiellen Wirkung in klinischen oder industriellen Anwendungen ebenfalls zu einer negativen Beeinflussung der natürlichen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems gegenüber bakteriellen Infektionen führen. Aus diesen Gründen ist die Verwendung natürlich vorkommender antimikrobieller Peptide stark limitiert, weshalb insbesondere Peptide mit alternativen Sequenzen, welche keine Analogien zu natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptiden besitzen, einen aussichtsreichen Ansatzpunkt darstellen. Deshalb wird ein rationales Design von artifiziellen Peptiden angestrebt, welche neben antimikrobiellen auch über biologisch kompatible Eigenschaften verfügen sollen und zudem für eine klinische oder industrielle Anwendung hinsichtlich ihrer Produktionskosten optimiert sind.

Hierfür werden neben dem rationalen Design der artifiziellen Peptide verschiedene Peptidbibliotheken eingesetzt, unter deren Zuhilfenahme die essenziellen Regionen innerhalb der Primärsequenz identifiziert werden. Außerdem werden diese auch für die Identifikation der biophysikalischen Eigenschaften verwendet, welche den charakteristischen antimikrobiellen Eigenschaften der Peptide zugrunde liegen, um somit anhand von *in silico* Modellierungen optimierte Peptidsequenzen zu generieren. Zudem werden unter Verwendung dieser Bibliotheken die zytotoxischen Eigenschaften gegenüber eukaryotischen Zellen charakterisiert, um somit im Zuge der systematischen Entwicklung von optimierten Peptidsequenzen limitierende, biologische Inkompatibilitäten zu vermeiden. Während dieser Optimierung werden die Peptide ebenfalls auf eine minimale Sequenz reduziert, um anfallende Produktions- und Aufreinigungskosten zu reduzieren.

Neben der direkten Therapie von bakteriellen Infektionen ist vor allem auch die Verbreitungskontrolle und Prävention von bakteriellen Infektionen und Kontaminationen in der heutigen Gesellschaft von fundamentaler Bedeutung. Aufgrund der Tatsache, dass Bakterien in der Lage sind feste Materialien kurz- oder langfristig besiedeln zu können, stellen kontaminierte Oberflächen ein maßgebliches Reservoir für deren Verbreitung dar. Dies ist bei vielen Anwendungen von fundamentaler Bedeutung, wie z. B. in industriellen Anlagen, lebensmittelverarbeitenden Betrieben, Bildungseinrichtungen, Krankenhäusern, sowie bei medizinischen Geräten. In diesem Zusammenhang stellen vor allem nosokomiale Infektionen ein großes Problem dar, wobei insbesondere Implantat-assoziierte bakterielle Oberflächenkontaminationen einen der häufigsten Infektionswege repräsentieren. Adhäsiv an feste Oberflächen gebundene Bakterien sind in der Lage Kolonien sowie komplexe Biofilme zu bilden, welche eine erhöhte Resistenz gegenüber antimikrobiellen Behandlungen, im Vergleich zu den korrespondierenden planktonischen Bakterien, aufweisen. Dies erschwert die dauerhafte Entfernung solcher Biofilme erheblich. Ferner zeigen erfolgreich behandelte Biofilme eine rapide Neubesiedelung durch Bakterien, weshalb ein präventiver Schutz gegenüber Oberflächen-assoziierten Kontaminationen erstrebenswert ist. In diesem Zusammenhang wurden bereits antimikrobielle Oberflächenmodifikationen entwickelt, um eine langanhaltende Prävention vor bakteriellen Kontaminationen zu realisieren. Aufgrund der Tatsache, dass jedoch viele der verwendeten Oberflächen-assoziierten Substanzen neben antimikrobiellen auch zytotoxische Eigenschaften oder biologische Inkompatibilitäten aufweisen, welche eine potentielle Applikation der Oberflächenbeschichtung limitieren, wurden bereits Peptid-basierte antimikrobielle Oberflächenmodifikationen generiert. Von ausschlaggebender Bedeutung ist hierbei, dass das verwendete antimikrobielle Peptid in einem funktionalen Zustand immobilisiert wird und die sterischen Eigenschaften, welche durch die Oberfläche vermittelt werden, keine Limitierung des Wirkmechanismus und der damit verbundenen antimikrobiellen Aktivität darstellen. Obendrein sind bei der Generierung von Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenmodifikationen die verwendeten chemischen Ligationen von entscheidender Bedeutung, da sie aufgrund der jeweiligen chemischen Reaktivitäten sowohl einen Einfluss auf die Immobilisierungseffizienz und Immobilisierungskinetik, als auch auf die Orientierung und Funktionalität des antimikrobiellen Peptids auf der Oberfläche besitzen.

Aus diesem Grund wird die Entwicklung einer Strategie für die Generierung von Peptid-basierten Oberflächenmodifikationen mit antimikrobieller Aktivität angestrebt. Hierfür werden die antimikrobiellen Charakteristiken verschiedener, natürlich vorkommender Peptide im immobilisierten sowie gelösten Zustand analysiert und verglichen, um den Einfluss der Immobilisierung auf die Aktivität zu evaluieren. Zusätzlich werden die Wirkmechanismen der verwendeten antimikrobiellen Peptide analysiert und deren Bedeutung für die Funktionalität im immobilisierten Zustand untersucht, um Peptide oder Peptidklassen zu identifizieren, welche sich als funktionale Moleküle für eine kovalente antimikrobielle Oberflächenbeschichtung eignen. Obendrein wird der Einfluss der verwendeten chemischen Ligationen auf die immobilisierte Peptidmenge und die Aktivität im kovalent immobilisierten Zustand analysiert, um eine optimierte chemische Reaktionsstrategie zu entwickeln, welche neben optimierten antimikrobiellen Eigenschaften auch eine Optimierung der Produktionskosten aufgrund der Reduktion der verwendeten Peptidmenge ermöglicht. Aufgrund der Tatsache, dass bei einigen angestrebten Anwendungen nicht nur die Inhibierung der bakteriellen Adhäsion sondern auch die Prävention von oberflächennahen Kontaminationen von essenzieller Bedeutung ist, werden ebenfalls alternative Oberflächenmodifikationen entwickelt, deren antimikrobielle Aktivität nicht durch den direkten Kontakt zwischen den Bakterien und der Oberfläche limitiert ist.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide repräsentieren eine große und heterogene Klasse von Biomolekülen. Es handelt sich hierbei meist um kurze, unmodifizierte Oligopeptide, welche neben sehr kurzen Peptidsequenzen von lediglich 12 Aminosäuren auch Peptidsequenzen von bis zu 50 Aminosäuren umfassen können. Diese Peptide sind Teil des angeborenen Immunsystems vieler pro- und eukaryotischer Lebewesen und wurden bereits bei Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien identifiziert [1-4]. Sie zeichnen sich durch ein breites antimikrobielles Wirkspektrum aus und besitzen einen maßgeblichen Anteil bei der natürlichen Prävention und Therapie von bakteriellen Infektionen [5, 6]. Neben den antimikrobiellen Eigenschaften wurden bereits auch antifungale [7-9] sowie antiparasitäre [1, 10] Eigenschaften, als auch Aktivitäten gegenüber Viren [11, 12] und Tumoren [13] nachgewiesen. Neben den direkten Interaktionen dieser Peptide mit den jeweiligen Zielorganismen konnten darüber hinaus auch immunmodulatorische Aktivitäten festgestellt werden [5, 6, 14].

Die jeweiligen Sequenzinformationen der Peptide sind in vielen Fällen genetisch kodiert und werden ribosomal transkribiert, wobei einerseits das antimikrobielle Peptid direkt transkribiert werden kann oder aber andererseits durch spätere proteolytische Spaltung aus einem Präkursor-Peptid generiert wird. Zudem werden einige Peptide auch mittels nicht ribosomaler Peptidsynthese durch zytoplasmatische Peptid-Synthetasen produziert [15]. Hierbei sind diese daran beteiligten Synthetasen spezifisch für die Produktion eines antimikrobiellen Peptides. Durch die enzymatische Katalyse können neben den proteinogenen Aminosäuren auch unnatürliche Aminosäuren, Modifikationen oder Zyklisierungen integriert werden [16]. Weiterhin unterscheiden sich die Peptidsequenzen hinsichtlich der jeweils korrespondierenden Spezies, weshalb sich aus ihren Sequenzinformationen direkte Zusammenhänge zur jeweiligen evolutionären Entwicklung des Organismus ableiten lassen [17, 18]. Hinsichtlich ihrer Primärstruktur ist das vermehrte Auftreten von hydrophoben sowie kationischen Aminosäuren charakteristisch, weshalb diese Peptide in vielen Fällen eine positive Nettoladung und eine erhöhte Hydrophobizität aufweisen [19].

Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften wurden erstmals 1922 in Form von Lysozym beschrieben [20], was nach heutigem Wissensstand zwar das erste beschriebene, Aminosäure-basierte Biomolekül mit antimikrobiellen Eigenschaften ist, aber aufgrund seiner Komplexität von 129 Aminosäuren und seinem katalytischen Wirkmechanismus nicht in die heutige Kategorie der antimikrobiellen Peptide eingeordnet werden kann. Die ersten nach heutiger Definition beschriebenen antimikrobiellen Peptide sind die Gramacidine, welche 1939 aus den Kulturüberständen einer *Bacillus brevis* Kultur isoliert wurden und starke antimikrobielle Eigenschaften gegenüber einer Vielzahl von grampositiven und gramnegativen Bakterien besaßen [21, 22]. Ein weiterer Meilenstein in der Forschung auf dem Gebiet der antimikrobiellen Peptide sind die Studien über das Immunsystem der Motte *Hyalophora cecropia*. Hierbei konnte eine durch Bakterien induzierte Immunantwort festgestellt werden, welche neben dem bereits bekannten Protein Lysozym auch weitere, weitaus kürzere Peptide mit einer Länge von 35 bis 39 Aminosäuren

umfasste. Basierend auf ihrem Ursprung werden diese Peptide heutzutage als Cecropine bezeichnet [23, 24]. Gegenwärtig sind bereits mehr als 1500 antimikrobielle Peptide bekannt, welche unter anderem auch Peptidderivate und nicht natürlich vorkommende Peptide umfassen [25]. Darüber hinaus wurden bereits viele dieser Peptide hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften sowie ihres antimikrobiellen Charakters untersucht. Für die übergreifende Klassifizierung von antimikrobiellen Peptiden werden gegenwärtig verschiedene Nomenklaturen verwendet. Die Klassifizierung kann anhand von Peptideigenschaften oder der Peptidabstammung vorgenommen werden, welche sich im Namen widerspiegeln [25, 26]. So besteht beispielsweise das humane Peptid LL-37 aus 37 proteinogenen Aminosäuren, welche ein doppeltes Leucin-Motiv innerhalb der N-terminalen Region des Peptids aufweisen, wohingegen das Peptid BMAP-27 (bovine myeloid antimicrobial peptide-27) aus 27 proteinogenen Aminosäuren besteht und durch die myeloiden Zellen des Rindes produziert wird. Zudem kann die Namensgebung auch auf der molekularen Abstammung der Peptide basieren, so wie es z. B. bei der Klasse der Cathelicidine üblich ist, welche eine gewisse Sequenzhomologie zu dem Präkursor-Protein Cathelin aufweisen [27]. Neben den Sequenzeigenschaften oder der Abstammung werden Peptide auch nach ihrer generellen Funktion als antimikrobiell wirkende Peptide bezeichnet, wie es z. B. bei der Klasse der Defensine zu beobachten ist [28]. Eine weitaus universellere Nomenklatur stellt die Klassifizierung der Peptide basierend auf ihren biophysikalischen und chemischen Eigenschaften dar. Diesbezüglich werden die Peptide entsprechend ihrer Charakteristika in kationische, neutrale oder anionische Peptide, beziehungsweise in hydrophile, amphipatische oder hydrophobe Peptide eingeordnet. Diese Kategorisierung kann unter Einbeziehung des vorherrschenden Sekundärstrukturmotivs der antimikrobiellen Peptide erweitert werden und ermöglicht somit die Einteilung in vier unterschiedliche Kategorien [19, 25, 26, 29, 30]. Die erste Kategorie umfasst lineare Peptide welche hauptsächlich aus α -helikalen Strukturen bestehen, zu welchen unter anderem Cecropin A [31] und LL-37 [32] gehören. Die zweite Kategorie beinhaltet Peptide, welche über ein ausgedehntes Strukturmotiv mit β -Faltblättern verfügen, welche ebenfalls durch mehrere Disulfidbrücken stabilisiert sein können, wie es beispielsweise bei dem antimikrobiellen Peptid Tachyplesin der Fall ist [33]. Hierbei kann die Anzahl der β -Faltblätter variieren. Die dritte Kategorie wird durch Peptide mit gemischten Sekundärstrukturen repräsentiert. So beinhaltet sie unter anderem das humane antimikrobielle Peptid β -Defensin 2, welches als Strukturmerkmal ein dreifaches antiparalleles β -Faltblatt, sowie eine α -Helix am C-terminalen Peptidende aufweist [34, 35]. In der vierten und letzten Kategorie werden Peptide zusammengefasst, welche über keine ausgeprägten und definierten Sekundärstrukturen verfügen. Dementsprechend handelt es sich meist um Peptide die eine gestreckte Peptidkonformation annehmen, welche weiterhin durch Schleifenstrukturen ergänzt sein kann. Ein Beispiel hierfür ist das antimikrobielle Peptid Indolicidin, welches eine nahezu gestreckte Konformation ohne charakteristische Sekundärstrukturen aufweist [36]. Ein weiteres Merkmal dieses antimikrobiellen Peptids ist der hohe prozentuale Anteil an Tryptophanen und Prolinen, welche maßgeblich zur Konformationsausprägung und Stabilisierung beitragen (Abbildung 2.1).

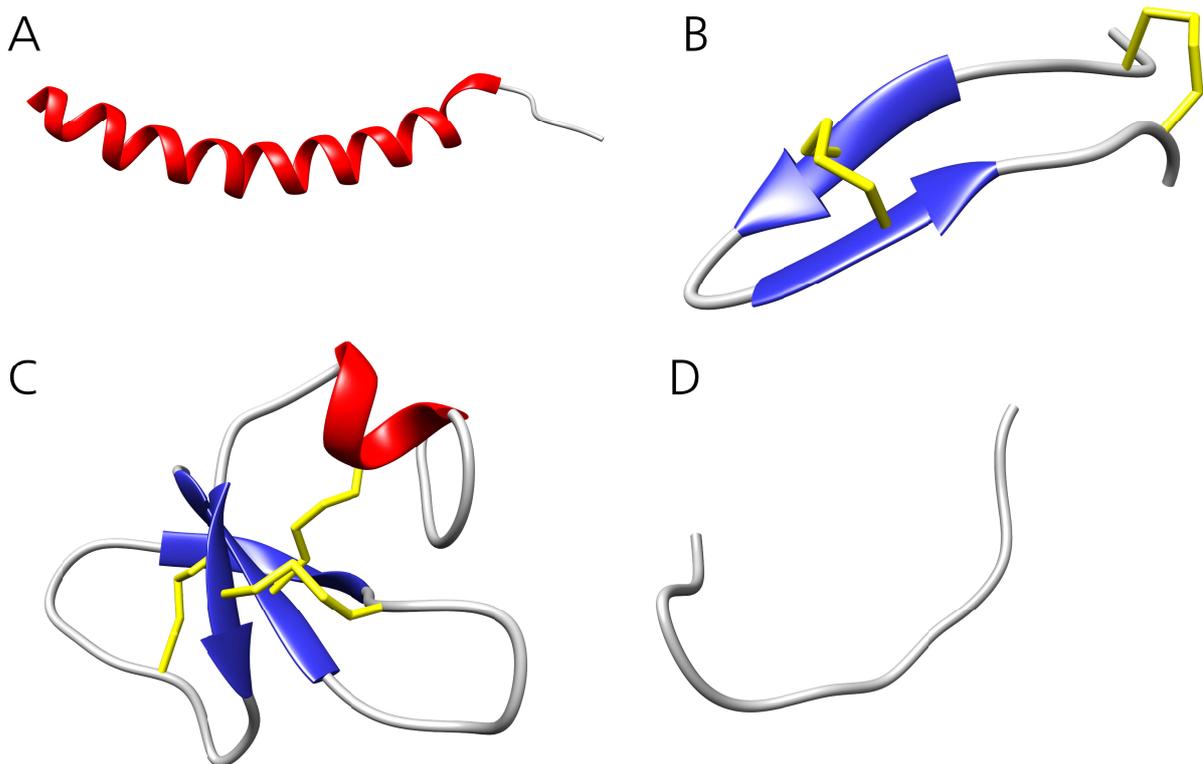


Abbildung 2.1: Strukturmerkmale der antimikrobiellen Peptidklassen. Dargestellt sind dreidimensionale Bändermodelle von vier repräsentativen antimikrobiellen Peptiden der verschiedenen Peptidklassen, welche sich aufgrund ihrer Struktur motive unterscheiden. **(A)** Peptide mit ausgedehnten α -helikalen Strukturen (LL-37 [32]), **(B)** Peptide mit antiparallelen β -Faltblättern, welche darüber hinaus durch mehrere Disulfidbrückenbindungen verbunden und stabilisiert sein können (Tachyplesin [33]), **(C)** Peptide mit gemischten Sekundärstrukturen (humanes β -Defensin 2 [34, 35]), **(D)** Peptide ohne definierte Sekundärstruktur (Indolicidin [36]). α -helikale Strukturen sind rot, β -Faltblätter blau und Regionen ohne definiertes Strukturmotiv sind grau gefärbt, wohingegen Disulfidbrücken gelb hervorgehoben sind.

2.1.1 Wirkmechanismus

Seit der Dokumentation von Lysozym im Jahr 1922 wurden umfangreiche antimikrobielle Eigenschaften von vielerlei Sekreten aus verschiedenen Organismen gegenüber grampositiven als auch gramnegativen Bakterien beschrieben [37]. Obwohl zum Zeitpunkt der Beschreibung der antimikrobiellen Eigenschaften weder der genaue Inhaltsstoff noch die genauen Funktionsweisen bekannt waren, wurden die aus heutiger Sicht bekannten antimikrobiellen Peptide bereits frühzeitig hinsichtlich ihrer Charakteristika und Funktionsweisen klassifiziert. Erstmals wurden die heutigen antimikrobiellen Peptide als basische Proteine oder Polypeptide bezeichnet, welche mit negativ geladenen Bestandteilen der bakteriellen Zelloberfläche interagieren und dadurch wichtige, zelluläre Funktionen stören. Des Weiteren wurde für den primären Wirkmechanismus eine elektrostatische Interaktion vermutet [37]. Diese bereits frühzeitig beschriebene elektrostatische Interaktion ist auch heute noch ein wesentlicher Bestandteil der Charakterisierung des antimikrobiellen Wirkprinzips, welches darüber hinaus weitere charakteristische Mechanismen beinhaltet [38]. Prinzipiell werden die antimikrobiellen Eigenschaften der Peptide durch eine Rezeptor-unabhängige Interaktion mit der bakteriellen Zellmembran vermittelt und repräsentieren somit eine unspezifische Wechselwirkung [39-41]. Im Allgemeinen wird heutzutage zwischen der bakteriziden Wirkung, welcher in

erster Linie die Permeabilisierung der bakteriellen Zellmembran zu Grunde liegt, und der bakteriostatischen Interaktion, welche auf der Translokation der Peptide über die Zellmembran in Kombination mit einer Inhibierung von fundamentalen, zellulären Prozessen beruht, unterschieden [39]. Die bakterizide Wirkung ist deutlich verbreiteter als die bakteriostatische und wird aus diesem Grund in vielen Fällen als ein charakteristisches Merkmal für antimikrobielle Peptide interpretiert. Die antimikrobiellen Interaktionen werden hierbei vorrangig durch die elektrostatischen Wechselwirkungen der kationischen Peptide mit den anionischen Komponenten innerhalb der bakteriellen Zellmembran, welche hauptsächlich durch Lipopolysaccharide (LPS) und anionische Phospholipide repräsentiert werden, initiiert [42, 43]. Vor der Interaktion mit der bakteriellen Zellmembran überwinden die Peptide darüber hinaus die Polysaccharidschicht von gramnegativen Bakterien, bzw. die Teichon- und Lipoteichonsäuren, sowie die Peptidoglycane bei grampositiven Bakterien [39]. Im Anschluss daran folgt die Anlagerung der Peptide an die Membran, wobei die Peptide bei geringen Peptid/Lipid Verhältnissen sich parallel zur Membranoberfläche orientieren [44]. Im Anschluss an die Interaktion unterscheiden sich die Wirkmechanismen der bakterizid und bakteriostatisch wirkenden Peptide grundlegend voneinander.

Bei der bakteriziden Wirkung führen erhöhte Peptid/Lipid Verhältnisse, welche oberhalb eines charakteristischen Schwellenwerts liegen, zu einer Veränderung der räumliche Anordnung von an der Zellmembran gebundenen Peptiden, woraufhin sie sich vertikal ausrichten und als Folge dessen in die Zellmembran integriert werden und transmembrane Poren ausbilden. Ferner finden dabei Konformationsänderungen der Peptide statt, welche durch die amphiphilen Eigenschaften der Zellmembran hervorgerufen werden. Dies zeigt sich besonders stark bei Peptiden, die über charakteristische Sekundärstrukturmerkmale verfügen, welche wiederum mit den jeweiligen antimikrobiellen Eigenschaften assoziiert sind. Dieser Mechanismus ist besonders stark bei antimikrobiellen Peptiden mit α -helikalen Strukturen ausgeprägt, welche in einer hydrophilen Umgebung eine völlig unstrukturierte Konformation annehmen und innerhalb der amphiphilen Umgebung der bakteriellen Zellmembran ausgeprägte Sekundärstrukturmotive ausbilden [45-47]. Unabhängig von der Peptidkonformation existieren drei Interaktionsmodelle, welche den detaillierten Mechanismus der antimikrobiellen Wirkung beschreiben (Abbildung 2.2). Diese unterscheiden sich in der Anordnung der Peptide zueinander, bzw. in der Veränderung der Zellmembrane aufgrund der Interaktion mit den antimikrobiellen Peptiden [39]. Im „barrel-stave model“ wird von der Ausprägung einer α -helikalen Konformation des Peptids ausgegangen, welches aufgrund seiner Hydrophobizität mit den zentralen, hydrophoben Kernbereichen der Lipiddoppelschicht interagiert [44]. Zudem aggregieren mehrere Peptide miteinander, wobei sich ihre jeweiligen hydrophilen Bereiche entgegengesetzt zu den hydrophoben Membrankomponenten orientieren. Dadurch wird eine hydrophile, transmembrane Pore ausgebildet. Die Limitierung dieses Modells besteht darin, dass Peptide oder deren Aggregate den hydrophoben Bereich der bakterielle Membran vollständig durchspannen müssen, um die hydrophoben Eigenschaften der Lipiddoppelschicht vollständig abzuschirmen, was die Ausbildung eines transmembranen Kanals mit hydrophilen Eigenschaften ermöglicht. Diese Membran-Peptid-Interaktionen werden neben den Peptid-vermittelten Eigenschaften außerdem auch durch die Membranzusammensetzung und deren Beschaffenheit beeinflusst [48]. Eine leichte Variation dieser Wirkweise beschreibt das „toroidal-pore

model“, welches von einer Krümmung der bakteriellen Membran durch die Interaktion mit den antimikrobiellen Peptiden ausgeht. Dabei interagieren zunächst die kationischen Komponenten der Peptide mit den anionischen Komponenten innerhalb der Lipiddoppelschicht. Durch eine Orientierung der Peptide vertikal zur Membranebene, wird basierend auf den elektrostatischen Wechselwirkungen, die Zellmembran gebogen, was abschließend ebenfalls in einer transmembranen Pore mit hydrophilem Kern resultiert. Hierbei unterstützen jedoch die hydrophilen Kopfgruppen der bakteriellen Membran die Abschirmung der hydrophilen Pore gegenüber den hydrophoben Regionen der bakteriellen Lipiddoppelschicht und tragen somit zu einer Stabilisierung der transmembranen Pore bei. In diesem Zusammenhang sind vor allem die elektrostatischen Interaktionen zwischen Peptid und Lipiddoppelschicht von entscheidender Bedeutung. Die hydrophoben Interaktionen, welche bei dem „barrel-stave model“ ein wesentlicher Bestandteil des Wirkmechanismus sind, besitzen bei dem „toroidal-pore model“ lediglich eine geringe Relevanz. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sowohl die hydrophilen Eigenschaften des gebildeten Kanals, als auch die Interaktion mit den anionischen Komponenten der Bakterienmembran hauptsächlich durch die kationischen Eigenschaften der Peptide vermittelt werden. Somit beschreibt dieses Modell auch die Ausprägung von hydrophilen Kanälen durch antimikrobielle Peptide deren hydrophober Bereich nicht ausreichend ausgeprägt ist, um die hydrophoben Bereiche der Lipiddoppelschicht vollständig abzuschirmen. Eine weitere und grundsätzlich andere Art der Membranpermeabilisierung repräsentiert der Wirkmechanismus welcher durch das „carpet model“ beschrieben wird [49]. Hierbei aggregieren die Peptide zunächst miteinander an der Zellmembranoberfläche, wobei von einer flächendeckenden, teppichartigen Anordnung ausgegangen wird, welche bei Überschreitung des jeweiligen charakteristischen Schwellenwerts die Zellmembran in einem Detergenz-ähnlichen Verfahren permeabilisieren. Demzufolge können, je nach Art und Stärke der antimikrobiellen Eigenschaften, mittels Mizellbildung komplexe Membrankomponenten oder Membransegmente aus der Zellmembran gelöst werden [50, 51]. Trotz der Unterschiede bei der Permeabilisierung der bakteriellen Zellmembran, welche durch die drei Mechanismen beschrieben wird, ähneln sie sich dahingehend, dass die letale Wirkung der Peptide letztendlich auf mehreren voneinander abhängigen Beeinträchtigungen des Zellmetabolismus beruht. Hierzu gehören in erster Linie die Aufhebung des Membranpotentials und des pH-Gradienten sowie die Beeinträchtigung des osmotischen Drucks und die Inhibierung der Atmungskette [52-54]. Des Weiteren ist die bakterizide Wirkung von antimikrobiellen Peptiden durch das Austreten von essenziellen zellinternen Komponenten wie z. B. Ionen, Kofaktoren oder Stoffwechselprodukten gekennzeichnet. Dies konnte bereits mittels verschiedener Testmethoden, wie der zellexternen ATP Detektion [55], elektrochemischen Detektion von austretenden Natriumionen [56], sowie der Fluoreszenzfärbung von Membranen und zellinternen Komponenten mittels zellmembranundurchlässiger Fluoreszenzfarbstoffe [57] verifiziert werden. Zudem wurden die genauen Auswirkungen antimikrobieller Peptide auf die bakterielle Zellmembran bereits mittels Neutronenstreuung untersucht, wodurch die Ausbildung von stabilen, transmembranen Poren festgestellt werden konnte [58]. Auch die morphologischen Veränderungen der bakteriellen Zellmembran aufgrund der Einwirkung antimikrobieller Peptide wurden bereits mittels Rasterelektronenmikroskopie analysiert und beschrieben [59-61]. Hinsichtlich dieser Untersuchungen konnte die Korrelation der antimikrobiellen Eigenschaften mit

signifikanten morphologischen Veränderungen der Membran gezeigt werden. Obwohl viele Untersuchungen die generelle bakterizide Wirkung der antimikrobiellen Peptide belegen, ist jedoch eine genaue Differenzierung der einzelnen Wirkmechanismen nur schwer möglich. Es ist sogar unklar, ob es sich bei den beschriebenen Modellen tatsächlich um individuelle Mechanismen handelt oder ob die verschiedenen Interaktionen einen stetigen, graduellen Prozess darstellen [62].

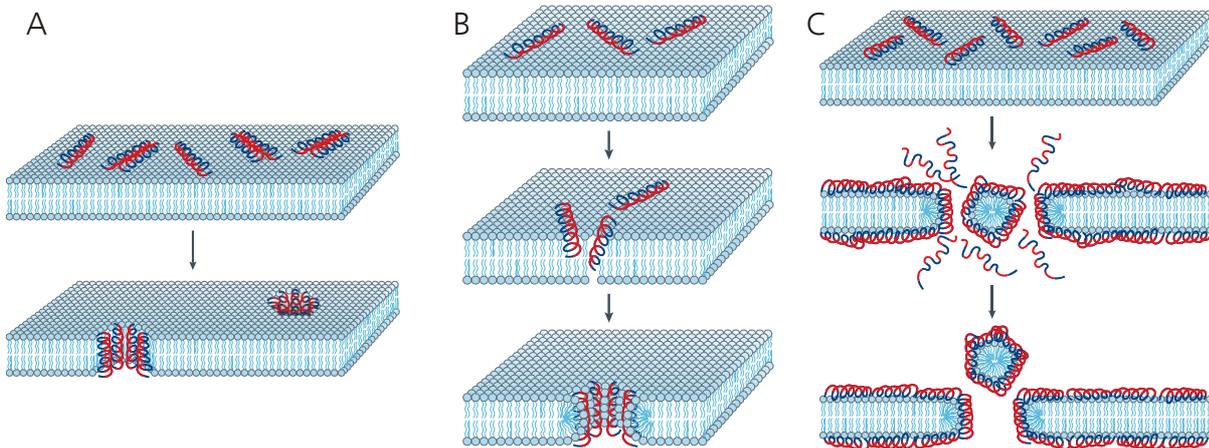


Abbildung 2.2: Modelle für die Membranpermeabilisierung durch antimikrobielle Peptide. Dargestellt sind drei Modelle, welche die Membranpermeabilisierung der bakteriellen Membran durch die Einwirkung von bakterizid-wirkenden antimikrobiellen Peptiden darstellen [39][1]. **(A)** Im „barrel-stave model“ interagieren die hydrophoben Regionen der antimikrobiellen Peptide mit den zentralen hydrophoben Regionen der Lipiddoppelschicht, wohingegen die hydrophilen Bereiche der Peptide entgegengesetzt zur Membran orientiert sind. Durch eine Aggregation mehrerer Peptide entstehen transmembrane Poren mit einem hydrophilen Kern. **(B)** Im „toroidal-pore model“ wird die bakterielle Membran durch die Einwirkung der antimikrobiellen Peptide gekrümmt, wodurch eine transmembrane Pore mit hydrophilem Kern entsteht. Diesbezüglich sind die elektrostatischen Wechselwirkungen der kationischen antimikrobiellen Peptide mit den anionischen Kopfgruppen der Lipide von essenzieller Bedeutung. **(C)** Im „carpet model“ wird die bakterielle Zellmembran durch ein Detergenz-ähnliches Verfahren permeabilisiert. Demzufolge werden durch partielle Mizellbildung Komponenten aus der Membrane extrahiert.

Eine andere Art der antimikrobiellen Wirkung wird durch die bakteriostatischen Effekte einiger antimikrobieller Peptide repräsentiert (Abbildung 2.3). In diesem Kontext zeigen die Peptide starke inhibitorische Eigenschaften, welche die bakterielle Lebensfähigkeit stark reduzieren, wobei das Membranpotential und die Morphologie der Zellmembran erhalten bleiben. Darüber hinaus ist dieser bakteriostatische Wirkmechanismus nicht durch den Verlust von essenziellen, zellinternen Komponenten charakterisiert. In diesem Zusammenhang ist die Translokation der Peptide über die bakterielle Zellmembran ein essenzieller Bestandteil des antimikrobiellen Wirkmechanismus. Diese Peptide verfügen über eine selbst geförderte Aufnahme („self promoted uptake“), welche unabhängig von aktiven, membranständigen Transportproteinen oder anderen Membranbestandteilen ist und in erster Linie durch den Mechanismus der antimikrobiellen Peptide definiert wird [16, 63]. Die antimikrobielle Wirkung beruht im Allgemeinen darauf, dass fundamentale Prozesse innerhalb des Bakteriums inhibiert werden [64]. Hierzu gehören unter anderem der Zellmetabolismus [65], die Transkription [66] und Translation [67], sowie die Proliferation [68]. So demonstrierten z. B. Analysen des antimikrobiellen Aktivitätsprofils von Buforin II, dass die enthaltene Aminosäure Prolin zu der Ausbildung einer Gelenkregion führt, welche essenziell für die passive Translokation des bakteriostatisch wirkenden Peptids ist [64]. Ohne diese Region fand lediglich eine Anlagerung des Peptids an die Bakterienmembran, ohne Ausprägung von

antimikrobiellen Eigenschaften statt, wohingegen das unmodifizierte und antimikrobiell wirkende Peptid im Zytoplasma angereichert wurde und zudem eine hohe Affinität gegenüber der DNA besaß [69].

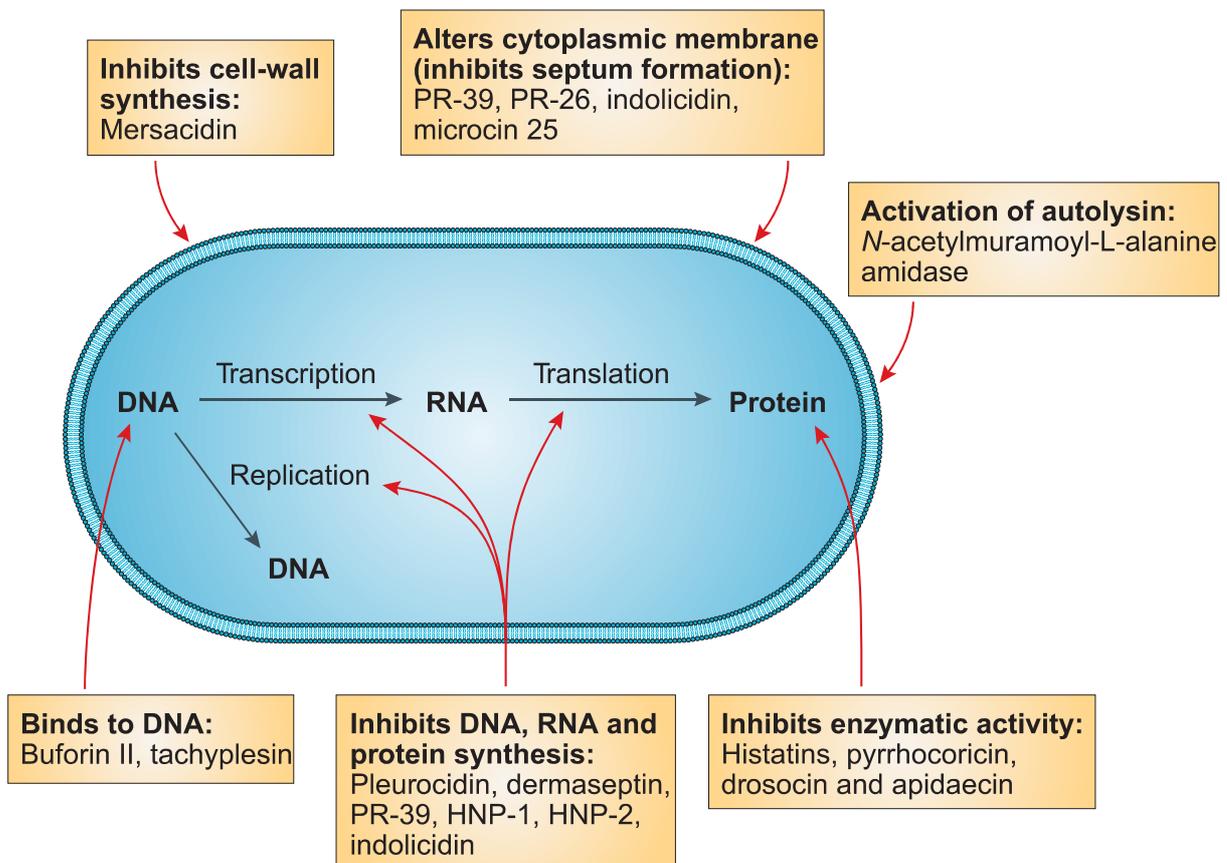


Abbildung 2.3: Wirkweise von antimikrobiellen Peptiden mit bakteriostatischen Eigenschaften. Dargestellt ist eine Zusammenfassung von exemplarischen antimikrobiellen Peptiden und deren korrespondierenden Wirkmechanismen [39][II]. Die antimikrobielle, bakteriostatische Wirkung beruht auf der Inhibierung fundamentaler Prozesse innerhalb des Bakteriums. Hierzu gehören unter anderem der Zellmetabolismus, die Transkription und Translation sowie die Proliferation.

2.1.2 Selektivität zwischen Pro- und Eukaryoten

Antimikrobielle Peptide sind Teil des angeborenen Immunsystems vieler pro- und eukaryotischer Lebewesen [1-4] und zeichnen sich durch ein breites antimikrobielles Wirkspektrum aus [5, 6]. Aufgrund ihrer Rezeptor-unabhängigen Interaktion [39-41] mit Lipiddoppelschichten weisen sie sowohl antimikrobielle Eigenschaften gegenüber Prokaryoten als auch zytotoxische Eigenschaften gegenüber Eukaryoten auf [70-72]. Deshalb ist es essenziell, dass die antimikrobielle Wirkung dieser Peptide *in vivo* kontrolliert wird um eine effiziente Prävention und Therapie von bakteriellen Infektionen zu gewährleisten und gleichzeitig toxische Eigenschaften gegenüber dem produzierenden Organismus zu vermeiden. Aus diesen Gründen haben sich im Laufe der Evolution mehrere Regulationsmechanismen entwickelt zu welchen unter anderem die Regulation der Peptid Expression gehört [73]. In menschlichem Gewebe werden vielerlei antimikrobielle Peptide produziert, welche hauptsächlich für den Schutz von exponierten äußeren Oberflächen verantwortlich sind. Hinsichtlich dessen werden diese Peptide entweder konstitutiv exprimiert wie z. B. die Histatine [74] und das humane β -Defensin 1 [75], oder aber deren Expression

durch eine bakterielle Infektion induziert [76], wie es z. B. bei dem humanen antimikrobiellen Peptid LL-37 zu beobachten ist [77]. In diesem Kontext fungieren die antimikrobiellen Peptide weniger als präventiver, beständiger Abwehrmechanismus gegenüber bakteriellen Infektionen sondern vielmehr als Teil der aktiven Immunantwort. Neben der genetischen Regulation können die antimikrobiellen Aktivitäten der Peptide auch mittels selektiv induzierter Sekretion aus den produzierenden Zellen, zur Therapie von bakteriellen Infektionen, reguliert werden. In diesem Zusammenhang zeigten bakterielle Infektionen mit *Staphylococcus aureus* die Sekretion des humanen β -Defensin 1 sowie des humanen β -Defensin 3 aus Keratinozyten, wohingegen bakterielle Infektionen, welche auf dem nicht pathogenen Bakterium *Staphylococcus epidermis* beruhten, lediglich die Sekretion des humanen β -Defensin 2 induzierten [78]. Neben den Keratinozyten können antimikrobielle Peptide in ihrer funktionalen Form auch in Granulozyten gespeichert werden, aus welche sie als Folge einer bakteriellen Infektion spezifisch sekretiert werden [79]. Während die Regulation der Expression und die selektive Sekretion eine Limitierung der Peptidmenge durch den produzierenden Organismus darstellen, können antimikrobielle Peptide auch eine Selektivität gegenüber dem Zielorganismus aufweisen. Dementsprechend handelt es sich um einen inhärenten Mechanismus der Peptide, welcher auf der spezifischen Interaktion mit den korrespondierenden Lipiddoppelschichten beruht [80]. Diese Differenzierung findet vorwiegend zwischen Pro- und Eukaryoten statt, wobei die Selektivität in erster Linie durch die Eigenschaften des antimikrobiellen Peptids sowie durch die Komposition der Zellmembranen vermittelt wird. Während die äußere bakterielle Zellmembran in vielen Fällen aus anionischen Lipiden wie Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerol besteht, woraus sich eine negative Nettoladung der Zelloberfläche ergibt [81, 82], besteht die äußere Zellmembran eukaryotischer Zellen hingegen hauptsächlich aus zwitterionischen Lipiden, wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin und Sphingomyeline, was in einer neutralen Nettoladung der Zellen resultiert [80, 83-86]. Basierend auf den elektrostatischen Interaktionen der kationischen antimikrobiellen Peptide mit den anionischen Bestandteilen der Lipidmembranen, wird eine stärkere Akkumulation der Peptide an den bakteriellen Membranen begünstigt, woraus sich eine Präferenz von pro- gegenüber eukaryotischen Zellen ergibt. Überdies ist die bakterielle Membran der Ort der oxidativen Phosphorylierung, weshalb ein nach innen gerichtetes, negatives Membranpotential existiert. Hierdurch werden die elektrostatischen Interaktionen zwischen den Membranen und den antimikrobiellen Peptiden weiter begünstigt. Ferner unterstützt dieses Potential auch die Einlagerung der antimikrobiellen Peptide in die Membran [30, 80]. Da das Membranpotential von Prokaryoten deutlich stärker ausgeprägt ist als bei Eukaryoten unterstützt dies die stärkere Affinität der kationischen antimikrobiellen Peptide gegenüber bakteriellen Membranen. Aufgrund der Tatsache, dass diese Akkumulation notwendig für das Erreichen der Schwellenkonzentration auf der Oberfläche der Membran ist und dies den initialen Schritt des Wirkmechanismus der antimikrobiellen Peptide darstellt, resultieren diese Faktoren in einer generellen Präferenz der bakteriellen gegenüber der eukaryotischen Membran.

Neben der elektrostatischen Selektivität sind weitere Membrankomponenten, wie insbesondere Cholesterin, welches ausschließlich in eukaryotischen Membranen vorkommt, für eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Peptid-vermittelten zytotoxischen Prozessen verantwortlich. Durch die Einlagerung von Cholesterin in die Membran werden ihre mechanischen Eigenschaften verändert, was in

erster Linie zu einer Erhöhung der mechanischen Stabilität führt. Darüber hinaus beeinflusst Cholesterin die amphiphilen Eigenschaften der Lipiddoppelschicht. Dadurch wird die Fähigkeit der antimikrobiellen Peptide sich in die Membran einzulagern und transmembrane Poren zu bilden verringert, woraus eine höhere Widerstandsfähigkeit der eukaryotischen Zellen gegenüber den antimikrobiellen Peptiden hervorgerufen wird [87-89]. Neben der Membranzusammensetzung wird eine Selektivität der antimikrobiellen Peptide auch über die morphologischen Membraneigenschaften vermittelt. In diesem Zusammenhang zeigte sich zum Beispiel eine stärkere Akkumulation des antimikrobiellen Peptids Melittin an Membranregionen welche einen erhöhten Krümmungsgrad aufwiesen [90]. Da pro- und eukaryotische Zellen unterschiedliche morphologische Größenordnungen aufweisen, resultierte diese auf dem Krümmungsgrad beruhende Affinität in einer weiteren selektiven Interaktion mit den stärker gekrümmten bakteriellen Membranen.

2.1.3 Bakterielle Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden

Antimikrobielle Peptide repräsentieren einen inhärenten Mechanismus des angeborenen Immunsystems und sind als Folge dessen permanent an der Prävention und Therapie von bakteriellen Infektionen beteiligt. Einige antimikrobielle Peptide werden konstitutiv exprimiert und auf externen Oberflächen sekretiert, um als präventiver Schutzmechanismus gegenüber bakteriellen Infektionen zu fungieren [74]. Trotz dieser stetigen Exposition der antimikrobiellen Peptide gegenüber Bakterien konnte bisher nur in wenigen Fällen die Ausprägung einer Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden festgestellt werden [5]. Da die Interaktion der Peptide mit den bakteriellen Membranen auf einer Rezeptor-unabhängigen Interaktion [39-41] beruht, welche gegen grundlegende biochemische Strukturen oder Moleküle gerichtet ist, wird davon ausgegangen, dass die Ausprägung von Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Peptiden nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit stattfinden kann [91]. Außerdem ist für die Prävention und Therapie von bakteriellen Infektionen oftmals eine Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden verantwortlich, wodurch die Resistenzbildung gegenüber einzelnen Peptiden unterbunden wird. Trotz der Rezeptor-unabhängigen Interaktion der antimikrobiellen Peptide mit grundlegenden biochemischen bakteriellen Strukturen und der Vielzahl von sekretierten Peptiden und Peptidklassen haben sich jedoch bei einigen Bakterien bereits Resistenzen entwickelt. Diesbezüglich kann grundlegend zwischen den konstitutiven und adaptiven Mechanismen unterschieden werden [92]. Der konstitutiven Resistenz liegen inhärente Eigenschaften des Bakteriums zu Grunde, wie beispielsweise die prinzipielle Zellarchitektur oder Zellzusammensetzung, wohingegen adaptive Resistenzen sich aufgrund der Exposition der Bakterien gegenüber antimikrobiellen Peptiden entwickelt haben. Diese adaptiven Resistenzen reichen von schnell induzierbaren und kurzlebigen Schutzmechanismen bis hin zu andauernden Strategien welche zu einer dauerhaften Veränderung der bakteriellen Lebensbedingungen führen [39, 92]. Oftmals schließen sich diese Mechanismen gegenseitig nicht aus. Außerdem wird davon ausgegangen, dass sich basierend auf der bakteriellen Evolution adaptierte Schutzmechanismen zu konstitutiven Resistenzen entwickelt haben [40, 92].

Einer dieser Resistenzmechanismen besteht in der passiven Abschirmung der antimikrobiellen Peptide von den jeweiligen Zielmolekülen, wie z. B. der bakteriellen Membran oder Metaboliten im Zytosol. Dadurch wird die elektrostatische Interaktion der kationischen Peptide mit den anionischen Bestandteilen der bakteriellen Membran unterbunden und somit eine Anlagerung der Peptide verhindert (Abbildung 2.4). Dies kann durch eine Modifikation der anionischen Membranbestandteile mit kationischen oder neutralen Molekülen hervorgerufen werden. So weisen z. B. einige Stämme von *S. aureus* ein Transportsystem auf, welches die Aminosäure D-Alanin aus dem Zytoplasma zu den Lipoteichonsäuren transportiert. Durch die Veresterung der in den Lipoteichonsäuren enthaltenen Phosphate und der Aminosäure D-Alanin werden die anionischen Eigenschaften der Bakterienmembran reduziert, was in einer geringeren elektrostatischen Interaktion mit den antimikrobiellen Peptiden resultiert [39, 93]. Ferner kann die Nettoladung auch durch den Einbau von kationischem Lysyl-Phosphatidylglycerol verringert werden. Dabei handelt es sich um ein kationisches Derivat des Phosphatidylglycerols, dessen Einbau ebenfalls die Reduktion der Nettoladung der Bakterienmembran zur Folge hat und somit durch die verringerten elektrostatischen Interaktionen die Anlagerung von antimikrobiellen Peptiden minimiert [94, 95]. Analog dazu finden bei gramnegativen Bakterien ebenfalls Modifikationen der Membrankomponenten statt, um die Nettoladung zu reduzieren, wie es beispielsweise bei Lipid A zu beobachten ist, dessen Veresterung mit Aminoarabinose ebenfalls zu einer Reduktion der Nettoladung führt [96].

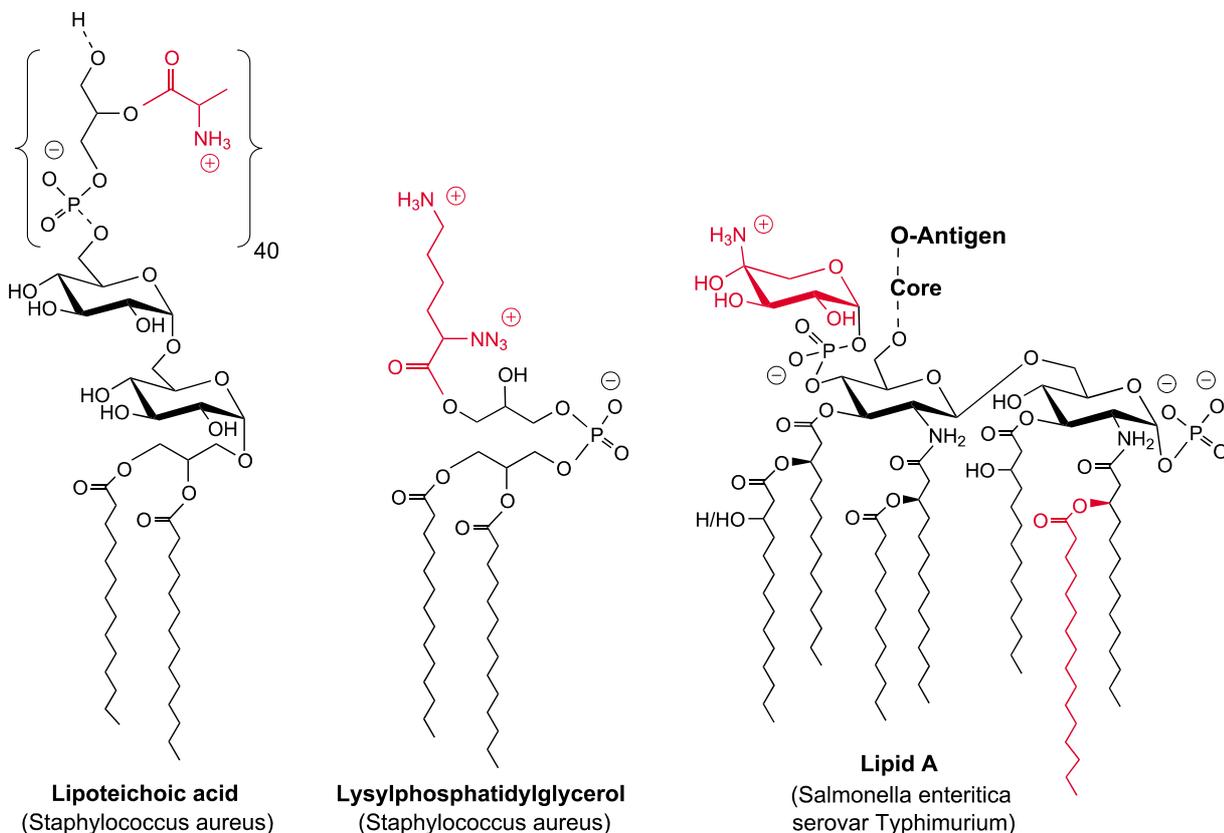


Abbildung 2.4: Modifikation von bakteriellen Membrankomponenten, welche bei der Ausprägung von Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Peptiden beteiligt sind. Dargestellt sind drei, anionische Komponenten von bakteriellen Membranen (schwarz), deren Nettoladung mittels Modifikation mit kationischen Komponenten (rot) reduziert oder aber invertiert wird [97][III]. Durch diese Reduktion der Nettoladung wird die elektrostatische Interaktion der antimikrobiellen Peptide mit der bakteriellen Membran reduziert oder aufgrund von Abstoßung vollständig verhindert.

Neben der Modifikation von Membrankomponenten können jedoch auch Veränderungen im Energiestoffwechsel der Bakterien zu einer Reduktion der Nettoladung auf der Außenseite der Membran führen. Da die oxidative Phosphorylierung und die damit verbundene Generierung des Energieträgers ATP innerhalb der bakteriellen Membran stattfindet, resultiert daraus ein nach innen gerichtetes negatives Membranpotential. Dieses Potential unterstützt zum Einen die Interaktion der antimikrobiellen Peptide mit den bakteriellen Membranen aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen und zum Anderen die Einlagerung der Peptide in die Membran [30, 80]. In diesem Zusammenhang zeigten einige Stämme von *S. aureus* eine Reduktion der Stoffwechselaktivität, was in einer Herabsetzung des Membranpotentials resultierte und somit zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber der elektrostatischen Interaktionen mit antimikrobiellen Peptiden führte [98]. Eine weitere Methode um die Interaktion mit den bakteriellen Membranen zu unterbinden besteht in der Abschirmung der Bakterien gegenüber ihrer Umgebung. Hierfür besitzen einige Bakterien die Fähigkeit eine Kapsel oder Glykokalyx zu bilden, welche zu einem großen Anteil aus Oligosacchariden besteht. Bei gramnegativen Kokken bestehen diese Kapseln hauptsächlich aus Teichon- und Teichuronsäure [92]. Durch diese semipermeable Abgrenzung der Bakterien von der Umgebung findet die Interaktion der antimikrobiellen Peptide, aufgrund von elektrostatischen Interaktionen, vorrangig mit den Bestandteilen der Kapsel statt. Dadurch wird die Konzentration der Peptide an der Bakterienmembran maßgeblich verringert, was zu einer Unterschreitung der charakteristischen Schwellenkonzentration führt. Somit vermittelt dies dem Bakterium einen Schutz gegenüber dem antimikrobiellen Peptid [92]. In Analogie dazu produzieren einige virulente Erreger von *Pseudomonas aeruginosa* das stark anionische Exopolysaccharid Alginsäure, welches die kationischen Peptide bindet und somit ebenfalls die antimikrobielle Wirkung inhibiert [99].

Eine weitere Möglichkeit für die Ausprägung von Resistenzen besteht in der Expression von Endopeptidasen, welche mittels proteolytischer Spaltung die antimikrobiellen Peptide an ihrer Wirkung hindern. Diese Enzyme sind mit der äußeren Bakterienmembran assoziiert, und besitzen je nach Organismus hydrolytische Aktivitäten gegenüber verschiedenen peptidinternen Erkennungsstellen. Deshalb vermitteln relativ spezifisch wirkende Endopeptidasen lediglich die Resistenz gegenüber einer Klasse von antimikrobiellen Peptiden welche entweder hinsichtlich ihrer Primärsequenz oder ihrer Sekundärstruktur Analogien aufweisen. In diesem Zusammenhang wurden Endopeptidasen in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium identifiziert, welche die hydrolytische Spaltung von Peptiden zwischen zwei definierten, kationischen Aminosäuren katalysierten [100]. Es konnte bewiesen werden, dass diese Endopeptidasen ähnliche strukturelle und katalytische Eigenschaften wie die Endopeptidase OmpT aus *E. coli* besitzen [101]. Des Weiteren wurden Endopeptidasen identifiziert welche die hydrolytische Spaltung von α -helikalen, antimikrobiellen Peptiden katalysierten und über keine Abhängigkeit zu der Primärstruktur des Peptids verfügten [102]. Im Detail legten Experimente nahe, dass für die hydrolytische Spaltung durch die Endopeptidase eine amphipathische α -helikale Struktur von mindestens 12 Aminosäuren in dem Peptid vorhanden sein musste. Die Hydrolyse fand dabei an einem spezifischen Lysinrest statt welcher sich an einer exakten Position innerhalb der hydrophilen Helix-Region befinden musste. Neben der enzymatischen Hydrolyse der antimikrobiellen Peptide existieren darüber hinaus weitere Mechanismen, welche an der Entwicklung von Resistenzen beteiligt sind. Hierzu gehört der spezifische,

aktive Transport von antimikrobiellen Peptiden durch membranständige Transportproteine. Diese dienen dazu die Konzentration der Peptide im Inneren des Bakteriums durch gezielte Sekretion der Peptide zu regulieren und somit die Anreicherung der Peptide zu unterbinden, wodurch die antimikrobiellen Eigenschaften reduziert werden. In *Yersinia* existieren beispielsweise Kalium abhängige Antiporter, welche den Transport von kationischen, antimikrobiellen Peptide aus dem Inneren des Bakteriums garantieren. Dieser Transport wird durch die Proteine RosA und RosB realisiert, deren Expression z. B. durch die Exposition des Bakteriums gegenüber Polymyxin B induziert wird [103]. Des Weiteren können antimikrobielle Peptide mittels aktiver Transportsysteme ins Zellinnere aufgenommen werden. Dies reduziert zum Einen die Konzentration der Peptide auf der Oberfläche der Bakterienmembran und sorgt zum Anderen dafür, dass die Peptide im Zellinneren durch proteolytische Abbaumechanismen inaktiviert werden können [104]. Trotz dieser bereits beschriebenen Resistenzmechanismen ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht eindeutig geklärt, welche Faktoren entscheidend für die Ausprägung solcher bakteriellen Resistenzen verantwortlich sind, geschweige denn in welchem Ausmaß die Resistenzen vererbt werden und sich innerhalb einer bakteriellen Population etablieren [40]. Die Tatsache, dass antimikrobielle Peptide heutzutage fortwährend an der Prävention und Therapie von bakteriellen Infektionen in vielen pro- und eukaryotischen Lebewesen beteiligt sind [1-4], belegt jedoch trotz alledem, dass sie sich im Laufe der Evolution zu effizienten antimikrobiellen Wirkstoffen entwickelt haben [92]. Zudem wird davon ausgegangen, dass die bakteriellen Veränderungen, welche für die langanhaltende Ausprägung von Resistenzmechanismen gegenüber antimikrobiellen Peptiden notwendig sind, mit einer grundlegenden Modifikation von biochemischen Strukturen oder Prozessen verbunden wären. Dem zufolge wird eine dauerhafte Resistenzentwicklung als unwahrscheinlich erachtet [5, 16, 91].

2.1.4 Industrielle und therapeutische Anwendung

Der intensive Einsatz von Antibiotika hat in den vergangenen Jahrzehnten zu einer drastischen Entwicklung von einer Vielzahl von antibiotikaresistenten Bakterien geführt, welche unter anderem auch multiresistente Bakterien wie z. B. *S. aureus* und ESBL-exprimierende *Enterobacteriaceae* umfassen. Diese Entwicklung repräsentiert in der heutigen Therapie von bakteriellen Infektionen einen der wichtigsten Aspekte und stellt eine beträchtliche Herausforderung für das humane Gesundheitswesen dar [105]. Aus diesem Grund wurde die Entwicklung von alternativen antimikrobiell wirksamen Substanzen intensiviert [106], wobei jedoch in den vergangenen Jahren nur wenige neue antimikrobiell wirkende Stoffe entwickelt wurden [107]. In diesem Zusammenhang werden antimikrobielle Peptide, aufgrund ihres fundamentalen Wirkmechanismus und ihres breiten Wirkspektrums als vielversprechende Alternativen mit biologisch kompatiblen Eigenschaften diskutiert [107-109]. Ferner zeigt diese Peptidklasse neben ihren antimikrobiellen Eigenschaften auch immunmodulatorische Effekte, welche vorteilhafte Auswirkungen auf die Therapie von Infektionen haben würden [5, 14, 107]. Darüber hinaus konnten bereits auch antifungale [60, 110] sowie antivirale [11, 12] Eigenschaften detektiert werden, was das potentielle Einsatzspektrum beträchtlich erweitert.

Natürlich vorkommende antimikrobielle Peptide finden heutzutage Verwendung in der Lebensmittelindustrie. In diesem Zusammenhang werden sie vorzugsweise als Konservierungsmittel eingesetzt, um das bakterielle Wachstum zu inhibieren, was sich wiederum positiv auf die Haltbarkeit und Lagerungsfähigkeit der Lebensmittel auswirkt. Insbesondere werden daher antimikrobielle Peptide verwendet welche unter natürlichen Bedingungen, vorzugsweise von Milchsäurebakterien, produziert werden. Ein weit verbreitetes Peptide ist Nisin, welches starke antimikrobielle Aktivitäten gegenüber grampositive Bakterien aufweist [61, 111] und in der europäischen Union als Lebensmittelzusatzstoff in Milchprodukten wie z. B. Käse, Joghurt und Pudding unter der Kennzeichnung E234 zugelassen ist [112]. Bei dem antimikrobiellen Peptid Nisin handelt es sich um ein Peptid, welches die nicht proteinogene Aminosäure Lanthionin enthält und somit in die Kategorie der Lanthibiotika eingeordnet wird [113]. Zudem beinhaltet die Peptidsequenz die nicht proteinogenen Aminosäuren Dehydrobutyrin und Dehydroalanin [113, 114]. Diese Veränderungen der ribosomal exprimierten Primärsequenz werden durch posttranslationale Modifikationen eingeführt. Hierbei werden sequenzinterne Serine und Threonine dehydriert, worauf aminosäureinterne Doppelbindungen entstehen, welche im Anschluss daran mit sequenzinternen Cysteinen reagieren und somit in der Ausbildung der nicht proteinogenen Aminosäuren resultieren [115, 116]. Durch diese sequenzinternen zyklischen Modifikationen unterscheidet sich Nisin maßgeblich von den strukturellen Eigenschaften vieler natürlich vorkommender antimikrobieller Peptide, welche vorzugsweise aus proteinogenen Aminosäuren aufgebaut sind und nur selten über stabilisierende peptidinterne Verknüpfungen verfügen.

Insbesondere zeichnen sich antimikrobielle Peptide durch die mögliche Verwendung gegenüber klinisch relevanten Bakterien aus, welche bereits über eine Vielzahl von Antibiotikaresistenzen verfügen. Diesbezüglich konnte bereits *in vivo* demonstriert werden, dass die Applikation von antimikrobiellen Peptiden eine signifikante Reduktion der Gesamtkeimzahl von *P. aeruginosa* im Lungengewebe von Ratten zur Folge hatte [117]. Zugleich konnten auch antimikrobielle Eigenschaften gegen eine Vielzahl antibiotikaresistenter Bakterien *in vitro* nachgewiesen werden [117]. Basierend auf diesen Eigenschaften werden antimikrobielle Peptide aktuell hinsichtlich ihres Potentials als therapeutisch wirksame Substanzen zur Behandlung von bakteriellen Infektionen entwickelt und in klinischen Studien Ihre Anwendbarkeit verifiziert. Ein Beispiel hierfür ist Pexiganan, ein 22 Aminosäuren langes Analogon des antimikrobiellen Peptids Magainin, welches ursprünglich von der Haut des afrikanischen Krallenfrosches isoliert wurde [118]. Dieses Peptid besaß *in vitro* antimikrobielle Eigenschaften gegenüber einer Vielzahl klinischer Isolate von grampositiven und gramnegativen Bakterien, unter welchen sich auch antibiotikaresistente Stämme befanden. Zusätzlich konnte während einer sukzessiven Exposition des Peptids in unwirksamen Konzentrationen keine Induktion von bakteriellen Resistenzen festgestellt werden [119]. Als Folge dessen wurde das Peptid bereits in klinischen Studien hinsichtlich seines Potentials als therapeutisch wirksames Agens untersucht und seine Wirkung in einer klinischen Phase-III-Studie für die Behandlung von infizierten Ulzerationen, welche in Verbindung mit dem diabetischen Fußsyndrom stehen, erfolgreich getestet [120]. Ein weiteres antimikrobielles Peptid welches sich zurzeit in einer klinischen Phase-III-Studie befindet ist Omiganan [73, 109]. Hierbei handelt es sich um ein synthetisches Analogon von Indolicidin, welches bei *in vitro* Experimenten ein breites antimikrobielles sowie antifungales Wirkspektrum erkennen ließ [121].

Basierend auf seinen Eigenschaften das Wachstum von Vancomycin resistenten *S. aureus* [122], sowie pathogenen Bakterien [123] und Pilzen [123], welche bei Katheter-assoziierten Infektionen eine besondere Bedeutung besitzen, zu inhibieren, wurde es bereits hinsichtlich seines therapeutischen Potentials in klinischen Studien getestet [73]. Diesbezüglich konnten prinzipielle Reduktionen der bakteriellen Keimbelastung der Katheteroberfläche, sowie eine Reduktion der lokalen Wundinfektion detektiert werden. Jedoch war eine statistisch signifikante Auswertung der Katheter-induzierten Infektionen des Blutkreislaufes nicht möglich [124].

Prinzipiell müssen bei der Verwendung von antimikrobiellen Peptiden im medizinischen Umfeld oder als Therapeutikum neben den antimikrobiellen Eigenschaften weitere wichtige Faktoren berücksichtigt werden. Ein prinzipielles Ausschlusskriterium stellt dabei die Biokompatibilität der Peptide gegenüber dem Organismus dar. Deswegen sind in erster Linie mögliche zytotoxische Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide von zentraler Bedeutung, da diese eine Limitierung, insbesondere für biologische Applikationen, darstellen. Aus diesem Grund wurden in Studien bereits Peptidderivate auf Basis natürlich vorkommender antimikrobieller Peptide mittels Aminosäuresubstitution oder nicht natürlich vorkommenden Modifikationen generiert, um die zytotoxischen Eigenschaften zu verringern und gleichzeitig die antimikrobiellen Eigenschaften zu erhalten. Ein Beispiel hierfür ist das Peptid BMAP-27, welches neben starken antimikrobiellen, auch über ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften verfügt. Durch eine Substitution von Phenylalanin oder Leucin mit Alanin, innerhalb einer für das Peptid charakteristischen bZIP-Domäne, konnten die zytotoxischen Eigenschaften drastisch reduziert werden. Gleichzeitig resultierten die Modifikationen in keiner Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften, wodurch sein therapeutisches Potential erheblich erhöht werden konnte [71]. Auch die kovalente Modifikation des N-Terminus mittels Polyethylenglycol konnte dazu verwendet werden, um die biokompatiblen Eigenschaften eines zelltoxischen LL-37 Fragments zu steigern. Bezüglich dessen zeigten diese Peptidderivate biokompatible Eigenschaften gegenüber den Epithelzellen von primärem Lungengewebe, sowie gegenüber einem *ex vivo* Lungenmodell [125]. Da in antimikrobiellen Peptiden sowohl die hydrophoben als auch die kationischen Charakteristiken von entscheidender Bedeutung sind, stellen diese aussichtsreiche Modifikationsstellen dar, um die Eigenschaften des Peptids zu beeinflussen und für die entsprechende Applikation anzupassen. Untersuchungen bezüglich der Zusammensetzung von Tryptophan- und Arginin-reichen Peptidderivaten des humanen β -Defensin 28 demonstrierten, dass mittels entsprechender Aminosäuresubstitution die Aktivität kurzer Peptide modifiziert und optimiert werden konnte [126].

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Verwendung von antimikrobiellen Peptiden in systemischen Applikationen ist deren biologische Halbwertszeit. Aufgrund des Aufbaus aus proteinogenen Aminosäuren unterliegen antimikrobielle Peptide der systemischen Degeneration durch konstitutiv exprimierte, körpereigene Proteasen, wodurch ihre biologische Halbwertszeit und somit ihre potentielle Verwendung als Therapeutikum eingeschränkt ist. Durch die Verwendung nicht natürlich vorkommender Modifikationen innerhalb der Peptidsequenz kann eine proteolytische Degeneration verringert werden. Zu diesem Zweck wurde bereits eine Vielzahl verschiedener nicht natürlicher Komponenten verwendet. Diese Modifikationen können unter Anderem durch die Amidierung oder Acetylierung des C-Terminus [127],

die Synthese von D-Enantiomeren [128] oder aber Diastereomeren [129, 130], den Einbau von nicht natürlich vorkommenden Carbamatverbindungen in die Primärsequenz des Peptids [131] oder aber die Substitution von Aminosäuren mit Analoga [132] gewährleistet werden.

Die grundsätzliche Limitierung bei der Applikation von antimikrobiellen Peptiden für die Therapie von bakteriellen Infektionen, ist eine mögliche, langfristige Etablierung von Resistenzmechanismen. Basierend auf ihrem charakteristischen Wirkmechanismus wird jedoch aktuell davon ausgegangen, dass eine Ausprägung von Resistenzen durch therapeutische Applikationen wenig wahrscheinlich ist [5, 16, 91]. Dies ist dadurch begründet, dass die Inhibierung ihres charakteristischen Rezeptor-unabhängigen Wirkmechanismus mit einer fundamentalen Veränderung von bakteriellen Strukturen und biochemischen Mechanismen einhergehen müsste. Dies würde jedoch die bakterielle Lebensfähigkeit unter natürlichen Bedingungen im Vergleich zu nicht resistenten Mutanten reduzieren, weshalb eine langfristige Resistenzetablierung ausgeschlossen wird [108]. Zudem sind im Laufe der Evolution keine signifikanten Resistenzen gegenüber humanen antimikrobiellen Peptiden, obwohl diese fortwährend an der Prävention und Therapie von Infektionen beteiligt sind, aufgetreten [5]. Aufgrund der Tatsache, dass antimikrobielle Peptide im Vergleich zu traditionellen Antibiotika sowohl über einen anderen Wirkmechanismus als auch eine andere Art der möglichen Resistenzausprägung bei den klinisch relevanten Bakterien verfügen, bietet sich ihre Verwendung insbesondere in Kombination mit konventionellen antimikrobiellen Wirkstoffen an [133], wodurch die Synergie beider Wirkstoffklassen für die Therapie von klinisch relevanten, bereits antibiotikaresistenten Bakterien genutzt werden kann [134, 135].

Neben dem Einsatz als antimikrobielle Substanzen werden diese Peptide auch in aktuellen Forschungsprojekten aufgrund ihres charakteristischen, Rezeptor-unabhängigen Wirkmechanismus gegenüber Bakterien verwendet. Ein Verwendungsbeispiel stellt die Konstruktion von Fusionspeptiden dar, um die Eigenschaften beider Fusionspartner zu kombinieren [136, 137]. In diesem Zusammenhang wurden antimikrobielle Peptide dazu verwendet, um zellfremde Moleküle wie z. B. DNA, fluoreszierende Reporter-moleküle, antimikrobielle Wirkstoffe oder aber Epitope durch die Bakterienmembran zu transportieren. So konnte bereits festgestellt werden, dass eine von antimikrobiellen Peptiden abgeleitete Sequenz dazu verwendet werden konnte, um eine antisense PNA (Peptid-Nukleinsäure), in Form eines Fusionskonstrukts, in die bakterielle Zelle zu transportieren [138]. Die so transferierte antisense PNA ließ die Inhibierung der Expression des Sigma-Faktor σ^{70} erkennen, welcher essenziell für die Aktivität der bakteriellen RNA Polymerase ist. Somit führte die transferierte antisense PNA letztendlich zur Inhibierung des bakteriellen Stoffwechsels, was in ausgeprägten bakteriostatischen Eigenschaften resultierte. Insbesondere konnte in diesem Zusammenhang verdeutlicht werden, dass das verwendete Peptid nicht für die antimikrobiellen Eigenschaften verantwortlich war und sich obendrein auch keine bakteriellen Resistenzen gegenüber dem Fusionsprodukt entwickelten. In Analogie dazu wurden bereits auch Peptid-PNA Konstrukte dazu verwendet um die mRNA Bindungsstelle innerhalb der 16s RNA zu blockieren und somit die ribosomale Translation zu inhibieren [139].

Des Weiteren werden die Rezeptor-unabhängigen Interaktionen zwischen antimikrobiellen Peptiden und bakteriellen Membranen bei der Entwicklung von Biosensoren und Detektionsverfahren genutzt. Ein einfaches Funktionsprinzip stellt ein modifiziertes ELISA Verfahren dar, bei welchem die Detektion der

immobilisierten Bakterien durch die Interaktion mit einem fluoreszenzmarkierten antimikrobiellen Peptid gewährleistet wurde [140]. Dadurch konnte das in vielen ELISA Verfahren verwendete Prinzip eines zweistufigen Antiköpersystems in Kombination mit einem Reportermolekül umgangen werden und zusätzlich um die selektiven Eigenschaften des Peptids gegenüber der bakteriellen Membran erweitert werden. Des Weiteren können antimikrobielle Peptide auch für die Immobilisierung von Bakterien an festen Oberflächen verwendet werden [141]. So konnte belegt werden, dass die Interaktion zwischen dem immobilisierten antimikrobiellen Peptid Cecropin P1 und dem Bakterium *E. coli* K12, sowie *E. coli* O157:H7 zu einer Immobilisierung der Bakterien in Mikrotiterplatten führte. Obendrein wurde der Stamm O157:H7 mit einer höheren Präferenz im Vergleich zu dem Stamm K12 durch das immobilisierte Peptid gebunden.

Basierend auf dem selektiven Bindungsverhalten antimikrobieller Peptide wurden bereits Biosensoren für die Detektion von pathogenen Bakterien entwickelt. In diesem Zusammenhang wurde das Bindungsverhalten mehrerer immobilisierter antimikrobieller Peptide gegenüber den pathogenen Bakterien *Salmonella typhimurium* und *E. coli* O157:H7 untersucht [142]. Diesbezüglich konnte die Peptid-abhängige Differenzierung beider Organismen bewiesen werden. Außerdem war es möglich anhand von Fluoreszenzsignalen eine grobe Quantifizierung der Bakterienmenge vorzunehmen.

Ein weiteres Beispiel stellt die Verwendung des antimikrobiellen Peptids Magainin I dar, welches auf einer Goldelektrode immobilisiert wurde, um eine elektrochemische Detektion von pathogenen Bakterien zu ermöglichen [143]. Hierbei konnte demonstriert werden, dass ein Nachweis von geringen Bakterienkonzentrationen in einer definierten Analytlösung auf diese Weise möglich war. Ferner belegten die Untersuchungen eine Selektivität bezüglich der Grameigenschaften, sowie des verwendeten Bakterienstamms.

2.2 Artificielle Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften

Natürlich vorkommende antimikrobielle Peptide repräsentieren eine große heterogene Klasse von Biomolekülen, welche Teil des angeborenen Immunsystems bei vielen pro- und eukaryotischen Organismen sind [1-4]. Heutzutage sind mehr als 1000 natürlich vorkommende antimikrobielle Peptide bekannt welche in nahezu sämtlichen Domänen des Lebens identifiziert wurden [25]. Diese Peptide lassen sich in erster Linie anhand ihrer Aminosäuresequenz differenzieren, wobei sich in Abhängigkeit der produzierenden Spezies direkte evolutionäre Zusammenhänge ableiten lassen [17, 18]. Im Laufe der Evolution haben sich die Aminosäuresequenzen der antimikrobiellen Peptide stark verändert. Untersuchungen haben gezeigt dass die für die antimikrobiellen Peptide kodierenden Gene einer positiven Selektion unterliegen. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass antimikrobielle Peptide zu einer der sich am schnellsten entwickelnden eukaryotischen Proteinklassen gehören [144, 145]. In Abhängigkeit der evolutionären Selektion haben sich speziesspezifische Aminosäuresequenzen etabliert, welche durch die äußeren Umweltfaktoren geprägt wurden und deren Funktionen den spezifischen Anforderungen entsprechen. Somit sind die antimikrobiellen Eigenschaften natürlich vorkommender Peptide an die

Lebensumstände des produzierenden Organismus angepasst. Hierdurch haben sich Peptide entwickelt deren antimikrobielle Eigenschaften bei heutigen *in vitro* Experimenten stark variieren und in einigen Fällen lediglich Aktivitäten gegenüber einem eingeschränkten Spektrum von Bakterien besitzen. Basierend auf der Idee dieser evolutionären Entwicklung beschäftigen sich heutige Forschungsprojekte mit der Identifizierung von artifizialen antimikrobiellen Peptiden, welche für individuelle Applikationen optimiert sind [146, 147]. In diesem Zusammenhang werden solche Peptide unter anderem für therapeutische Applikationen in der pharmazeutischen Industrie optimiert. Entsprechend werden Peptide angestrebt welche über ein möglichst breites antibakterielles Wirkspektrum gegenüber therapeutisch relevanten Mikroorganismen, in Kombination mit biologisch kompatiblen Eigenschaften, verfügen [107, 148]. Zu diesem Zweck werden zahlreiche Peptide in *in vitro* Experimenten getestet und in Abhängigkeit ihrer antimikrobiellen Eigenschaften und hinsichtlich ihres Verwendungszwecks selektiert und weiter optimiert. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Verwendung von antimikrobiellen Peptiden in klinischen oder therapeutischen Applikationen sind ihre Produktionskosten. Aus diesem Grund ist es erstrebenswert die Länge der Peptidsequenzen zu minimieren, um somit die Produktionskosten positiv zu beeinflussen. Dementsprechend wurden natürliche antimikrobielle Peptide analysiert und mittels überlappender und verkürzter Peptidbibliotheken minimale Sequenzen identifiziert, welche jedoch das komplette Aktivitätsspektrum des Ausgangspeptids umfassten [149-152]. Darüber hinaus ist die Sequenzoptimierung solcher Peptide erstrebenswert, da natürliche Peptide oftmals über schlechte pharmakokinetische Eigenschaften verfügen und somit Ihre Anwendung limitiert ist [147, 153, 154]. Neben den antimikrobiellen Eigenschaften der Peptide sind auch die Stabilitäten von entscheidender Bedeutung. So zeigt sich, dass natürlich vorkommende antimikrobielle Peptide aufgrund proteolytischer Spaltung inaktiviert werden können und somit auf ihnen beruhende therapeutische Applikationen maßgeblich in Ihrer Effizienz verringert sind. Deshalb ist es ebenfalls vorteilhaft diese Peptidstabilitäten zu erhöhen, damit die antimikrobiellen Peptide je nach Anwendung eine ausreichende Halbwertszeit aufweisen. In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung von artifizialen Peptiden eine aussichtsreiche Herangehensweise, da mittels nicht natürlich vorkommender Modifikationen diese Stabilitäten beeinflusst werden können, ohne die antimikrobiellen Eigenschaften oder das Wirkspektrum zu reduzieren [155-157].

Obwohl davon ausgegangen wird, dass eine Ausbildung von bakteriellen Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Peptiden durch therapeutische Anwendungen wenig wahrscheinlich ist [5, 16, 91], steht die Entwicklung von artifizialen Peptiden, deren Sequenzen keine Analogien mit natürlich vorkommenden Peptide besitzen, im Vordergrund [129, 157]. Dies ist dadurch begründet, dass im Fall einer eventuellen Adaption der pathogenen Bakterien an die therapeutisch eingesetzten Peptide, gegebenenfalls analoge Peptidsequenzen des angeborenen Immunsystems ebenfalls betroffen wären und somit indirekt die natürliche Immunantwort negativ beeinträchtigt wäre [158].

2.2.1 Peptidbibliotheken

Die Entwicklung von artifizialen antimikrobiellen Peptiden ist ein wichtiger Faktor bei der Generierung von neuen therapeutisch wirksamen und einsetzbaren Alternativen zu traditionellen Antibiotika. Aufgrund der Tatsache, dass der vollständige Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide, und die damit verbundenen Sequenzanforderungen, zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig identifiziert sind, werden heutige Entwicklungs- und Optimierungsprozesse mittels kombinatorischer Methoden durchgeführt. In diesem Zusammenhang hat sich die Verwendung von Peptidbibliotheken zu einer unverzichtbaren Methode entwickelt. Peptidbibliotheken sind leistungsstarke, molekularbiologische Werkzeuge, welche dazu verwendet werden können eine große Anzahl von Sequenzen hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Eigenschaften zu charakterisieren. Insbesondere gilt dies, wenn sie mit gerichteten evolutionsähnlichen Prozessen kombiniert werden [159]. Zu diesem Zweck existieren vielfältige Möglichkeiten mittels biologischer Techniken Peptidbibliotheken zu erzeugen. Hierzu gehören unter anderem Phagen-Display [160], Bakterien-Display [161] oder Ribosom-Display [162]. Hieraus ergibt sich der Vorteil, dass die entsprechenden Peptide mittels natürlicher, biologischer Prozesse generiert werden und somit die Fabrikationskosten relativ gering ausfallen [163]. Des Weiteren kann die Verwendung von solchen iterativen Prozessen die Selektion von Peptiden mit starken antimikrobiellen Eigenschaften signifikant erhöhen [164, 165]. Andererseits ist die Verwendung von biologisch generierten Peptidbibliotheken zeitaufwendig und wird durch die biochemischen Prozesse limitiert, wodurch z. B. lediglich proteinogene Aminosäuren verwendet werden können [157, 166]. Aus diesem Grund wird die kombinatorische Peptidchemie, welche auf der klassischen Festphasensynthese beruht, zunehmend als alternative und vielseitig einsetzbare Methode bei der Identifikation von artifizialen antimikrobiellen Peptiden verwendet. In diesem Zusammenhang ist es möglich mit relativ geringem Aufwand große synthetische Peptidbibliotheken zu generieren [167], welche einen Umfang von mehr als 10^5 Komponenten enthalten können [168, 169]. Im Allgemeinen werden diesbezüglich sechs verschiedenen Prinzipien verwendet um kombinatorische Bibliotheken zu generieren (Abbildung 2.5).

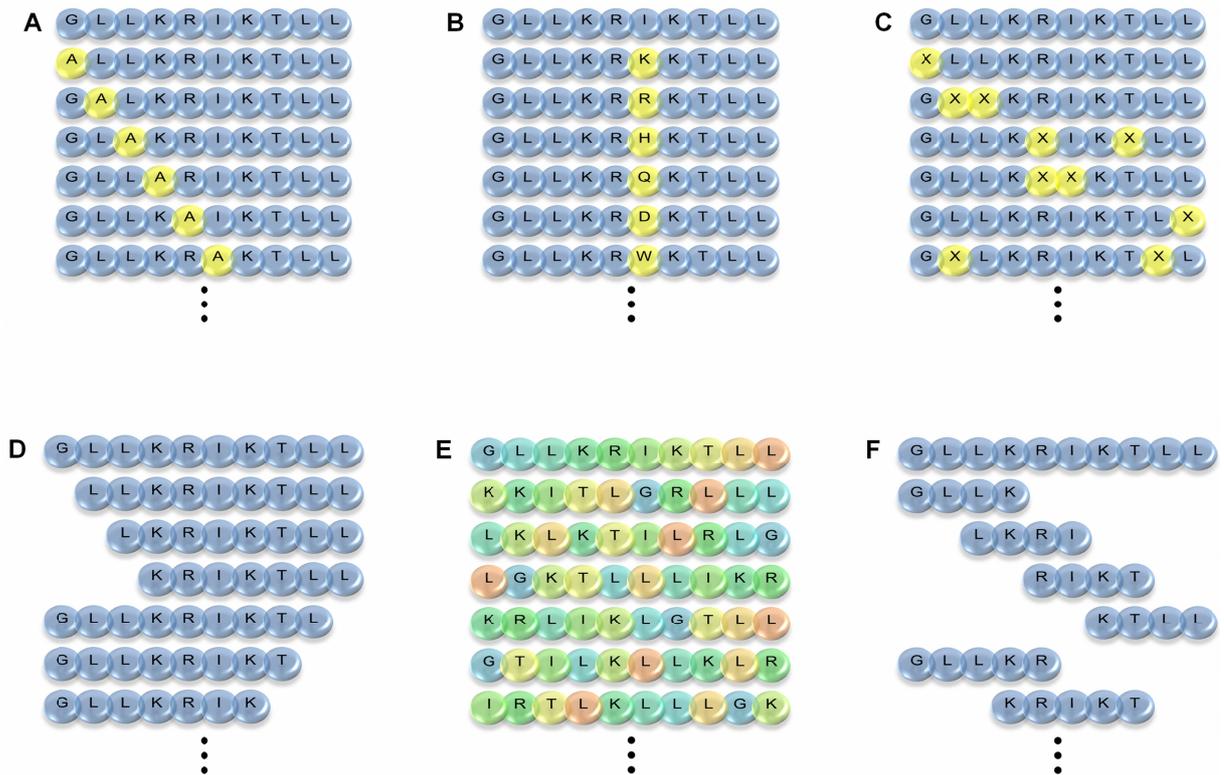


Abbildung 2.5: Exemplarische Darstellung von kombinatorischen Peptidbibliotheken. Dargestellt sind hypothetische Peptidbibliotheken, welche das antimikrobielle Peptid Anoplin [170] als Vorlage verwenden. **(A)** Alanin-Scanning-Bibliothek. Hierbei werden einzelne Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht, wobei jede Position separat untersucht wird. **(B)** Positional-Scanning-Bibliothek. Die Aminosäuren werden an einer definierten Position durch jede andere proteinogene Aminosäure ersetzt. **(C)** Randomisierte-Bibliothek. Ein Austausch von einer oder mehreren Aminosäuren erfolgt an beliebigen Positionen durch eine andere proteinogene Aminosäure. **(D)** Truncation-Bibliothek. Die Aminosäuresequenz wird vom C- oder N-Terminus aus sukzessiv verkürzt, wodurch Peptide mit reduzierten Sequenzmotiven entstehen. **(E)** Durchmischungs-Bibliothek. Die Aminosäurekomposition und somit die biophysikalischen Eigenschaften, wie z. B. Hydrophobizität, Nettoladung oder Sequenzlänge bleiben erhalten, die Peptide weisen jedoch verschiedene Primärstrukturen auf. **(F)** Überlappende-Bibliothek. Kleine Fragmente der Ausgangssequenz werden generiert, wobei überlappende Bereiche definiert werden, deren jeweilige Sequenzlängen identisch sind.

Prinzipiell sind in vielen Fällen die biologischen Methoden zur Evaluierung der antimikrobiellen Eigenschaften der limitierende Faktor bei der Entwicklung von potentiell wirksamen Substanzen. Aus diesen Gründen haben sich bei der Konzeption von kombinatorischen Peptidbibliotheken Methoden etabliert, bei welchen die Sequenzen nicht vollständig randomisiert werden, sondern vielmehr kategorisch aufgebaut sind. Diesbezüglich können entweder Einschränkungen in den verwendeten Aminosäuren oder aber bei deren Positionierung innerhalb der Peptidsequenz vorgenommen werden. Außerdem besteht die Möglichkeit die kombinatorische Bibliothek dahingehend zu limitieren, dass lediglich spezifische Positionen innerhalb der Sequenzen verändert werden [171].

Neben der Variation der Sequenzen innerhalb einer Bibliothek sind die verwendeten Sequenzvorlagen, auf welchen die Bibliotheken beruhen, von entscheidender Bedeutung. Diese Sequenzvorlagen können nach unterschiedlichen Kriterien ausgewählt werden. Oftmals werden natürlich vorkommende antimikrobielle Peptide, welche bereits über ein breites antimikrobielles Wirkspektrum verfügen, als Vorlage für kombinatorische Peptidbibliotheken verwendet. Dadurch wird versucht neue Peptide zu identifizieren, welche im Vergleich zum Ausgangspeptid über verbesserte Eigenschaften verfügen, wie z. B. erhöhte antimikrobielle Aktivität, veränderte Selektivität, geringere Zytotoxizität oder erhöhte Stabilität gegenüber proteolytischer Spaltung [155]. In diesem Zusammenhang wurden bereits artificielle Peptide von dem

antimikrobiellen Peptid Bactenecin mittels einer kombinatorischen Substitutionsbibliothek abgeleitet, bei welchen eine signifikante Steigerung der antimikrobiellen Aktivitäten zu verzeichnen war [167]. Gleichfalls wurden Bibliotheken von dem antimikrobiellen Peptid Magainin 2 erstellt, bei deren Charakterisierung das Peptid Pexiganan identifiziert wurde [172, 173]. Aufgrund seiner gesteigerten antimikrobiellen Eigenschaften und reduzierten Zytotoxizität wurde dieses Peptid in einer klinischen Phase-III-Studie für die Behandlung von infizierten Ulzerationen eingesetzt, welche in Verbindung mit dem diabetischen Fußsyndrom stehen [120]. Neben Substitutionsbibliotheken, können auch andere Prinzipien verwendet werden, wie z. B. überlappende Peptidbibliotheken. Hierdurch konnten Sequenzfragmente eines β -Defensins identifiziert werden, welche maßgeblich für die antimikrobiellen Eigenschaften des Gesamtpeptids verantwortlich waren, wohingegen andere Regionen keine Aktivität zeigten [174].

Zusätzlich zu bereits bekannten antimikrobiellen Peptiden können auch peptidübergreifende, konservierte Sequenzmotive als Vorlage für einen Variations- und Optimierungsprozess mittels kombinatorischer Peptidbibliotheken verwendet werden [175, 176]. Hierfür werden zunächst Homologien innerhalb einer Teilmenge von antimikrobiellen Peptiden identifiziert. Diese können unter anderem auf deren evolutionärer Zugehörigkeit, antimikrobiellem Wirkspektrum, Peptidlänge oder physikalischen Eigenschaften beruhen. Die so mittels Sequenzanalyse abgeleitete Konsensussequenz wird im Anschluss daran unter Verwendung kombinatorischer Peptidbibliotheken variiert und charakterisiert. Ein Beispiel hierfür ist die Sequenzanalyse der N-terminalen Region von über 80 natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptiden, bei welcher eine artificielle Konsensussequenz mit antimikrobiellen Eigenschaften im mikromolaren Bereich identifiziert wurde [177]. Darüber hinaus wurden auch Sequenzhomologien innerhalb der Klasse der β -Defensine identifiziert, welche im Anschluss daran mittels kombinatorischer Peptidbibliotheken charakterisiert wurden, um somit den Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Funktion der β -Defensine zu ermitteln [178].

Alternativ dazu können Sequenzvorlagen für die kombinatorische Generierung von künstlichen Peptidbibliotheken von höhermolekularen Proteinen abgeleitet werden. Demzufolge werden Proteine verwendet, welche nachweislich über antimikrobielle Eigenschaften oder immunmodulatorische Aktivitäten verfügen oder aber im Zusammenhang mit verschiedenen Immunantworten auftreten. Mittels enzymatischer oder physikalischer Spaltung werde diese in kleinere Peptidfragmente zerlegt und anschließend hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Eigenschaften charakterisiert. In diesem Zusammenhang wurden bereits antimikrobiell wirksame Peptide aus Sequenzfragmenten von Myoglobin sowie aus einem Protein der Ziegenmilch identifiziert [179-181]. Des Weiteren wurden antimikrobielle Peptide aus Wachstumsfaktoren, wie z. B. dem Heparin-binding EGF-like growth factor, Amphiregulin oder dem Platelet-Derived Growth Factor A und B, extrahiert und hinsichtlich ihres antimikrobiellen Potentials untersucht [59]. Dabei wurden potentielle Peptidsequenzen anhand ihrer exponierten Lage im Protein oder anhand des überproportionalen Auftretens von kationischen Aminosäuren identifiziert.

2.2.2 Sekundärstrukturmotive von antimikrobiellen Peptiden

Eine Alternative zu der Verwendung von kombinatorischen Peptidbibliotheken ist die *in silico* Modellierung von antimikrobiellen Peptiden. Hierbei wird der charakteristische Wirkmechanismus von natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptiden durch die gezielte Anordnung von Aminosäuren innerhalb einer artifiziellen Sequenz imitiert. Die Grundlagen des Wirkmechanismus sind in diesem Kontext zum Einen die Rezeptor-unabhängige Interaktion mit der bakteriellen Zellmembran, was in einer unspezifischen Wechselwirkung resultiert [39-41], und zum Anderen die Eigenschaft innerhalb der amphiphilen Umgebung der Bakterienmembran charakteristische Sekundärstrukturen auszubilden [45-47]. Basierend auf diesen Gegebenheiten werden vorzugsweise Peptide generiert, die über ausgeprägte und optimierte Sekundärstrukturmotive verfügen. Die α -Helix stellt dementsprechend das am besten charakterisierte und am weitesten verbreitete Sekundärstrukturmotiv innerhalb der natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptide dar [45, 50, 182, 183]. Prinzipiell können artifizielle α -helikale Peptide auf drei verschiedene Arten generiert werden. Am häufigsten findet die spezifische Variation der Aminosäuresequenz eines natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptides, dessen Struktur bereits als α -helikal identifiziert wurde, Anwendung. Hierbei werden insbesondere gezielte Substitutionen einzelner Aminosäuren oder aber gezielte, terminale Verkürzungen bzw. Deletionen vorgenommen [184, 185]. Hierdurch können Aminosäuren oder Sequenzbereiche identifiziert werden, welche maßgeblich für die antimikrobiellen Eigenschaften verantwortlich sind, und basierend auf diesen Erkenntnissen Optimierungsprozesse durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang wurden bereits etliche Peptid-Analoga von Margainin und Cecropin entwickelt, welche im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangspeptiden über ein gesteigertes antimikrobielles Potential verfügten [186, 187]. Eine weitere Methode für die Generierung α -helikaler Peptide besteht darin die amphipathischen Eigenschaften des Peptids zu maximieren. Solche Peptide besitzen relativ einfache Sequenzen, welche in vielen Fällen lediglich aus hydrophoben und kationischen Aminosäuren bestehen. Aufgrund der Tatsache, dass die Aminosäuren Leucin und Lysin ein starkes Potential besitzen Helices zu bilden und in vielen natürlich vorkommenden Proteinen an der Ausprägung und Stabilisierung von α -helikalen Strukturen beteiligt sind [188], werden diese vorrangig zur Generierung von artifiziellen α -helikalen antimikrobiellen Peptiden eingesetzt [46, 47, 189]. Durch die entsprechende Anordnung beider Aminosäuren innerhalb der Sequenz können somit Peptide erzeugt werden, bei welchen die hydrophoben und kationischen Aminosäuren auf jeweils unterschiedlichen Seiten der Helixoberfläche lokalisiert sind (Abbildung 2.6). Dadurch werden starke amphipathische Eigenschaften erreicht, welche mathematisch durch das Hydrophobizitätsmoment (μ) beschrieben werden [190, 191].

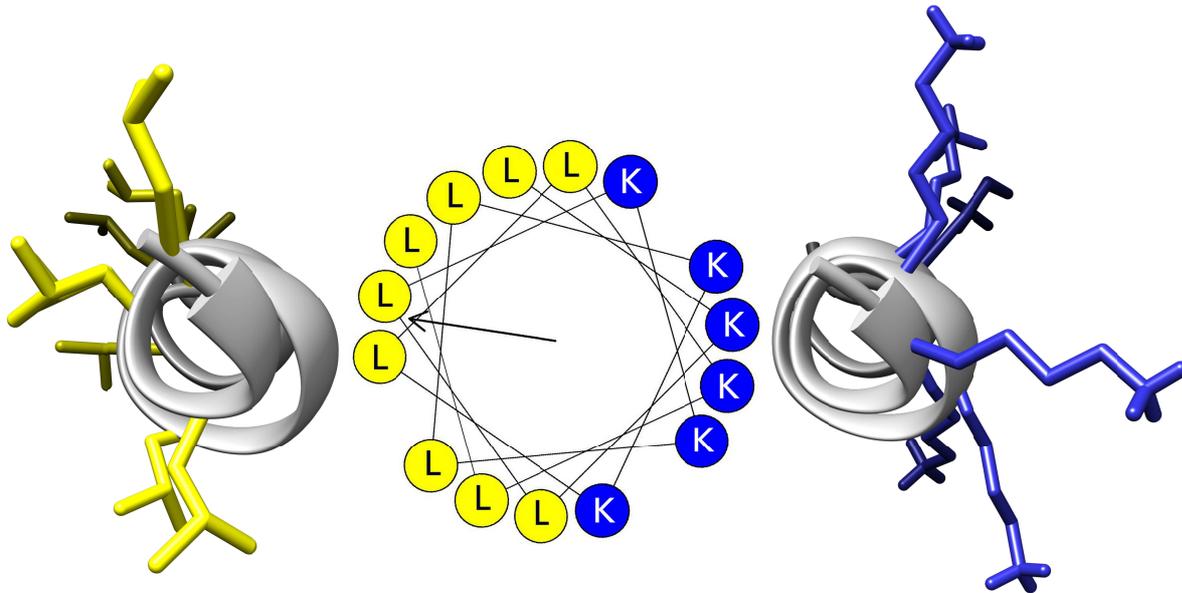


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung eines amphipathischen, α -helikalen Peptids. Dargestellt ist ein exemplarisches antimikrobielles Peptid, welches lediglich aus Lysinen und Leucinen besteht. Das Peptid ist als Helixrad-Projektion dargestellt, wobei die hydrophoben Leucine gelb und die kationischen Lysine blau markiert sind. Die linke und rechte Darstellung zeigen darüber hinaus die 3D Struktur des Peptids, bei welcher das Peptidgerüst als Bändermodell dargestellt ist und grau hervorgehoben ist. Die N-terminale Region liegt in der vorderen Bildebene, wohingegen der C-terminale Bereich sich in der hinteren Bildebene befindet. Aufgrund der Anordnung der Aminosäuren innerhalb der Primärstruktur ordnen sich die hydrophoben und kationischen Seitenketten bei der Ausbildung einer α -Helix auf verschiedenen Seiten der Helixoberfläche an. Dadurch erhält das Peptid amphipathische Eigenschaften, welche durch das Hydrophobizitätsmoment (μ) mathematisch beschrieben werden [190, 191] und dessen Intensität und Orientierung durch den Vektor in der mittleren Abbildung repräsentiert wird.

Untersuchungen haben verdeutlicht, dass die antimikrobiellen Eigenschaften von helikalen Peptiden in einem engen Zusammenhang mit den amphipathischen Eigenschaften stehen. Insbesondere wurde dargelegt, dass mittels Variation einzelner biophysikalischer Parameter von amphipathischen α -helikalen Peptiden sowohl deren antimikrobielle als auch zytotoxische Eigenschaften modifiziert werden können. So wurde festgestellt, dass die Nettoladung, die Gesamthydrophobizität (H), das Hydrophobizitätsmoment (μ) und der Winkel, welcher der kationischen Helixoberfläche gegenüber liegt (Φ) von maßgeblicher Bedeutung sind [192]. Neben den biophysikalischen Eigenschaften wurden auch Untersuchungen durchgeführt um den Einfluss des Übergangs zwischen der hydrophilen und hydrophoben Helixoberfläche genauer zu analysieren [47]. Die dritte Möglichkeit künstliche α -helikale Peptide zu generieren besteht darin, kombinatorische Peptidbibliotheken zu verwenden. Dabei werden die Positionen innerhalb einer Peptidsequenz im Vorfeld als hydrophob oder hydrophil definiert und basierend darauf lediglich Aminosäuren verwendet, welche diesen Vorgaben entsprechen [171].

Ähnlich wie bei vielen antimikrobiellen Peptiden sind bei α -helikalen Peptiden vor allem deren Nettoladung und Hydrophobizität von entscheidender Bedeutung. Während die kationischen Aminosäuren den initialen Anlagerungsschritt der Peptide an die anionische Bakterienmembran begünstigen, sind die hydrophoben Seitenketten für die Einlagerung der Peptide in die amphiphile Umgebung der Bakterienmembran verantwortlich. In vielen Fällen konnte herausgefunden werden, dass durch die Interaktion mit der Bakterienmembran eine Strukturanpassung der Peptide stattfindet, was in der Ausprägung der charakteristischen amphipathischen α -helikale Strukturen resultierte [45-47]. Nach einer parallelen Anordnung der Peptide auf der Außenseite der Bakterienmembran folgt eine Einlagerung

der hydrophoben Region in die Bakterienmembran, bei welcher die hydrophobe Helixoberfläche vorrangig mit den hydrophoben Bereichen der Bakterienmembran interagiert, wohingegen die hydrophile Helixoberfläche sich entgegengesetzt zur Bakterienmembran orientiert und somit in der Ausprägung einer hydrophilen, transmembranen Pore resultiert [176]. Obwohl Studien gezeigt haben, dass α -helikale Peptide sehr effiziente antimikrobielle Agenzien sind, welche mittels Modifikationen in Ihrem Wirkspektrum und Wirkintensität beeinflusst werden können, verfügen sie oftmals über ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften [46, 192].

Ein alternatives Sekundärstrukturmotiv wird durch das antiparallele β -Faltblatt repräsentiert. Diese Struktur kann *in silico* durch die alternierende Anordnung hydrophiler und hydrophober Aminosäurereste erzeugt werden [193-195]. Die Häufigkeit der Anordnung und die Wiederholung des Motivs können je nach Peptid variieren [196]. So waren natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptiden mit β -Faltblattstruktur durch deutlich kürzere Abstände zwischen den sich wiederholenden Einheiten gekennzeichnet, als es bei den in Proteinen vorkommenden β -Schleifen üblich ist [193]. In Analogie zu den α -helikalen Peptiden können β -Faltblatt-Motive dazu verwendet werden, um artificielle, antimikrobiell wirksame Peptide zu generieren. Gleichmaßen sind diesbezüglich die amphipathischen Eigenschaften dieser Peptide von entscheidender Bedeutung [197-199]. In einer hydrophilen Umgebung formen diese Peptide antiparallele β -Faltblattstrukturen, bei welchen die hydrophoben Seitenketten der peptideigenen Aminosäuren miteinander interagieren und als Folge dessen sich im inneren der Struktur befinden. Ihre antimikrobielle Wirkung wird mit dem „carpet model“ erklärt, bei welchem eine initiale Anlagerung mittels elektrostatischer Interaktionen stattfindet [39]. Darauf folgend findet eine Aggregation zu peptidreichen Domänen statt, welche im Anschluss daran in die Membran integriert werden, wodurch transmembrane Poren entstehen [197, 200]. Diese werden durch die hydrophoben Interaktionen der Peptidseitenketten mit den hydrophoben Bereichen der bakteriellen Membran stabilisiert. Durch diese Interaktion orientieren sich die kationischen Seitenketten entgegengesetzt zu den bakteriellen Membranen, wodurch ein stabiler und hydrophiler transmembraner Kanal entsteht. Obwohl die Interaktion dieser Peptide ebenfalls auf einer Wechselwirkung mit den in der bakteriellen Membran befindlichen Lipiden beruht, und ebenfalls zu einer Permeabilisierung der Membran führt, konnten Unterschiede zu α -helikalen antimikrobiellen Peptiden festgestellt werden. So konnte gezeigt werden, dass antimikrobielle Peptide, welche über ein β -Faltblatt-Motiv verfügen, über eine teilweise selektive Aktivität gegenüber Bakterien im Vergleich zu Eukaryoten verfügten, wohingegen Peptide mit identischer Aminosäurekomposition, jedoch mit einer α -helikalen Struktur sowohl antimikrobielle als auch zytotoxische Eigenschaften aufwiesen [201].

2.3 Antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen

Die Kontrolle bakterieller Populationen, sowie der Schutz gegenüber bakteriellen Infektionen sind in der heutigen Gesellschaft von fundamentaler Bedeutung. Aufgrund der Tatsache, dass Bakterien in der Lage sind feste Oberflächen besiedeln zu können, stellen kontaminierte Oberflächen ein erhebliches Reservoir für neue Infektionen dar [202]. Die Kontrolle und Vermeidung von bakteriellen Oberflächenanhaftungen und einer damit verbundenen eventuellen Bakterienausbreitung und Verteilung sind von maßgeblicher Relevanz bei etlichen Aspekten, wie z. B. in lebensmittelherstellenden und verarbeitenden Betrieben oder öffentlichen Einrichtungen, in welchen eine Exposition von kontaminierten Oberflächen aufgrund der menschlichen Fluktuation zu einer raschen Ausbreitung der Krankheitserreger führen kann [202]. Insbesondere stellen kontaminierte Oberflächen eine dominante Quelle für neue Infektionen in öffentlichen Einrichtungen dar, wie z. B. Schulen, Verwaltungsgebäuden oder Krankenhäuser. Vor allem im medizinischen Sektor ist die Kontrolle der bakteriellen Keimbelastung von ausschlaggebender Bedeutung, da zum Einen in einem solchen Umfeld anzutreffende Bakterien ein erhebliches Gesundheitsrisiko aufgrund ihrer Taxonomie darstellen und zum Anderen die Patienten, welche in ambulanter oder sogar stationärer Behandlung sind, aufgrund ihrer reduzierten Immunabwehr deutlich empfänglicher für Infektionen sein können [203]. Dieses Risiko wird aufgrund einer ausgedehnten Expositionsdauer drastisch erhöht und spiegelt sich insbesondere in der Anzahl der nosokomialen Infektionen wider [204]. Darüber hinaus stellen im Krankenhaus erworbene Krankheitserreger ein besonderes Gefährdungspotential dar, da es sich in vielen Fällen um Bakterien handelt, welche aufgrund der sukzessiven Exposition gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika und Medikamenten im Laufe der Zeit multiple Resistenzen entwickelt haben. Dies erschwert eine erfolgreiche Therapie erheblich [105]. Diese Problematik spiegelt sich insbesondere bei Implantat-assoziierten Infektionen wider, welche eine der häufigsten Übertragungsformen und am schwierigsten zu behandelnden Infektionen darstellen [205-207]. Bakterien sind in der Lage feste Oberflächen langfristig zu besiedeln, was in vielen Fällen mit der Ausbildung von Biofilmen einhergeht. Basierend auf der Taxonomie dieser Biofilm-produzierenden Bakterien und der Fähigkeit der zusätzlichen Besiedlung dieser Biofilme durch weitere Bakterien, verfügen solche Bakterienverbände in vielen Fällen über ausgeprägte Resistenzen gegenüber einer Vielzahl von antimikrobiellen Substanzen wie z. B. Antibiotika [207]. Somit zeigen diese Bakterienverbände eine bis zu 1000-fach erhöhte Resistenz gegenüber antimikrobiellen Agenzien im Vergleich zu den korrespondierenden planktonischen Bakterien [208]. Dies führt dazu, dass die Eliminierung dieser Biofilme maßgeblich erschwert bzw. vollständig verhindert wird. Außerdem weisen einmal gebildete Biofilme eine hohe Resistenz gegenüber mechanischer Behandlung auf, weshalb in vielen Fällen chemische Prozeduren mit starken antimikrobiellen Substanzen notwendig sind [206]. Des Weiteren kann oftmals eine rasche Neubesiedelung von einmal behandelten Biofilme durch Bakterien festgestellt werden [206]. Aus diesen Gründen ist es erstrebenswert die bakterielle Kontamination und damit verbundene Biofilmbildung bereits in einem frühen Stadium zu detektieren und bereits im Vorfeld zu verhindern [207]. Dadurch könne zum Einen die direkte Ausbildung solcher Biofilme, aber auch die dadurch bedingte Ausbreitung und die Exposition von pathogenen oder allgemein nicht zuträglichen Bakterien vermindert werden. Als

Konsequenz können somit neben der Reduktion von bakteriellen Infektionen und deren Ausbreitung auch die Materialermüdung verringert und somit langfristig Kosten reduziert werden. Zur Realisierung sind weitreichende Hygienemaßnahmen von entscheidender Bedeutung. Aufgrund logistischer, gesundheitlicher oder kommerzieller Begebenheiten sind intensive und umfangreiche Reduktionen bakterieller Belastungen durch aggressive chemische Substanzen jedoch in ihrer Anwendung limitiert. Deshalb stellen vor allem präventive Methoden zur Kontrolle der bakteriellen Keimbelastung eine aussichtsreiche Methode dar, da dadurch entstehende Kontaminationen zeitnah verhindert werden können. In diesem Zusammenhang werden antimikrobielle Oberflächenmodifikationen als alternativer, lang anhaltender, präventiver Schutz vor bakteriellen Kontaminationen diskutiert [209, 210].

Prinzipiell kann bei der Wirkweise von antimikrobiell wirkenden Oberflächenbeschichtungen zwischen der Verminderung der bakteriellen Anhaftung und der aktiven antimikrobiellen Wirkung der Oberfläche unterschieden werden (Abbildung 2.7). Die Reduktion der bakteriellen Adhäsion basiert vorrangig auf den physikalischen Eigenschaften der Oberfläche, welche in Abhängigkeit der verwendeten Oberflächenmodifikation entweder auf einer sterischen Hinderung durch PEG-basierte Beschichtungen [211], elektrostatische Abstoßungen durch immobilisiertes anionisches Polyglycerin [212] oder einer verminderten Oberflächenrauigkeit aufgrund von hydrophoben Kieselol-Beschichtungen [213] beruhen kann und somit einen präventiven Schutz gegenüber der lokale Besiedlung durch Bakterien bietet.

Im Gegensatz dazu basiert die direkte antimikrobielle Aktivität von Oberflächen auf einer Interaktion der Bakterien mit einem aktiv wirkenden Stoff. Dieser kann dabei entweder kontinuierlich in das umgebende Medium abgegeben werden, wodurch auch oberflächennahe Bakterien von dessen Wirkung beeinflusst werden, oder aber kovalent an der Oberfläche immobilisiert sein. So konnten z. B. demonstriert werden, dass Silbernanopartikel in Polyamidbeschichtungen auf der Oberfläche eingebettet und kontinuierlich in das umgebende Medium abgegeben werden können, wodurch das bakterielle Wachstum bereits in oberflächennahen Regionen inhibiert wurde [214]. Ebenso konnte festgestellt werden, dass kovalent immobilisierte und alkylierte Polyethylenimine eine starke bakterizide Wirkung gegenüber einer Vielzahl von pathogenen Mikroorganismen aufwiesen [215].

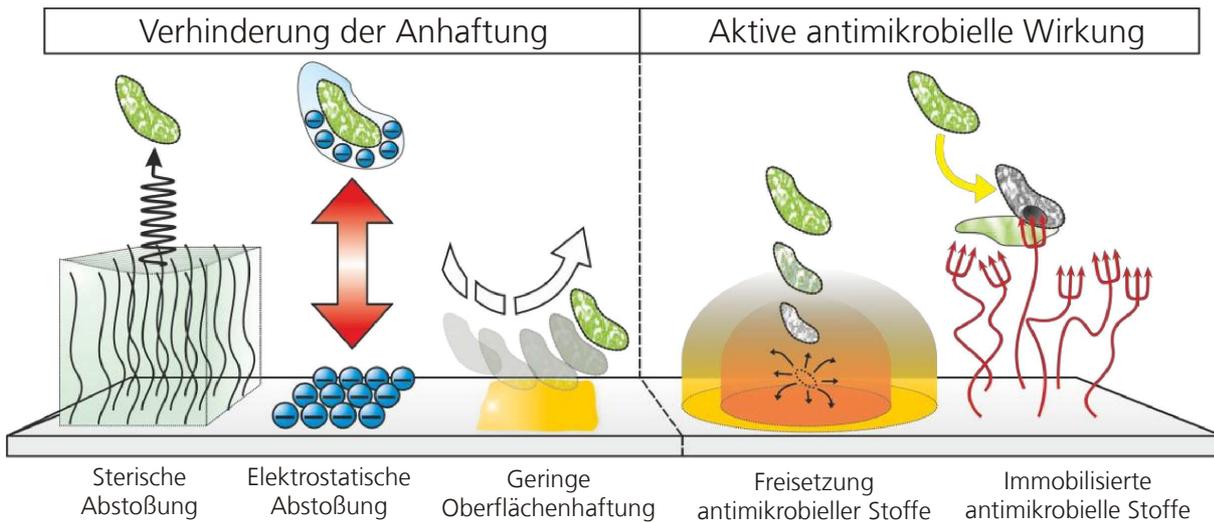


Abbildung 2.7: Darstellung verschiedener antimikrobieller Oberflächenbeschichtungen. Dargestellt sind die Prinzipien von antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen, welche entweder auf der Verhinderung der Anhaftung oder aber auf der direkten Inaktivierung der Bakterien beruhen [216][IV]. Während die Verhinderung der Anhaftung hauptsächlich durch die physikalischen Eigenschaften der Oberfläche, wie z. B. sterische Hinderung, elektrostatische Abstoßung oder verringerte Oberflächenrauigkeit vermittelt wird, basiert die aktive antimikrobielle Wirkung von Oberflächenbeschichtungen auf der aktiven Interaktion der Bakterien mit auf der Oberfläche befindlichen funktionalen Substanzen. Hierbei kann prinzipiell zwischen der kontinuierlichen Wirkstofffreisetzung von aktiven Komponenten oder deren kovalenter Immobilisierung differenziert werden.

2.3.1 Kovalente Oberflächenmodifikationen

Kovalente Oberflächenmodifikationen mit antimikrobiellen Eigenschaften sind eine aussichtsreiche Herangehensweise, um einen lang anhaltenden, präventiven Schutz vor bakteriellen Kontaminationen zu gewährleisten. Eine besondere Bedeutung haben solche Oberflächenmodifikationen bei Implantaten [217, 218], welche eine der häufigsten Übertragungsformen von bakteriellen Kontaminationen darstellen und zu einer der am schwierigsten zu behandelnden Infektionen zählen [205-207]. Kovalente Oberflächenmodifikationen zeichnen sich dadurch aus, dass der Ort der antimikrobiellen Wirkung definiert ist und somit eine übermäßige oder unbeabsichtigte Exposition der antimikrobiellen Wirkstoffe ausgeschlossen werden kann. Außerdem wird dadurch gewährleistet, dass die antimikrobiell wirksame Substanz permanent in ausreichend großer Konzentration vorhanden ist. Diesbezüglich sind in der Vergangenheit vielerlei Antibiotika für die kovalente Modifikation eingesetzt worden, wie z. B. Cefazolin [219], Minocycline/Rifampin [220] oder Vancomycin [221]. Obwohl diese Antibiotika sehr effektive Substanzen für die Inhibierung des bakteriellen Wachstums darstellen, besteht jedoch die Gefahr der Ausbildung von Antibiotikaresistenzen [222]. Dies würde zu einer anfänglichen Besiedelung durch resistente Bakterien führen, welche im Anschluss daran die Grundlage für eine weitere Kolonisation durch zusätzliche Bakterien bilden würden, was letztendlich zu einem Verlust der Funktionsweise der antimikrobiellen Oberflächenbeschichtung führen würde. Aus diesem Grund sind bereits andere, auf chemischen Substanzen beruhende Oberflächenbeschichtungen entwickelt worden, deren aktive Komponenten z. B. Silberionen [223], quartäre Ammoniumverbindungen [224], Sialinsäure [225], als auch chemische Polymere [216] sein können. Obwohl diese antimikrobiellen Stoffe äußerst effektiv bei der Reduktion von bakteriellen Kontaminationen sind, weisen sie jedoch eine maßgebliche Limitierung ihres Einsatzgebietes aufgrund potentieller zytotoxischer Eigenschaften gegenüber eukaryotischen Zellen oder

biologischer Inkompatibilitäten auf [226]. Um diese Limitierung zu umgehen und antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen mit biokompatiblen Eigenschaften zu entwickeln wurden in der Vergangenheit bereits antimikrobielle Peptide für die Verwendung als funktionale Oberflächenmoleküle erforscht [109, 227]. Im Zuge dessen hat sich gezeigt, dass diese Peptide neben ihren antimikrobiellen auch über biokompatible Eigenschaften verfügen und somit prädestiniert für den Einsatz im Zusammenhang mit Oberflächenmodifikationen sind [228]. In vergangenen Studien wurden bereits vielerlei Oberflächen für die kovalente Immobilisierung von antimikrobiellen Peptiden verwendet, welche unter anderem verzweigte Polymere [229], Polymerpartikel [230], Metalle [231], Glasoberflächen [232], oder selbst organisierende Monoschichten [233] umfassten. Prinzipiell wird bei der kovalenten Immobilisierung von Peptiden zwischen gerichteten und ungerichteten chemischen Ligationen differenziert. Bei der gerichteten chemischen Immobilisierung findet eine spezifische Reaktion zwischen einer funktionellen Gruppe innerhalb der Peptidsequenz und einer funktionellen Gruppe auf der festen, chemisch modifizierten Oberfläche statt [234]. Diese funktionellen Gruppen sind nicht natürlichen Ursprungs und somit nicht Bestandteil einer Peptidsequenz, welche aus proteinogenen Aminosäuren aufgebaut ist und muss demzufolge bereits während des Syntheseprozesses in die Peptidsequenz integriert werden. Somit resultiert aus einer derartigen selektiven Ligation eine kovalente, nicht in der Natur vorkommende, Verbindung zwischen dem antimikrobiellen Peptid und der Oberfläche. Hierdurch kann sowohl die Reaktion und als auch die aus der Reaktion resultierende Orientierung des antimikrobiellen Peptids auf der Oberfläche kontrolliert werden, da es sich um außerordentlich selektive chemische Reaktionen handelt [228, 235, 236]. Die gezielte Positionierung dieser Funktionalitäten innerhalb der Peptidsequenz ermöglicht es, dass die Aminosäureseitenketten und deren biophysikalische Eigenschaften nicht beeinflusst werden und somit, trotz kovalenter Immobilisierung, Sequenzmotive innerhalb des Peptids erhalten werden können. Des Weiteren kann dadurch die Immobilisierung in einem deutlich flexibleren Zustand realisiert werden, welcher vorteilhaft ist, um die natürlichen Interaktionen zwischen Peptid und Bakterium nicht zu beeinflussen.

Als Alternative zu der gerichteten chemischen Immobilisierung existiert die Möglichkeit einer ungerichteten Immobilisierung, bei welcher keine speziellen Funktionalitäten innerhalb der Peptidsequenz existieren müssen. Folglich können z. B. Amino-, Carboxy-, Thiol- oder Hydroxylgruppen verwendet werden, welche in natürlich vorkommenden Peptiden entweder als Teil der Aminosäureseitenketten oder aber als C- oder N-Terminus enthalten sind. Da Peptide mehrere dieser funktionellen Seitenketten enthalten können, resultiert die chemische Reaktion in einer zufälligen Anordnung der Peptide auf der Oberfläche [228, 232]. Aufgrund der Tatsache, dass die funktionellen Gruppen eines Peptide, insbesondere die kationischen Eigenschaften der Lysinseitenketten, einen entscheidenden Anteil an der Vermittlung des antimikrobiellen Wirkmechanismus besitzen, besteht bei einer ungerichteten Immobilisierung die Möglichkeit, dass die Aktivitäten reduziert werden.

In diesem Zusammenhang konnte in vergangenen Untersuchungen eine starke Abhängigkeit der Aktivität von der Orientierung des Peptids im immobilisierten Zustand nachgewiesen werden. So wurde erkennbar, dass lediglich eine Immobilisierung über den N-Terminus zu einer funktionellen Oberflächenbeschichtung mit dem Peptid LL-37 führte, wohingegen eine ungerichtete Immobilisierung in einem Verlust der

antimikrobiellen Aktivität resultiert [231]. Ähnliche Ergebnisse konnten bei dem antimikrobiellen Peptid Melittin beobachtet werden, dessen Immobilisierung über den C-Terminus zu einer signifikanten Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften im Vergleich zu einer N-terminalen Immobilisierung führte [236]. Jedoch konnte ebenfalls bewiesen werden, dass die Aktivität eines artifiziellen α -helikalen Peptids unabhängig von der Orientierung der Immobilisierung war. Aufgrund der Tatsache, dass die Funktionsweise antimikrobieller Peptide im immobilisierten Zustand nicht eindeutig geklärt ist und die Ergebnisse je nach verwendetem Peptid unterschiedliche Tendenzen zeigen, wird davon ausgegangen, dass der Wirkmechanismus der individuellen antimikrobiellen Peptide einen deutlich größeren Einfluss auf die Aktivität im immobilisierten Zustand hat, als die eigentliche Orientierung auf der Oberfläche.

2.3.2 Oberflächen mit kontinuierlicher Wirkstofffreisetzung

Die kontinuierliche Wirkstofffreisetzung von antimikrobiell wirksamen Substanzen stellt ebenfalls eine aussichtsreiche Methode dar, um die lokale Ansiedelung von Bakterien zu verhindern. Hierbei werden neben dem direkten Kontakt mit der Oberfläche auch Bakterien beeinflusst welche sich in einer oberflächennahen Umgebung befinden, was somit in einer deutlich ausgedehnteren Wirkung des antimikrobiellen Wirkstoffs resultiert. Des Weiteren eignet sich diese Methode dazu Wirkstoffe zu verwenden, welche im kovalent immobilisierten Zustand lediglich verringerte oder gar keine Aktivitäten besitzen. In vergangenen Studien wurden bereits antimikrobielle Peptide für solche, nicht kovalenten Oberflächenbeschichtungen verwendet. Die Immobilisierung der Peptide basiert vorrangig auf einer physikalischen Adsorption an der Oberfläche, welche entweder auf hydrophoben [237, 238] oder elektrostatischen [239] Wechselwirkungen beruht. Aufgrund der Tatsache dass antimikrobielle Peptide in vielen Fällen eine positive Nettoladung und starke hydrophobe Eigenschaften besitzen, ist diese Technik für ein breites Spektrum von antimikrobiellen Peptiden geeignet. Eine aussichtsreiche Herangehensweise für die elektrostatische Anlagerung von Peptiden an Oberflächen stellen Layer-by-Layer (LbL) Verfahren dar [239-241]. Hierbei werden die antimikrobiellen Peptide zwischen verschiedenen Schichten aus Polyelektrolyten platziert, deren Größe, Ladung und Anordnung variabel sind. Diese Schichten werden wiederum durch einen initialen Anlagerungsschritt physikalisch auf der Oberfläche deponiert und anschließend durch abwechselnde Anordnung von kationischen und anionischen Polyelektrolyten aufgebaut. In diesem Zusammenhang können die antimikrobiellen Peptide entweder eine Teilschicht dieser Elektrolyte sein oder aber die kationische Schicht vollständig ersetzen. Durch diese kontinuierliche Anlagerung mehrere Schichten ist es möglich eine große Menge des antimikrobiellen Peptids auf der Oberfläche zu deponieren. Da die antimikrobiellen Peptide demzufolge im Inneren der polymeren Schicht eingebettet sind und somit ein direkter Kontakt mit den Bakterien nicht möglich ist, müssen sie erst mittels Diffusion aus den inneren Schichten an die Oberfläche und anschließend daran in das umgebende Medium gelangen, um ihre antimikrobiellen Eigenschaften zu entfalten. Daher sind die Eigenschaften der polymeren Oberflächenbeschichtung von entscheidender Bedeutung, da aufgrund der Komplexität [242] und der Peptid-Polymer Interaktionen [243] die Diffusion und somit auch die Abgabe des antimikrobiellen

Peptids beeinflusst werden kann. Durch die Komposition der Elektrolytschichten ist es somit auch möglich die zeitliche Abgabe des antimikrobiellen Peptids zu beeinflussen. Neben der Adsorption von antimikrobiellen Peptiden mittels LBL-Verfahren existieren weitere Methoden, um eine kontinuierliche Freisetzung zu gewährleisten. So wurden z. B. Oberflächenbeschichtungen aus TiO₂ Nanoröhrchen in Kombination mit einer Kalziumphosphat- und Phospholipidschicht verwendet [244]. Während die TiO₂ Nanoröhrchen einerseits zur Vergrößerung der Oberfläche beitragen und andererseits die Anlagerung des antimikrobiellen Peptids durch die adsorptiven Eigenschaften begünstigen, dienen die beiden Schichten als physikalische Barriere um die Abgabe des Peptids zu verlangsamen und somit eine sukzessive Freisetzung über einen ausgedehnten Zeitraum zu gewährleisten. Eine weitere Methode stellt die Verwendung von Nanofasern dar, welche sich ebenfalls durch eine große Oberfläche in Kombination mit adsorptiven Eigenschaften auszeichnen [245]. Je nach verwendetem Material können diese Fasern die extrazelluläre Matrix des menschlichen Körpers imitieren und eignen sich somit besonders gut für *in vivo* Applikationen. Obwohl die adsorptive und elektrostatische Anlagerung eines antimikrobiellen Peptides, in Kombination mit einer kontinuierlichen Freisetzung, eine äußerst effiziente Methode darstellt um möglichst große Mengen auf der Oberfläche zu deponieren, ist sie aktuell in ihrer Anwendung limitiert. Maßgeblich hierfür ist, dass aufgrund der stetigen Diffusion des antimikrobiellen Peptids von der Oberfläche ein Konzentrationsgradient im angrenzenden Medium generiert wird. Dieser könnte zur Folge haben, dass bakterielle Resistenzen entwickelt werden, welche durch die Exposition gegenüber Dosierungen unterhalb der letalen Konzentration hervorgerufen werden. Ferner besteht das Problem, dass durch eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung die antimikrobielle Funktionsweise dieser Oberfläche zeitlich limitiert ist. So zeigten Studien, dass Nanofasern bereits nach 60 min mehr als 40 % der gesamten Peptidmenge abgegeben hatten [245]. Ein ähnliches Verhalten wurde anhand von LBL-basierten Oberflächenbeschichtungen verifiziert, bei welchen je nach Komposition der Schicht eine 90 %ige Abgabe des antimikrobiellen Peptids nach einer Dauer von 3 bzw. 9 Tagen erfolgte [241]. Eine weitere Einschränkung bei der Verwendung von nicht kovalenten Oberflächenbeschichtungen besteht darin, dass die Stabilitäten und biologischen Interaktionen der verwendeten Materialien noch nicht ausreichend untersucht sind und somit zusätzliche Effekte nicht vollständig ausgeschlossen werden können.

3 Methoden

3.1 Antimikrobielle Peptide

3.1.1 Aufbau artifizierender Peptide und Peptidbibliotheken

Antimikrobielle Peptide besitzen ausgeprägte Wirkmechanismen, welche auf einer Rezeptor-unabhängigen Interaktion mit den bakteriellen Membranen beruhen. In vielen Fällen wird der antimikrobielle Wirkmechanismus mit charakteristischen dreidimensionalen Strukturmotiven assoziiert, welche sich während der Interaktion mit den bakteriellen Membranen ausbilden. Insbesondere sind diesbezüglich amphipathische Eigenschaften der Peptide von besonderer Bedeutung, welche oftmals bei Peptiden mit α -Helix- oder β -Faltblatt-Motiven beschrieben wurden und durch die Anordnung der Aminosäuren in der Peptidsequenz bestimmt werden. Basierend auf dieser Grundlage wurden Peptidbibliotheken generiert, die keine der oben erwähnten Strukturmerkmale aufweisen, um im Zuge der Untersuchung neuartige artifizierende Peptide zu entwickeln. Da antimikrobielle Peptide in vielen Fällen über ein hohes Maß an kationischen und hydrophoben Aminosäuren verfügen, wurden diese Charakteristiken bei der Erstellung der Bibliotheken ebenfalls berücksichtigt. Somit wurden für die Konstruktion der artifizierenden Peptide hydrophobe (Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin), kationische (Arginine, Lysin) und neutrale (Glycin) Aminosäuren verwendet. Die Anordnung der Aminosäuren erfolgte dabei in drei individuellen Bereichen. Der zentrale Bereich war durch eine hohe Anzahl hydrophober Aminosäuren charakterisiert, wohingegen die zwei flankierenden Bereiche ausschließlich kationische Aminosäuren enthielten. Die Notwendigkeit dieser drei Bereiche wurde durch eine Peptidbibliothek verifiziert, bei welcher die Sequenzlänge identisch blieb, jedoch einzelne Bereiche vollständig substituiert wurden (M1 bis M6). Die minimale notwendige Sequenzlänge wurde identifiziert, indem Bibliotheken mit einer sukzessiven Reduktion am C-Terminus (C1 bis C8, inklusive M1), N-Terminus (N1 bis N8, inklusive M1) oder innerhalb des hydrophoben Bereichs (H1 bis H8 inklusive M1) angefertigt wurden. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Aminosäureanordnung auf die antimikrobiellen Eigenschaften analysiert. Hierfür wurde eine Peptidbibliothek verwendet, bei welcher die Aminosäurekomposition unverändert blieb und lediglich die zentralen hydrophoben Aminosäuren schrittweise zu den Termini verschoben wurden (A1 bis A5). Der Einfluss der negativen Ladung innerhalb der C-terminalen Region wurde mit Hilfe einer Substitutionsbibliothek analysiert, bei welcher kationische gegen anionische Aminosäuren ausgetauscht wurden (D1 bis D8). Analog dazu wurde der Einfluss der Aminosäurekomposition auf die antimikrobiellen Eigenschaften unter Verwendung einer Substitutionsbibliothek untersucht, deren Sequenzlänge 11 Aminosäuren umfasste und jeweils nur eine Art von kationischer und hydrophober Aminosäure enthielt (S1 bis S8). Um sowohl die physikalischen, als auch die antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften der artifizierenden Peptide zu klassifizieren wurden zusätzlich fünf natürlich vorkommende Peptide (Melittin, BMAP-27, Protamin, Indolicidin, Buforin II) und ein artifizierendes antimikrobielles Peptid, welches über eine optimierte amphipathische α -helikale Konformation (KL-Helix) verfügte als Referenzen

verwendet. Weiterhin wurden zu Vergleichszwecken die beiden bereits gut analysierten Peptide Bac2a und Tet127, sowie das als Negativkontrolle konzipierte Peptid P7 verwendet.

3.1.2 Peptideigenschaften und dreidimensionale Strukturmodellierung

Die Hydrophobizität (H), das Hydrophobizitätsmoment (μ) und die Helixrad-Projektion wurden für jedes antimikrobielle Peptid individuell berechnet, wobei jeweils eine idealisierte α -helikale Konformation angenommen wurde. Die Berechnungen wurden mit dem „HeliQuest web server“ [246] durchgeführt, wobei den Berechnungen ein neutraler pH-Wert (7,4) und die Hydrophobizitätsskala von Eisenberg [190, 191] zugrunde lagen.

Die dreidimensionalen Strukturen der antimikrobiellen Peptide wurden unter Verwendung des „PEP-FOLD web servers“ berechnet [247-249], wobei den Berechnungen eine hydrophile Umgebung zu Grunde lag. Darüber hinaus wurden die Strukturen ebenfalls mit dem „PEPstr Peptide Tertiary Structure Prediction web server“ berechnet [250], welcher einen anderen Algorithmus verwendet. Dieser wurde dafür verwendet, um die prognostizierten Strukturen zu verifizieren. Neben der Berechnung in einem hydrophilen Milieu wurden auch Berechnungen für eine hydrophobe Umgebung vorgenommen. Die resultierenden dreidimensionalen Strukturen wurden mit der Software Geneious 6.1.5 [251] verarbeitet und mit Hilfe der Software UCSF Chimera [252, 253] visualisiert. Für die Darstellungen wurde das Bändermodell verwendet. Die physikalischen Eigenschaften, sowie die dreidimensionalen Strukturen wurden für Peptide mit einer minimalen Länge von neun Aminosäuren ermittelt, wohingegen Peptide mit kürzeren Sequenzen aufgrund von mathematischen Ungenauigkeiten der Algorithmen von den Berechnungen ausgenommen wurden.

3.2 Mikro- und Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Bakterienstämme und Kultivierung

Es wurden drei verschiedenen Bakterienstämme verwendet um die antimikrobiellen Eigenschaften der Peptide sowie der Peptid-basierten Oberflächenbeschichtungen zu analysieren.

Als gramnegativer Mikroorganismus wurde *Escherichia coli* Dh5 α verwendet, wohingegen *Staphylococcus xylosus* als grampositiver Bakterienstamm verwendet wurde. Beide Stämme wurden sowohl in MHB Medium, als auch auf MHB-Agarplatten kultiviert. Für die Kultivierung wurden fraktionierte Ausstriche einer Stammkultur angefertigt, welche im Anschluss daran mindestens 16 h bei 37 °C inkubiert wurde. Darauf folgend wurde eine einzelne Kolonie in flüssiges Kulturmedium überführt und erneut für mindestens 16 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Für jede Versuchsreihe wurden die Bakterien frisch inokuliert und bis in den mittleren Bereich der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* ML-35p wurde dazu verwendet um die zeitabhängige Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran aufgrund der Interaktion mit antimikrobiellen

Peptiden zu untersuchen. Die Bakterien wurden mittels LB-Medium kultiviert welches mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt war. Nach der Isolation einer einzelnen Kolonie mittels fraktionierten Ausstrichs, wurden die Bakterien in einer Flüssigkultur bis in die mittlere logarithmische Wachstumsphase kultiviert. Im Anschluss daran wurden sie dreimal bei 4000 x g für 1 min zentrifugiert, der flüssige Überstand verworfen, in HEPES-Puffer resuspendiert und auf eine $OD_{600}=0,3$ verdünnt, welche in den Experimenten bezüglich der Membranpermeabilisierung verwendet wurde (3.2.7).

3.2.2 Eukaryotische Zellkulturen und Kultivierung

Für die Untersuchung der zytotoxischen Eigenschaften wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Zum Einen die histiozytäre Lymphom-Zelllinie U-937, bei welcher es sich um eine Suspensionszelllinie handelte und zum Anderen L-929 Zellen, bei welchen es sich um adhärenzte Mausfibroblasten handelte. Die U-937 Zellen wurden für die quantitative Ermittlung der zytotoxischen Eigenschaften von gelösten antimikrobiellen Peptiden verwendet. Darüber hinaus wurde sie ebenfalls für den quantitativen und qualitativen Nachweis von zytotoxischen Eigenschaften der antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen eingesetzt. Die L-929 Zellen wurden für die qualitative Auswertung der zytotoxischen Eigenschaften von gelösten antimikrobiellen Peptiden verwendet.

Für die Kultivierung wurden die U-937 Zellen inokuliert und mit einer Anfangskonzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 15 ml RPMI 1640 Medium, welchem 2 mM Glutamin und 10 % FCS zugesetzt wurde, für 3 Tage bei 37 °C in T75 Zellkulturflaschen bei 5 % CO₂ in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Die bakterielle Kontamination wurde durch die Zugabe von 10 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verhindert. Für jedes Experiment wurden, basierend auf dieser Stammkultur, neue Kulturen angelegt, welche jedoch ohne die Zugabe von Antibiotika inkubiert wurden. Abschließend wurden die Zellen in einer Thomakammer gezählt und ihr Vitalitätszustand anhand einer Trypanblau-Färbung bestimmt. Für die Versuche wurden ausschließlich Kulturen verwendet, welche über eine ausreichende Vitalität verfügten.

Für die Kultivierung von L-929 Zellen wurden diese zunächst in DMEM-Medium mit einer Anfangskonzentration von 1×10^4 Zellen/cm² inokuliert und in T75 Zellkulturflaschen bei 5 % CO₂ in einer Feuchtigkeitskammer für 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gespült und unter Verwendung einer 0,05 %igen Trypsin-Lösung von der Oberfläche abgelöst. Abschließend wurden die Zellen mit einer Anfangskonzentration von 1×10^4 Zellen/cm² in eine Nunc Kammer überführt und für 2 weitere Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert.

3.2.3 Durchflusszytometrie

Die Membran-permeabilisierenden Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Anhang B.1). Hierbei wurde eine Lebend-Tot Färbung in Kombination mit einem internen, Partikel-basierten Kalibrierungssystem verwendet. Dadurch konnten neben den Analysen bezüglich der Permeabilisierung der Zellmembran auch die absoluten Konzentrationen der Organismen ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden SYBR Green I als Farbstoff verwendet, welcher eine Fluoreszenzmarkierung der zellinternen DNA gewährleistet, die unabhängig von der Durchlässigkeit der Zellmembran ist. Als Indikator für die Permeabilisierung wurde der membranundurchlässige Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid verwendet, welcher lediglich aufgrund beschädigter Membranen in das Zellinnere eindringen kann. Die interne Kalibrierung und die damit verbundene Quantifizierung der Zellen wurde unter Zuhilfenahme von „PeakFlow orange flow cytometry reference beads“ durchgeführt. Sämtliche Analysen wurden an einem Durchflusszytometer durchgeführt, welches mit einem Argonlaser und den entsprechenden Fluoreszenzfiltern für SYBR Green I (525 nm BP) und Propidiumiodid (620 nm BP) ausgestattet war. Sämtliche Detektoren wurden auf eine logarithmische Skalierung eingestellt und die entsprechenden Messbereiche wurden im Vorfeld durch lebende und mit Isopropanol permeabilisierte Bakterien bzw. eukaryotische Zellen ermittelt. Für die Detektion wurde ein Schwellenwert für den Detektor des Vorwärtsstreulichts eingestellt, wodurch elektronische und optische Störsignale unterbunden wurden. Um eine verlässliche Detektion von einzelnen Organismen zu gewährleisten wurden Durchflussraten von ungefähr 300 Ereignissen pro Sekunde verwendet, wobei bei jeder Messung eine Gesamtzahl von 20.000 Ereignissen erfasst wurde. Vor der eigentlichen Vermessung der biologischen Proben wurden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe, sowie die Kalibrierpartikel mit Hüllfluid gemischt, um eine Stammlösung zu erzeugen. Durch die Kombination von 450 µl Stammlösung mit 50 µl der jeweiligen Probe wurden finale Konzentrationen von 10 mM Propidiumiodid, 2 x SYBR Green I und $1,2 \times 10^5$ Partikel/ml realisiert. Im Anschluss daran wurden die Proben unter Lichtausschluss für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach vermessen. Die entsprechende Anzahl der einzelnen Ereignisse in jedem Messbereich wurde erfasst und unter Verwendung der cytomereigenen Software CXP Analysis 2.2 ausgewertet. Abschließend wurden, die absoluten Konzentration lebender und toter Organismen, sowie deren Gesamtzahl errechnet, wobei die Kalibrierpartikel als interne Referenz verwendet wurden. Sämtliche Events, welche nicht eindeutig als lebende oder tote Organismen identifiziert werden konnten, wurden als unbekannte Ereignisse zusammengefasst.

3.2.4 Minimale inhibitorische Konzentration (MIC)

Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) von ungebundenen, löslichen antimikrobiellen Peptiden wurde gegenüber *E. coli* DH5 α und *S. xylosus* ermittelt. Hierbei wurde eine Verdünnungsreihe des jeweiligen antimikrobiellen Peptids in einem Mikrolitermaßstab verwendet, wobei die Vorgaben des CLSI [254] und der EUCAST [255] beachtet wurden. Es wurden lediglich kleine Anpassung hinsichtlich der Verwendung von kleinen kationischen Peptiden vorgenommen [256]. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Von den antimikrobiellen Peptiden wurde eine logarithmische Konzentrationsreihe mittels 1:2 Verdünnungen in MHB Medium hergestellt. Im Anschluss daran wurden die Verdünnungen mit zuvor kultivierten Bakterien (3.2.1) gemischt, wodurch finale Konzentrationen von 0,25 μ M bis 64 μ M Peptid in Kombination mit jeweils 5×10^4 Bakterien/ml entstanden. Jeweils 200 μ l dieser Mischung wurden in Polypropylen Mikrotiterplatten überführt und für 16 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Steriles MHB Medium wurde als Negativkontrolle verwendet, wohingegen Bakterien ohne antimikrobielles Peptid als Positivkontrolle verwendet wurden. Die geringste Konzentration, bei welcher kein bakterielles Wachstum nachweisbar war, wurde als MIC bestimmt.

3.2.5 Membran-permeabilisierende Eigenschaften von antimikrobiellen Peptiden

Die Membran-permeabilisierenden Eigenschaften von ungebundenen, löslichen antimikrobiellen Peptiden wurden gegenüber *E. coli* DH5 α und *S. xylosus* ermittelt. Hierfür wurden die Bakterien kultiviert (3.2.1) und mittels Durchflusszytometrie (3.2.3) quantifiziert sowie hinsichtlich der Permeabilität charakterisiert. Für sämtliche Versuche wurden ausschließlich Bakterien mit intakten Membranen verwendet. Die antimikrobiellen Peptide wurden logarithmisch in MHB Medium verdünnt und im Anschluss daran mit Bakterien gemischt, wodurch finale Konzentrationen von 0,25 μ M bis 64 μ M Peptid in Kombination mit einer Bakterienkonzentration von 1×10^8 Bakterien/ml entstanden. Für die Analyse der artifiziellen antimikrobiellen Peptide wurden anstelle einer Peptidverdünnungsreihe die drei Konzentrationen 5, 25 und 50 μ M verwendet. Daran anschließend wurden sämtliche Proben für 2 h bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln inkubiert. Abschließend wurden sämtliche Proben mittels Durchflusszytometrie (3.2.3) vermessen und die geringste gemessene Peptidkonzentration, bei welcher eine Reduktion von mindestens 80 % der Bakterien mit intakten Membranen nachweisbar war, ermittelt.

3.2.6 Zytotoxische Eigenschaften von gelösten antimikrobiellen Peptiden

Die zytotoxischen Eigenschaften der in Lösung befindlichen antimikrobiellen Peptide wurden gegenüber der histiozytären Lymphom-Zelllinie U-937 untersucht. Die Messungen wurden mittels Durchflusszytometrie und einem Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden U-937 Zellen kultiviert (3.2.2) und die zytotoxischen Eigenschaften in Analogie zu den Membran-permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber Bakterien analysiert (3.2.5). Die Membran-permeabilisierenden Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide wurden darüber hinaus auch mit einem Zytotoxizitäts-Assay analysiert, wodurch neben den permeabilisierenden Eigenschaften auch die Inhibierung des Wachstums über einen Inkubationszeitraum von 4 Tagen erfasst werden konnte. Hierfür wurden die Zellen kultiviert (3.2.2) und im Anschluss daran durch dreimaliges Zentrifugieren bei 100 x g für jeweils 5 min und anschließender Resuspension in RPMI-Medium von eventuell verbliebenen Antibiotikarückständen gereinigt. Abschließend wurden 100 µl Zellen mit 100 µl antimikrobiellem Peptid in einer Polypropylen Mikrotiterplatte gemischt, wodurch Konzentrationen von 5×10^4 Zellen/ml in Kombination mit 0,25 µM bis 64 µM Peptid realisiert wurden. Proben ohne antimikrobielles Peptid wurden als Negativkontrollen verwendet, wohingegen 5 % Triton X-100 als Positivkontrolle verwendet wurde. Die Proben wurden im Anschluss daran für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Daran anschließend wurden die Proben gleichermaßen auf zwei verschiedene Kavitäten aufgeteilt. Eine der Proben diente dazu die direkte Beschädigung der eukaryotischen Membran zu untersuchen, wohingegen die andere Probe dazu verwendet wurde, um die wachstumshemmenden Eigenschaften über einen Zeitraum von 4 Tagen zu untersuchen. Die direkte Membranschädigung wurde unter Zuhilfenahme des „CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay“ untersucht. Hierfür wurden die Proben bei 100 x g für 10 min und 4 °C zentrifugiert und anschließend 50 µl des daraus resultierenden Überstands mit 50 µl Substratmischung kombiniert. Nach einer Inkubation von 30 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur wurden 50 µl Stopp-Lösung hinzugegeben und die Absorption des entstandenen Formazans bei 490 nm gemessen. Die Messdaten wurden um den Wert der Negativkontrolle verringert und gegen die Positivkontrolle normalisiert. Im Anschluss daran wurden die resultierenden Daten gegen die Peptidkonzentration aufgetragen und mittels der Software OriginPro 8.1 G eine sigmoide Ausgleichskurve, aufgrund des minimalsten Fehlerkoeffizienten, errechnet. Es wurden lediglich approximierte Kurvenverläufe für die Auswertung herangezogen, welche einen angepassten Fehlerkoeffizienten von mindestens 0,92 besaßen. Abschließend wurden anhand der Ausgleichskurven die Peptidkonzentrationen errechnet, bei denen eine 50 %ige Signalintensität nachgewiesen wurde (LD₅₀).

Die wachstumshemmenden Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide wurden anhand der Proben, welche einer weiteren viertägigen Inkubation unterzogen wurden, analysiert. Hierfür wurden jeweils 10 µl des Lysierungsreagenz zu den Proben gegeben und diese für weitere 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Überstände wie oben beschrieben analysiert und die Konzentration, bei welcher das Wachstum der eukaryotischen Zellen vollständig inhibiert wurde, als minimale toxische Konzentration (MTK) bestimmt. Abschließend wurde der Quotient aus der LD₅₀ und der zuvor für das antimikrobielle

Peptid ermittelten MIC (3.2.4) gebildet und das Ergebnis daraus als therapeutische Kennzahl (ϑ) klassifiziert. Kennzahlen von Peptiden, welche eine $LD_{50} > 64 \mu\text{M}$ und gleichzeitig eine MTK von weniger als $64 \mu\text{M}$ besaßen, wurden in Klammer gesetzt.

$$\vartheta = \frac{LD_{50}}{MIC} \quad (1)$$

3.2.7 Kinetik der inneren und äußeren Membranpermeabilisierung von *E. coli* ML-35p

Die zeitliche Permeabilisierung der äußeren und inneren Bakterienmembran wurde unter Zuhilfenahme des Modellbakteriums *E. coli* ML-35p ermittelt (Anhang B.2). Hierbei beruht die Analyse auf der zeitabhängigen Permeabilisierung der äußeren und inneren Bakterienmembran auf der Interaktion mit antimikrobiellen Peptiden, wodurch die Katalyse der zellexternen Substrate durch die zellinternen Enzyme ermöglicht wird [257]. Für die Analyse der äußeren Membranpermeabilisierung wurden Bakterien kultiviert (3.2.1) und im Anschluss daran mit Nitrocefin und antimikrobiellem Peptid kombiniert, wodurch finale Konzentrationen von $20 \mu\text{g/ml}$ Nitrocefin, $4 \mu\text{M}$ bis $32 \mu\text{M}$ antimikrobiellem Peptid, sowie Bakterien mit einer $OD_{600} = 0,1$ realisiert wurden. Die Proben wurden darauf folgend in einer Mikrotiterplatte bei 500 nm in kontinuierlichen Abständen über einen Zeitraum von 90 min bei leichtem Schütteln und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Zuhilfenahme eines Plattenlesegeräts vermessen. Die Analyse der inneren Membranpermeabilisierung erfolgte analog dazu, wobei jedoch anstelle von Nitrocefin die enzymatische Umsetzung von ONPG bei 420 nm und einer finalen Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ detektiert wurde. Proben ohne antimikrobielles Peptid wurden als Negativkontrollen verwendet, wohingegen Polymyxin B bei einer finalen Konzentration von $5 \mu\text{M}$ als Positivkontrolle verwendet wurde. Der zeitliche Datenverlauf der Proben wurde um die Werte der Negativkontrolle verringert und im Anschluss daran gegen die Werte der Positivkontrolle normalisiert. Für die resultierenden Datenpunkte wurde unter Verwendung der Software OriginPro 8.1 G eine Ausgleichskurve mittels sigmoidaler Approximation errechnet, da hierbei der minimalste Fehlerkoeffizient erzielt wurde. Für die finale Auswertung wurden lediglich approximierte Kurvenverläufe verwendet, welche mindestens ein angepasstes Bestimmtheitsmaß von $0,92$ besaßen. Für eine vergleichende quantitative Analyse der zeitabhängigen Membranpermeabilisierung wurde für alle antimikrobiellen Peptide der Zeitpunkt berechnet, bei welchem eine 50% ige Signalintensität erreicht wurde.

3.2.8 Behandlung von bakteriell kontaminierten Zellkulturen

Experimente mit bakteriell kontaminierten Zellkulturen wurden durchgeführt um die Anwendbarkeit einzelner antimikrobieller Peptide als therapeutisch wirksame Substanzen zu analysieren. Hierfür wurden die selektiven, Membran-permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber *S. xylosus*, U-937 Zellen und L-929 Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Proben angefertigt, in welchen sowohl pro- als auch eukaryotische Zellen vorlagen. *S. xylosus* (3.2.1), als auch die U-937 Zellen (3.2.2) wurden kultiviert, im Anschluss daran in RPMI 1640 Medium verdünnt und mit antimikrobiellem Peptid gemischt. Es wurden finale Konzentrationen von jeweils 1×10^6 Organismen/ml, sowie 25 μM oder 50 μM antimikrobielles Peptid verwendet. Die Mischungen wurden im Anschluss daran für 2 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert und in Analogie zu den Membran-permeabilisierenden Eigenschaften der Bakterien mittels Durchflusszytometrie (3.2.3) vermessen.

Alternativ dazu wurden die qualitativen Membran-permeabilisierenden Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide gegenüber den adhärennten L-929 Zellen und gelösten U-937 analysiert. Hierfür wurden diese zunächst kultiviert (3.2.1, 3.2.2) und anschließend mit *S. xylosus* in DMEM-Medium gemischt, welchem Propidiumiodid in einer Konzentration von 10 mM zugegeben wurde. Nach einer Inkubation von 60 min wurde den Kulturen antimikrobielles Peptid zugesetzt, wodurch finale Konzentrationen von 25 bzw. 50 μM realisiert wurden. Anschließend wurden die Kulturen für 6 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert, wobei in kontinuierlichen Abständen die Membranpermeabilitäten der Bakterien, sowie der L-929 Zellen mittels fluoreszenzmikroskopischer Analysen untersucht wurden.

3.3 Antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen

3.3.1 Kovalente Peptidimmobilisierung

Verschiedene kovalente Immobilisierungsstrategien wurden verwendet um Peptid-basierte Oberflächen mit antimikrobiellen Eigenschaften zu generieren. Hierbei wurden ausschließlich ungerichtete Immobilisierungen durchgeführt, bei welchen die in den Peptiden natürlich vorkommenden Aminogruppen der Lysinseitenketten oder des N-Terminus verwendet wurden. Für die Immobilisierungen wurden plane Glasoberflächen verwendet, welche mittels Silanisierung aktiviert wurden und deren funktionelle Gruppen durch weiterführende Derivatisierungen generiert wurden. Verwendet wurden Epoxy-, NHS-, PDITC- und Aldehyd-Modifikationen, welche sich alle durch ihre Reaktivität gegenüber Aminen auszeichnen [258].

3.3.1.1 Silanisierung, Derivatisierung und Aktivierung von Glasobjektträgern

Die Silanisierung stellt eine Kondensationsreaktion zwischen den funktionellen Hydroxylgruppen auf der Glasoberfläche und den hydrolysierbaren Alkoxygruppen der verwendeten Organosilane dar. Als Organosilane wurden APTES, welches über eine terminale Aminogruppe verfügt, und GOPTS, dessen terminale funktionelle Gruppe einen Epoxid-Ring darstellt, verwendet.

Für die Silanisierung der Glasobjektträger mit GOPTS, wurden diese für 1 h in einer 10 M NaOH-Lösung inkubiert und im Anschluss daran mit deion. Wasser und wasserfreiem Toluol gesäubert. Darauf folgend wurden die Glasobjektträger für 4 h in einer 10 mM GOPTS-Lösung in wasserfreiem Toluol bei 70 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Abschließend wurden die Oberflächen jeweils 20 min in Toluol, Ethanol und Wasser gewaschen, um verbliebene und unreaktierte Silanrückstände zu entfernen. Verbliebene Flüssigkeitsreste wurden mittels Zentrifugation und einem Stickstoffstrom entfernt und die Oberflächen unter Sauerstoff- und Wasserausschluss gelagert. Die Oberflächen wurden ohne weitere Modifikationen für die Immobilisierung von Peptiden mittels nukleophiler Addition an das auf der Oberfläche befindliche Epoxid eingesetzt (3.3.1.2).

Die Silanisierung der Oberflächen mit APTES wurde in einem wässrigen Milieu durchgeführt. Hierfür wurden die Oberflächen zunächst für 1 h in einer 10 M NaOH-Lösung inkubiert und im Anschluss daran mit Wasser gesäubert. Darauf folgend wurden die Oberflächen für 1 h in einer 10 %igen APTES-Lösung pH 3,1 unter stetigem Schütteln bei 80 °C inkubiert. Abschließend wurden verbliebene Silanreste durch kurzes Waschen mit Wasser entfernt und die Oberflächen in einem Trockenschrank bei 115 °C für 1 h getrocknet. Im Anschluss daran wurden die entstandenen Amin-modifizierten Oberflächen mit Bersteinsäureanhydrid derivatisiert, um terminale Carboxygruppen zu generieren. Hierfür wurden die Oberflächen durch zweimaliges Waschen mit Bicarbonat-Puffer äquilibriert. Darauf folgend wurde festes Bernsteinsäureanhydrid hinzugegeben, bis eine annähernd gesättigte Lösung entstand, welche für 30 min bei Raumtemperatur auf den Oberflächen inkubiert wurde. Um eine möglichst vollständige Derivatisierung zu gewährleisten, wurde dieser Vorgang fünfmal wiederholt und im Anschluss daran die Oberflächen gründlich mit deion. Wasser gewaschen. Abschließend wurden verbliebene Flüssigkeitsrückstände mittels Zentrifugation und einem Stickstoffstrom entfernt und die Oberflächen unter Sauerstoff und Wasser Ausschluss gelagert. Für die Aktivierung wurden die Oberflächen in einem MES-Puffer äquilibriert und im Anschluss daran in einer EDC/NHS-Lösung (jeweils 50 mg/ml in MES-Puffer) für 60 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen mittels zweimaligem Waschen mit MES-Puffer von verbliebenen Reaktionskomponenten gesäubert und sämtliche Flüssigkeiten entfernt. Darauf folgend wurden die mit EDC/NHS aktivierten Oberflächen für die kovalente Immobilisierung von Peptiden, unter Ausbildung einer Amidbindung eingesetzt (3.3.1.2).

3.3.1.2 Immobilisierung von Peptiden an reaktiven Oberflächen

Für die kovalente Immobilisierung von antimikrobiellen Peptiden wurden die zuvor aktivierten Glasobjektträger (3.3.1.1) verwendet. Ferner wurden kommerziell verfügbare reaktive Oberflächen verwendet, welche über identische chemische Eigenschaften verfügten. Die Oberflächen wurden mit einem Aufbau versehen, welcher die Separation in 16 individuelle Kammern gewährleistete und somit die Handhabung verschiedener flüssiger Proben auf einer Oberfläche ermöglichte. Anschließend wurden die Peptide in PBS-Puffer auf eine Ausgangskonzentration von 140 μM verdünnt und jeweils 70 μl zu den aktivierten Oberflächen gegeben. Bei einigen Experimenten wurden zuvor Peptidverdünnungen in PBS-Puffer angefertigt und von diesen verringerten Konzentrationen ebenfalls 70 μl zu den aktivierten Oberflächen gegeben. Als Positivkontrolle wurden die beiden Antibiotika Polymyxin B und Ampicillin verwendet. Als Negativkontrollen wurden verschiedene Oberflächen verwendet, welche identisch zu den mit Peptid modifizierten Oberflächen behandelt wurden. Zum Einen wurden Oberflächen verwendet, welche nicht mittels Silanisierung chemisch aktiviert wurden und somit lediglich die auf der Oberfläche befindlichen Hydroxylgruppen besaßen. Darüber hinaus wurden als Negativkontrollen Oberflächen verwendet, auf welchen kein antimikrobielles Peptid immobilisiert wurde, und diese somit ihre chemischen Funktionalisierungen behielten. Ferner wurden chemisch inaktivierte Oberflächen als Negativkontrollen verwendet. Hierfür wurden diese entweder mit einem 1 mM TRIS-Puffer oder eines BSA/TRIS-Puffers inaktiviert. Sämtliche Oberflächen wurden in einer Feuchtigkeitskammer bei 4 °C für 16 h inkubiert und im Anschluss daran nicht immobilisierte Peptide durch achtmaliges Waschen mit jeweils 200 μl PBS-Puffer entfernt.

3.3.1.3 Antimikrobielle Oberflächeneigenschaften

Die antimikrobiellen Eigenschaften der generierten Peptid-basierten Oberflächenbeschichtungen wurden durch den direkten Kontakt mit *E. coli* Dh5 α verifiziert. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Bakterien wurden über Nacht kultiviert (3.2.1) und im Anschluss daran mittels Durchflusszytometrie (3.2.3) analysiert und nachfolgend eine Konzentration von 2×10^6 Bakterien/ml in MHB-Medium hergestellt. Um während der Experimente ein Ablösen von antimikrobiellen Peptiden aufgrund instabiler chemischer Bindungen oder einer adhäsiven Anlagerung des Peptids ausschließen zu können, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Hierfür wurden die zuvor mit antimikrobiellem Peptid modifizierten Oberflächen (3.3.1.2, 3.3.2.4) verwendet, wobei ebenfalls unbehandelte oder inaktivierte Oberflächenbeschichtungen als Negativkontrollen verwendet wurden. Durch zweimaliges Waschen mit jeweils 200 μl MHB-Medium bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln für 30 min wurden die Oberflächen zunächst äquilibriert. Im Anschluss daran wurden die Flüssigkeitsüberstände entfernt, jede Oberfläche mit 70 μl MHB überschichtet und diese daraufhin für 2 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Darauf folgend wurden die Überstände entfernt und zu gleichen Mengen mit Bakterien in einem separaten Reaktionsgefäß gemischt, wodurch eine finale Bakterienkonzentration von 1×10^6 Bakterien/ml entstand.

Antimikrobielle Eigenschaften, welche in diesen Proben nachweisbar waren, wurden auf Peptide zurückgeführt, welche sich im Laufe der zweistündigen Inkubation von der Oberfläche gelöst hatten. Für die Ermittlung der antimikrobiellen Eigenschaften der kovalenten Oberflächenbeschichtung, wurden die zuvor äquilibrierten Oberflächen mit 70 µl einer frischen Bakterienkultur überschichtet, welche ebenfalls eine Konzentration von 1×10^6 Bakterien/ml besaß. Sämtliche Proben wurden daraufhin für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die antimikrobiellen Eigenschaften evaluiert, indem sämtliche Bakterien mittels Durchflusszytometrie (3.2.3) auf Ihre Membranschädigung untersucht wurden. Obendrein wurden die Bakterienproben logarithmisch verdünnt und die Verdünnungsfaktoren von 10^2 bis 10^5 als Dreifachansatz auf MHB-Agarplatten ausplattiert und nach einer Inkubation von wenigstens 16 h bei 37 °C die Kolonie bildenden Einheiten ermittelt. Proben, welche bei der geringsten Verdünnung zu wenig Kolonien für eine aussagekräftige Auswertung aufwiesen, wurden mit $< 1 \times 10^3$ Bakterien/ml klassifiziert.

3.3.1.4 Zytotoxische Oberflächeneigenschaften

Die zytotoxischen Eigenschaften der Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen wurden durch den direkten Kontakt mit der histiozytäre Lymphom-Zelllinie U-937 untersucht. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die eukaryotischen Zellen wurden kultiviert (3.2.2) und die zytotoxischen Eigenschaften in Analogie zu den antimikrobiellen Eigenschaften ermittelt (3.3.1.3). Zusätzlich wurden Experimente mit gemischten Kulturen von *E. coli* und U-937 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden beide Organismen miteinander gemischt, wodurch jeweils Konzentrationen von 1×10^6 Organismen/ml entstanden, welche daraufhin analog zu den antimikrobiellen Eigenschaften analysiert wurden (3.3.1.3).

3.3.2 Polymernetzwerke und kontinuierliche Wirkstofffreisetzung

Oberflächenbeschichtungen, bei welchen die antimikrobiell wirksame Substanz kontinuierlich von der Oberfläche in das umgebende Medium abgegeben wird, sind eine aussichtsreiche Methode, um bakterielle Kontaminationen bereits in oberflächennaher Umgebung zu inhibieren. Des Weiteren ermöglichen sie den Einsatz von biologisch kompatiblen antimikrobiellen Peptiden, welche im kovalent immobilisierten Zustand keine Aktivitäten besitzen. Zu diesem Zweck wurden Polymeroberflächen generiert, welche die elektrostatische Anlagerung von kationischen antimikrobiellen Peptiden ermöglichen. Weiterhin wurden diese Polymernetzwerke ebenso entwickelt, um eine vielseitig einsetzbare Oberflächenbeschichtung für die kovalente Immobilisierung von antimikrobiellen Peptiden zu realisieren.

3.3.2.1 Sukzessive Modifikation von Poly- α -L-Lysin

Poly- α -L-Lysin (PLL) ist ein Homopolymer, welches aus der proteinogenen Aminosäure Lysin aufgebaut ist, und demzufolge eine sehr hohe Dichte an positiven Ladungen besitzt. Bei der Polymerisation entstehen Amidverbindungen zwischen den α -Carboxygruppen und den α -Aminen der einzelnen Lysine. Somit können Polymere entstehen, welche Molekulargewichte von wenigen Dalton bis hin zu mehreren Kilodalton besitzen. PLL-Moleküle sind wasserlöslich und biologisch abbaubar und zeichnen sich überdies durch ihre biologisch kompatiblen Eigenschaften aus [259]. Sie werden häufig in der Zellbiologie dazu verwendet um Oberflächen von Zellkulturgefäßen zu beschichten, um somit die Adhäsion von eukaryotischen Zellen zu ermöglichen.

Für die Konstruktion von polymeren Oberflächenbeschichtungen, welche für die elektrostatische Adsorption von kationischen antimikrobiellen Peptiden in Kombination mit einer sukzessiven Freisetzung in das umgebende Medium geeignet sind, wurden unterschiedliche Konstrukte auf der Oberfläche generiert. Hierfür wurde Poly- α -L-Lysin verwendet, dessen Komplexität und elektrostatische Eigenschaften durch sukzessive chemische Modifikationen variiert wurden. Um möglichst stabile Oberflächen mit einer hohen Ladungsdichte zu erreichen wurden lediglich hoch molekulare Substanzen mit Molekulargewichten >300 kDa verwendet. Als feste Oberfläche wurden Glasobjektträger verwendet. Die Oberflächen wurden mit einem Aufbau versehen, welcher die Separation in 16 individuelle Kammern gewährleistete und somit die Handhabung verschiedener flüssiger Proben auf einer Oberfläche ermöglichte. Im Anschluss daran wurden die Oberflächen mehrmals mit PBS-Puffer äquilibriert und darauf folgend mit 100 μ l einer 0,5 %igen PLL-Lösung in PBS-Puffer für 2 h bei Raumtemperatur und ohne Schütteln inkubiert. Danach wurde überschüssiges PLL durch fünfmaliges Waschen mit jeweils 200 μ l PBS-Puffer entfernt. Nachfolgend wurden die Aminogruppen des adsorptiv gebundenen PLLs mittels chemischer Derivatisierung in Carboxygruppen überführt. Hierfür wurden die mit PLL beschichteten Oberflächen mit 200 μ l Bicarbonat-Puffer inkubiert, um die Amine der Seitenketten zu deprotonieren. Anschließend wurde jede Oberfläche mit 200 μ l einer gesättigten Bernsteinsäureanhydrid-Lösung in Bicarbonat-Puffer für 20 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Darauf folgend wurde der Flüssigkeitsüberstand entfernt und der Prozess dreimal wiederholt. Anschließend wurden verbliebene Chemikalienrückstände durch viermaliges Waschen mit jeweils 200 μ l Bicarbonat-Puffer entfernt und abschließend die Oberflächen durch dreimaliges inkubieren mit jeweils 200 μ l MES-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurden die auf der Oberfläche befindlichen Carboxygruppen chemisch aktiviert, wozu die Oberflächen mit 100 μ l einer frischen EDC/NHS-Lösung (jeweils 50 mg/ml in MES-Puffer) für 45 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert wurden. Nachfolgend wurden die Inkubationsüberstände entfernt, die Oberflächen zügig mit 200 μ l PBS-Puffer äquilibriert und abschließend erneut zweimal mit jeweils 100 μ l einer 0,5 %igen PLL-Lösung in PBS-Puffer für jeweils 45 min bei Raumtemperatur und kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Abschließend wurden die Oberflächen durch viermaliges Waschen mit 200 μ l PBS-Puffer von verbliebenen Reaktionsrückständen gesäubert und eventuell verbliebene chemisch aktivierte Carboxygruppen durch die viermalige Inkubation in jeweils 200 μ l Bicarbonat-Puffer deaktiviert. Diese gesamten chemischen Derivatisierungen wurden je

nach Anzahl der kovalent aneinander gebundenen PLL-Moleküle wiederholt und somit wurden polymere Oberflächennetzwerke generiert, welche über 1 bis 4 kovalent aneinander gebundene PLL-Schichten verfügten. Darüber hinaus wurden Oberflächen erzeugt, bei welchen die finale Schicht entweder aus PLL bestand oder aber deren Lysinseitenketten mittels Bernsteinsäureanhydrid carboxyliert wurden.

3.3.2.2 Kollagen-Modifikation

Kollagen ist ein natürlich vorkommendes Strukturprotein welches ein hauptsächlich Bestandteil des Bindegewebes von vielzelligen Organismen ist. Kollagen setzt sich aus drei individuellen Peptidketten zusammen, welche jeweils eine Länge von bis zu 3000 Aminosäuren besitzen können und als linksgängige Helices vorliegen. Kollagenfasern besitzen ein weites Anwendungsgebiet, welches neben lebensmitteltechnische auch pharmazeutische Applikationen beinhaltet. Neben seinen strukturellen Eigenschaften zeichnet es sich insbesondere durch seine biologische Kompatibilität aus, weshalb es bei vielen medizinischen Prozessen und Produkten von entscheidender Bedeutung ist und unter anderem auch als extrazelluläre Matrix in der Wundversorgung eingesetzt wird. Aufgrund der Tatsache, dass offene Wunden ein beträchtliches Infektionsrisiko darstellen, sind antimikrobielle Maßnahmen speziell bei der Wundversorgung essenziell. Aus diesem Grund wurden antimikrobielle Peptide dazu verwendet, um Kollagen-basierte Wundauflagen mit desinfizierenden Eigenschaften zu generieren. Da die direkte Interaktion der Wundauflage mit dem umgebenden Gewebe, aufgrund von räumlichen Trennungen nicht immer gegeben ist, wurden Kollagen-Modifikationen durchgeführt, welche eine kontinuierliche Freisetzung des antimikrobiellen Peptids ermöglichen. Hierfür wurde in Analogie zu der Modifikation von planen Glasoberflächen (3.3.2.1) carboxylierte PLL-Netzwerke verwendet, um das antimikrobielle Peptid mittels elektrostatischer Interaktion innerhalb der Kollagenmatrix zu deponieren. Diese wurden kovalent an den in Kollagen natürlich vorkommenden kationischen und anionischen Aminosäuren immobilisiert. Zunächst wurden die Kollagen-basierten sterilen Wundauflagen zerteilt und Stücke identischer Größe und Gewichts in Polypropylen Mikrotiterplatten überführt und anschließend in Bicarbonat-Puffer äquilibriert. Darauf folgend wurden die in Kollagen enthaltenen Lysine mittels Zugabe einer gesättigten Bernsteinsäureanhydrid-Lösung für 20 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln carboxyliert. Die verbliebenen Reaktionskomponenten wurden entfernt und das PLL Netzwerk an der Kollagenoberfläche mittels sukzessiver Modifikation aufgebaut (3.3.2.1).

3.3.2.3 Antimikrobielle Eigenschaften und Wirkstofffreisetzung

Die zuvor generierten Polymernetzwerke (3.3.2.1, 3.3.2.2) wurden dazu verwendet, um antimikrobielle Peptide mittels elektrostatischer Interaktion auf den Oberflächen zu deponieren. Zu diesem Zweck wurde das antimikrobielle Peptid Protamin in einer Konzentration von 120 μM in PBS-Puffer verdünnt und anschließend jeweils 200 μl für 24 h auf den PLL-modifizierten Oberflächen inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Oberflächen verwendet, welche über identische Modifikationen verfügten, aber nicht mit antimikrobiellem Peptid inkubiert wurden. An die Beladung mit Protamin anschließend, wurde das Elutionsverhalten des antimikrobiellen Peptids von den Oberflächen analysiert. Dafür wurden die Oberflächen zunächst durch dreimaliges Waschen mit jeweils 300 μl PBS-Puffer von Protaminrückständen gesäubert und anschließend mit 200 μl MHB-Medium überschichtet. Die Oberflächen wurden für 10 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 190 μl des Überstands entfernt, welcher in sterile Kavitäten einer Mikrotiterplatte (PP) transferiert wurde. Die verbliebenen 10 μl wurden qualitativ entfernt und die Oberflächen erneut mit 200 μl MHB-Medium überschichtet. Insgesamt wurden 14 Wiederholungen dieses Vorgangs durchgeführt.

Zur qualitativen Evaluierung der in den Überständen enthaltenen Protaminkonzentrationen, wurden diese auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften gegenüber *S. xylosus* untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Bakterium kultiviert (3.2.1) und anschließend die Inkubationsüberstände mit jeweils 10 μl einer Bakteriensuspension inokuliert, wodurch finale Konzentrationen von 5×10^4 Bakterien/ml entstanden. Als Sterilitätskontrolle wurde frisches MHB-Medium verwendet, wohingegen frisches MHB-Medium mit Bakterien aber ohne antimikrobielles Peptid als Wachstumskontrolle verwendet wurde. Als antimikrobielle Wirkstoffkontrolle wurde eine logarithmische Konzentrationsreihe von Protamin in Analogie zu den MIC Tests verwendet (3.2.4). Sämtliche Proben wurden anschließend für 16 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert und danach das bakterielle Wachstum qualitativ mittels photometrischer Messungen evaluiert. Für die vergleichende Auswertung wurde der Median der letzten Waschfraktionen errechnet, bei welchen das bakterielle Wachstum vollständig inhibiert wurde.

Für die Regeneration der verwendeten Oberflächen wurden diese mehrmals mit deion. Wasser und PBS-Puffer über mehrere Tage inkubiert, um sämtliche Rückstände von antimikrobiellen Peptiden aus den Polymernetzwerken zu entfernen. Dies wurde wie oben beschrieben qualitativ anhand der antimikrobiellen Eigenschaften der Inkubationsüberstände verifiziert. Nachdem sämtliches antimikrobielles Peptid von den Oberflächen entfernt wurde, wurden diese erneut mit Protamin beladen und der gesamte Vorgang wiederholt, um die Möglichkeit einer Wiederverwendung zu untersuchen.

Alternativ dazu wurde der Einfluss des direkten Kontakts zwischen Bakterien und den Polymernetzwerken untersucht. Die modifizierten und mit Peptid beladenen Oberflächen wurden ebenfalls mehrmals mit MHB-Medium inkubiert. Nach jeweils unterschiedlichen Waschfraktionen wurden die Oberflächen mit 200 μl einer Bakteriensuspension, welche eine Konzentration von 5×10^4 Bakterien/ml besaß, überschichtet und identisch zu den anderen Proben inkubiert und analysiert.

3.3.2.4 Antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften von in Polymernetzwerken kovalent immobilisierten Peptiden

Neben der kontinuierlichen Wirkstofffreisetzung, wurden die zuvor generierten Polymernetzwerke (3.3.2.1) dazu verwendet, um als Trägermoleküle für kovalent immobilisierte antimikrobielle Peptide zu fungieren. Zu diesem Zweck wurden die carboxylierten PLL-Netzwerke durch viermaliges Waschen in 200 µl MES-Puffer bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln äquilibriert. Im Anschluss daran wurden die in dem Netzwerk enthaltenen Carboxygruppen durch die Zugabe einer EDC/NHS-Lösung (jeweils 50 mg/ml in MES-Puffer) für 60 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln aktiviert. Anschließend wurden die Oberflächen mittels zweimaligen Waschens mit MES-Puffer von verbliebenen Reaktionskomponenten gesäubert und verbliebene Flüssigkeiten entfernt. Darauffolgend wurden die mit EDC/NHS aktivierten Oberflächen für die kovalente Immobilisierung von Peptiden unter Ausbildung einer Amidbindung eingesetzt (3.3.1.2). Abschließend wurden die antimikrobiellen (3.3.1.3) und zytotoxischen (3.3.1.4) Eigenschaften der antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen analysiert.

3.3.3 Relative Quantifizierung von Aminen an der Oberfläche mittels Epicocconone

Die relative Quantifizierung von an der Oberfläche befindlichen Aminen wurde dazu verwendet, um indirekt die Menge von kovalent immobilisierten kationischen antimikrobiellen Peptide zu ermitteln (3.3.1.2, 3.3.2.4). Darüber hinaus wurde diese Methode auch dazu verwendet um die sukzessive Modifikation der PLL-Netzwerke (3.3.2.1) zu analysieren. Die relative Quantifizierung beruht auf der selektiven Reaktion des Fluoreszenzfarbstoffs Epicocconone mit freien Aminen. Hierbei entsteht eine kovalente Verbindung zwischen Epicocconone und den freien Aminen, wodurch sich der Konjugationszustand des Elektronensystems ändert und als Folge dessen eine Fluoreszenz induziert wird (Anhang B.3). In Abwesenheit von freien Aminen besitzt der Farbstoff keine natürlich auftretende Fluoreszenz, wodurch unspezifische Hintergrundsignale signifikant minimiert werden können [260]. Für die relative Quantifizierung von an der Oberfläche vorhandenen Aminen wurden diese Oberflächen in einer Hybridisierungsstation unter kontinuierlichem Volumenstrom mit PBS-Puffer bei Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde Epicocconone entsprechend den Herstellerangaben verdünnt und unter Verwendung eines kontinuierlichen, periodisch wechselnden Volumenstroms auf den modifizierten Oberflächen für 1 h bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Abschließend wurden die Oberflächen für 15 min mit deion. Wasser gesäubert und verbliebene Flüssigkeitsreste mittels Zentrifugation und einem Stickstoffstrom entfernt. Die relativen Fluoreszenzen wurden mittels Mikroarray-Scanner analysiert. Hierfür wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm und ein zu dem Fluorophor passender Bandpassfilter bei 575 nm verwendet. Die Oberflächen wurden mit 50% Laserintensität und einer PMT Verstärkung von 500 bei einer Auflösung von 10 µM vermessen und die mittlere Fluoreszenzintensität unter Verwendung der Software GenePix Pro 6.1 ermittelt. Die

Fluoreszenzen wurden anschließend gegen eine Referenzprobe normalisiert. Darauf folgend wurden die resultierenden Daten gegen die Peptidkonzentration bei der Immobilisierung aufgetragen und unter Verwendung der Software OriginPro 8.1 G eine asymptotische Ausgleichskurve errechnet.

3.3.4 Quantifizierung von immobilisiertem und fluoreszenzmarkiertem BMAP-27

Zur Kontrolle der Immobilisierungseffizienz und der relativen Menge an immobilisiertem BMAP-27 auf festen Oberflächen, aufgrund kovalenter Immobilisierung, wurde ein fluoreszenzmarkiertes Peptidderivat verwendet. Dieses besaß ein zusätzliches C-terminales Cystein, dessen Seitenkette mit dem Fluorophor Alexa 647 modifiziert wurde. Der quantitative Nachweis der immobilisierten Peptide, wurden in Analogie zu der Quantifizierung von Aminen (3.3.3) durchgeführt, wobei jedoch kein zusätzlicher Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurde und die zu dem verwendeten Fluorophor Alexa 647 korrespondierende Anregungswellenlänge von 635 nm und der dazu korrespondierende Bandpassfilter bei 675 nm verwendet wurde.

3.3.5 Relative Quantifizierung von Argininen an der Oberfläche mittels 9,10-Phenanthrenequinone

Unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs 9,10-Phenanthrenequinone (PHQ) wurden die auf der Oberfläche vorhandenen Arginine quantifiziert und somit indirekt die Menge der immobilisierten antimikrobiellen Peptide ermittelt, welche diese Aminosäure in ihrer Peptidsequenz enthielten. Die chemische Reaktion beruht auf einer Kondensationsreaktion zwischen PHQ und der in Arginin enthaltenen Guanidingruppe, wodurch in einer alkalischen Ethanol-Lösung das fluoreszierende Reaktionsprodukt 2-amino-1H-phenanthro-(9,10-d)-imidazol entsteht (Anhang B.4), welches in die umgebende Lösung abgegeben wird und somit im Inkubationsüberstand detektiert werden kann [261, 262]. Für den quantitativen Nachweis der immobilisierten Peptide, wurden die zuvor modifizierten Oberflächen (3.3.1.2, 3.3.2.4) mit 75 µl einer 68 µM PHQ-Lösung in 70 % Ethanol, welche mit 0,2 M NaOH versetzt war, für 2 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben mit einem identischen Volumen einer 1,2 M HCL-Lösung versetzt und nach einer kurzen Inkubation die Reaktionsüberstände von den Oberflächen entfernt und in eine schwarze Mikrotiterplatte transferiert. Die Fluoreszenz wurde mit einem Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 405 nm analysiert. Die Messdaten wurden um den Wert der Negativkontrolle verringert und mit den Werten einer in Lösung befindlichen Peptidverdünnungsreihe verglichen.

3.3.6 Bakterielle Adhäsion

Elektrostatische Interaktionen zwischen den kationischen antimikrobiellen Peptiden und den anionischen bakteriellen Zellmembranen stellen eine zentrale Komponente bei dem Wirkmechanismus vieler antimikrobieller Peptide dar. Um bakterielle Adhäsionen, welche aufgrund elektrostatischer Interaktionen während den Untersuchungen hinsichtlich der antimikrobiellen Eigenschaften sowohl von Peptid-basierten kovalenten Oberflächenmodifikationen, als auch von PLL-basierten polymeren Netzwerken auftreten könnten, erfassen zu können, wurden sämtliche Oberflächen nach einer direkten Interaktion mit Bakterien mikroskopisch analysiert. Hierfür wurden die Oberflächen mit jeweils 40 µl einer 2-fach konzentrierten SYBR Green I Lösung in Kombination mit 10 mM Propidiumiodid in PBS-Puffer überschichtet und in einer feuchten Kammer bei leichtem Schütteln unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Abschließend wurden die verbliebenen Inkubationsüberstände entfernt und die Oberflächen unter Verwendung eines Deckglases fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Es wurde eine Anregungswellenlänge von 480 nm und eine Emissionswellenlänge von 525 bzw. 620 nm verwendet, um die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe zu detektieren.

4 Ergebnisse

4.1 Gelöste antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide repräsentieren eine heterogene Klasse von Biomolekülen, welche sich durch Ihre inhärente Fähigkeit auszeichnen antimikrobielle Eigenschaften gegenüber einer Vielzahl von Bakterien auszuüben. Insbesondere ist diesbezüglich ihr charakteristischer Wirkmechanismus von ausschlaggebender Bedeutung, welcher in vielen Fällen mit der dreidimensionalen Peptidstruktur in Verbindung gebracht wird. Während die bakterizide Wirkung auf einer direkten Permeabilisierung der bakteriellen Membran, aufgrund einer Interaktion zwischen antimikrobiellen Peptiden und den amphiphilen Regionen der Lipiddoppelschicht beruht, wird die bakterio-statische antimikrobielle Wirkung auf die Inhibierung von essenziellen zellulären Prozessen zurückgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass antimikrobielle Peptide aufgrund ihrer Wirkweise potentielle Anwendung in der Therapie von bakteriellen Infektionen besitzen sind auch ihre zytotoxischen Eigenschaften von Bedeutung.

Aus diesem Grund wurden verschiedene Charakterisierungen der antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide durchgeführt um Rückschlüsse auf deren Wirkmechanismus und potentielle Verwendung als therapeutisches Agens zu folgern. Ferner wurden ihre biophysikalischen Eigenschaften, sowie berechneten dreidimensionalen Konformationen mit den charakteristischen Wirkmechanismen verglichen, um generelle Korrelationen zu identifizieren.

4.1.1 Referenz-Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften

Im Zuge der Charakterisierung der generierten artifiziellen Peptidbibliotheken wurden zu Vergleichszwecken natürlich vorkommende antimikrobielle Peptide hinsichtlich ihrer antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften, sowie ihrer permeabilisierenden Charakteristiken gegenüber der äußeren und inneren Membran von *E. coli* ML-35p analysiert. Ferner wurden bereits bekannte artifizielle Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften analysiert, um deren antimikrobielle und zytotoxische Wirkung mit den hier analysierten Peptiden zu vergleichen. Als natürlich vorkommende antimikrobielle Peptide wurden BMAP-27, Indolicidin, Melittin und Protamin verwendet. Darüber hinaus wurden die Peptide BMAP-27 und Melittin jeweils in zwei separate Peptidsequenzen unterteilt, welche jeweils den N-terminalen, bzw. den C-terminalen Bereich der Peptidsequenz abdeckten. Bei der Analyse der Aktivitäten konnte beobachtet werden, dass sämtliche natürlich vorkommenden Peptide eine generelle antimikrobielle Aktivität gegenüber *E. coli* und *S. xylosus* aufwiesen (Tabelle 4.1). Dies resultierte in minimalen inhibitorischen Konzentrationen zwischen 1 und 8 μM gegenüber *E. coli* sowie 0,5 und 32 μM gegenüber *S. xylosus*. Hinsichtlich dessen zeigte das antimikrobielle Peptid BMAP-27 mit 1 und 2 μM zwei der niedrigste MICs. Lediglich Protamin war mit 0,5 μM durch eine geringere MIC gegenüber *S. xylosus* gekennzeichnet, besaß jedoch mit 8 μM eine deutlich schwächere Inhibierung des bakteriellen Wachstums von *E. coli*. Neben den antimikrobiellen Eigenschaften konnten bei diesen Peptiden jedoch

auch zytotoxische Eigenschaften ermittelt werden, welche zu einer Permeabilisierung der eukaryotischen Zellmembran von U-937 Zellen führte. Bei der quantitativen Analyse der Membran-permeabilisierenden Eigenschaften resultierten die natürlich vorkommenden Peptide in einer 50 %igen Permeabilisierung der Membran bei Konzentrationen von 1,4 bis >64 μM . Zu beobachten war, dass die Peptide BMAP-27 und Melittin mit 1,4 und 1,8 μM Aktivitäten bei relativ geringen Peptidkonzentrationen besaßen, wohingegen Protamin selbst bei einer Konzentration von >64 μM keine Permeabilisierung der eukaryotischen Membran induzierte (Abbildung 4.1 A). Alternativ zu der direkten Permeabilisierung, welche innerhalb einer Inkubationszeit von 2 h hervorgerufen wurde, wurden auch die wachstumsinhibierenden Eigenschaften der Peptide gegenüber den eukaryotischen Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen untersucht. Dabei wurde erkenntlich, dass die Peptide BMAP-27 und Melittin mit 4 und 2 μM MTCs in vergleichbaren Größenordnungen zu ihren jeweiligen LD_{50} -Werten aufwiesen. Das antimikrobielle Peptid Protamin, welches innerhalb der ersten 2 h keine direkte Schädigung der Membran verursachte, führte jedoch bei einer Konzentration von 16 μM zu einer vollständigen Inhibierung des eukaryotischen Wachstums (Abbildung 4.1 B). Im Vergleich dazu waren die zytotoxischen Eigenschaften des Peptids Indolicidin bis zu einer Konzentration von 64 μM nicht nachweisbar, was in einem LD_{50} -Wert und einer MTC von >64 μM resultierte. Als Konsequenz dieser zytotoxischen Eigenschaften der natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptide ergaben die korrespondierenden, berechneten therapeutischen Kennzahlen (ϑ) Werte von 0,2 bis >16 für *E. coli* und 0,7 bis >128 für *S. xylosus*. Da bis zu einer Konzentration von 64 μM keine zytotoxischen oder zytostatischen Eigenschaften des antimikrobiellen Peptids Indolicidin erkennbar waren, ergaben sich daraus mit >16 und >2 die beiden höchsten therapeutischen Kennzahlen innerhalb der Testreihe. Lediglich das antimikrobielle Peptid Protamin verfügte mit Kennzahlen von 8 und >128 über größere Werte, welche jedoch aufgrund der ausgeprägten zytostatischen Aktivitäten separat evaluiert werden mussten.

Neben den Peptiden BMAP-27 und Melittin wurden darüber hinaus auch deren N-terminale und C-terminale Regionen auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften hin untersucht. In diesem Kontext wurde erkennbar, dass der N-terminale Bereich von BMAP-27 mit 2 und 1 μM ähnliche MICs im Vergleich zu dem Ausgangspeptid besaß, jedoch mit einem LD_{50} -Wert von 20 μM und einer MTC von 32 μM deutlich reduzierte zytotoxische Eigenschaften erkennen ließ, was in therapeutischen Kennzahlen von 10 und 32 resultierte. Dies stellte eine deutliche Steigerung im Vergleich zu dem Ausgangspeptid dar. Im Vergleich dazu zeigte der C-terminale Bereich von BMAP-27 weder antimikrobielle noch zytotoxische Eigenschaften. Analog dazu besaßen weder der N-terminale, noch der C-terminale Bereich von Melittin antimikrobielle oder zytotoxische Eigenschaften.

Tabelle 4.1: Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften von natürlich vorkommenden Referenz-Peptiden. Die Daten sind eine repräsentative Zusammenfassung aus konzentrationsabhängigen Testreihen (n=4).

Peptid	Sequenz	Eigenschaften			MIC [μ M]		Zytotoxi- zität [μ M]		Therapeutische Kennzahl (θ)	
		H	μ	Z	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>	LD ₅₀	MTK	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>
BMAP-27	GRFKRFRKFKKLFKFLSPVIPLHLHG	0,380	0,456	10	1	2	1,8	4,0	1,8	0,9
BMAP-27/1	GRFKRFRKFKKLF	0,063	0,707	8	2	1	20	32	10	32
BMAP-27/2	KKLSPVIPLHLHG	0,721	0,217	2	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
Protamin	MPRRRRSSSRPVRRRRRPVSRRRRRRGRRR	-0,454	0,086	20	8	0,5	>64	16	(>8)	(>128)
Indolicidin	ILPWKWPWPWRR	1,069	0,190	3	4	32	>64	>64	>16	>2
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	0,511	0,394	5	8	2	1,4	2,0	0,2	0,7
Melittin/1	GIGAVLKVLTTGL	0,706	0,517	1	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
Melittin/2	PALISWIKRKRQQ	0,315	0,278	4	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
KL-Helix	LKLLKLLKLLKLL	0,624	0,836	6	4	2	7,0	8,0	1,8	3,5
Bac2a	RLARIVVIRVAR	0,462	0,255	4	8	16	>64	>64	>8	>4
P7	RLARIVPIRVAR	0,420	0,251	4	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
Tet127	KRWKWWRR	0,443	0,949	5	4	4	21	32	5,3	5,3

Neben den natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptiden und ihren N- und C-terminalen Bereichen wurden bereits bekannte artifizielle Peptide hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivitäten untersucht. Das Peptid KL-Helix repräsentierte hierbei ein Peptid, welches über eine optimierte amphipathische α -helikale Sekundärstruktur verfügte, was anhand eines erhöhten Hydrophobizitätsmoments ersichtlich wurde. Dieses Peptid besaß antimikrobielle Eigenschaften bei 4 und 2 μ M, sowie zytotoxische Eigenschaften mit einem LD₅₀-Wert von 7 μ M und einer MTC von 8 μ M. Basierend auf diesen Werten ergab die Berechnung der therapeutischen Kennzahlen die Werte 1,8 und 3,5. Als weitere, bereits bekannte und untersuchte, artifizielle Peptide wurden die Peptide Bac2a, P7 und Tet127 hinsichtlich ihres Aktivitätsspektrums analysiert. In diesem Zusammenhang konnten bei dem Peptid P7 weder antimikrobielle noch zytotoxische Eigenschaften nachgewiesen werden, wohingegen Bac2a und Tet127 das bakterielle Wachstum von *E. coli* bei Konzentrationen von 8 bzw. 4 μ M und von *S. xylosus* bei Konzentrationen von 16 bzw. 4 μ M vollständig inhibierten. Während bei der Analyse von Bac2a keine zytotoxischen Eigenschaften detektiert werden konnten, resultierte eine Konzentration von 21 μ M des Peptids Tet127 in einer 50 %igen Permeabilisierung der eukaryotischen Zellmembran. Darüber hinaus wurde das Wachstum der eukaryotischen Zellen bei einer Peptidkonzentration von 32 μ M vollständig inhibiert. Dies führte zu therapeutischen Kennzahlen von >8 und >4 für Bac2a, bzw. von 5,3 für Tet127 gegenüber beiden Mikroorganismen.

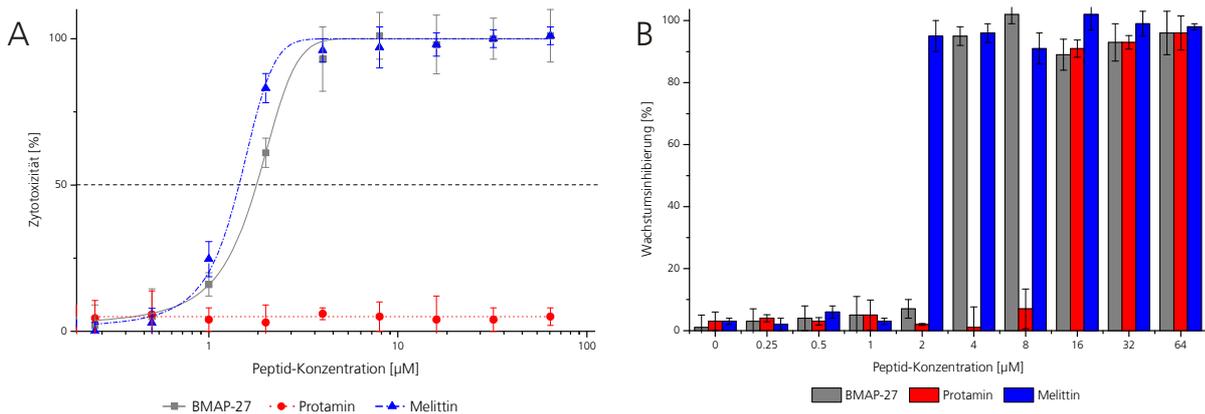


Abbildung 4.1: Detaillierte Darstellung der direkten zytotoxischen und zytostatischen Aktivität von Referenz-Peptiden gegenüber U-937 Zellen. (A) Dargestellt sind die konzentrationsabhängigen, direkten zytotoxischen Eigenschaften von drei ausgewählten Referenz-Peptiden gegenüber U-937 Zellen, deren Zellmembran aufgrund der Aktivität permeabilisiert wurde (n=4). Für den Vergleich verschiedener antimikrobieller Peptide wurden jeweils die Peptidkonzentrationen errechnet, bei welchen eine halbmaximale Signalintensität erreicht wurde, was in der Grafik anhand der gestrichelten Linie dargestellt ist. Während Melittin und BMAP-27 eine 50 %ige Permeabilisierung bei Konzentrationen von 1,4 bzw. 1,8 µM aufwiesen, ließen sich keine Membran-permeabilisierenden Eigenschaften durch die Interaktion von U-937 Zellen und dem antimikrobiellen Peptid Protamin feststellen. (B) Dargestellt sind die konzentrationsabhängigen Inhibierungen des Wachstums von U-937 Zellen nach einer Inkubation von 96 h mit drei ausgewählten Referenz-Peptiden (n=4). Für den Vergleich verschiedener antimikrobieller Peptide wurde jeweils die geringste Peptidkonzentration ermittelt, bei welcher das Wachstum der U-937 Zellen vollständig inhibiert wurde. Die hier exemplarisch dargestellten antimikrobiellen Peptide besaßen unterschiedliche minimale toxische Konzentrationen. Während Melittin das Wachstum bei einer Konzentration von 2 µM vollständig inhibierte, konnte dieser Effekt erst bei einer BMAP-27-Konzentration von 4 µM und einer Protamin-Konzentration von 16 µM beobachtet werden.

Zur besseren Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften der analysierten Peptide wurden ihre Membran-permeabilisierenden Eigenschaften genauer untersucht, um Rückschlüsse auf die verschiedenen Interaktionsmechanismen der antimikrobiellen Peptide mit den bakteriellen Membranen zu erhalten. Die generellen Membran-permeabilisierenden Eigenschaften wurden unter Verwendung von durchflusszytometrischen Messungen in Kombination mit einer Lebend-Tot Färbung evaluiert und unter Zuhilfenahme eines internen Partikel-basierten Kalibrierungssystems quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten diesbezüglich, dass einige Peptide ausgeprägte permeabilisierende Eigenschaften bei geringen Peptidkonzentrationen aufwiesen (Tabelle 4.2). Zu diesen Peptiden gehörten BMAP-27, Melittin und KL-Helix, bei welchen bereits bei einer Konzentration von 5 µM eine signifikante Permeabilisierung der bakteriellen Membran bei mindestens 80% der analysierten Bakterien zu verzeichnen war. Dieses Verhalten war gegenüber beiden Mikroorganismen identisch, wobei jedoch eine Melittin-Konzentration von 25 µM nötig war, um mindestens 80 % der *E. coli* Bakterien zu permeabilisieren. In Analogie zu den MICs verfügte der N-terminale Bereich von BMAP-27 über eine leicht reduzierte Aktivität im Vergleich zu dem Ausgangspeptid, was in einer effektiven permeabilisierenden Konzentration von 25 µM für beide Mikroorganismen resultiert, wohingegen durch die Interaktion mit dem C-terminale Bereich von BMAP-27 keine Permeabilisierung hervorgerufen werden konnte. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei der Analyse der N- und C-terminalen Fragmente von Melittin, welche ebenfalls über keine permeabilisierenden Eigenschaften verfügten, identifiziert werden. Während das antimikrobielle Peptid Indolicidin die bakterielle Membran von *S. xylosus* bei einer Konzentration von 50 µM permeabilisierte, konnte gegenüber *E. coli* keine Aktivität ermittelt werden. Diese Beobachtung konnte ebenfalls für das antimikrobielle Peptid Protamin und P7 festgestellt werden, deren antimikrobielle Aktivität unter den gegebenen Bedingungen nicht nachweisbar war. Im Gegensatz dazu waren das artifizielle Peptid Bac2a

durch permeabilisierende Eigenschaften bei einer Konzentration von 50 μM und das Peptid Tet127 bei einer Konzentration von 25 μM gegenüber beiden Mikroorganismen gekennzeichnet.

Neben den generellen permeabilisierenden Eigenschaften der untersuchten antimikrobiellen Peptide gegenüber dem grampositiven und gramnegativen Testbakterium, wurden die kinetischen Parameter für die Permeabilisierung der äußeren und inneren Zellmembran des gramnegativen Bakteriums *E. coli* genauer analysiert. Zu diesem Zweck wurde das Bakterium *E. coli* ML-35p verwendet, welches konstitutiv eine zytoplasmatische β -Galactosidase und eine Plasmid-kodierte, periplasmatische β -Lactamase exprimiert. Aufgrund der Tatsache, dass in diesem Bakterium darüber hinaus ein Gendefekt vorliegt, welcher in einer fehlenden Lactose-Permease resultiert und das Bakterium somit nicht in der Lage ist Lactose oder entsprechende Derivate ins Zellinnere zu transportieren, können die enzymatischen Aktivitäten beider Enzyme indirekt dazu verwendet werden um die zeitlich abhängige Permeabilisierung der individuellen Membranen zu detektieren. Zu diesem Zweck wurden zwei chromogene Substanzen verwendet. Während Nitrocefin, welches ein Substrat der β -Lactamase ist, die äußere, intakte Membran nicht durchdringen kann, resultiert das Fehlen der Lactose-Permease in einem Ausschluss von ONPG, welches ein Substrat der β -Galactosidase ist. Aufgrund einer Permeabilisierung der jeweiligen Membran können die zuvor vom Zellinneren ausgeschlossenen Substrate und die entsprechenden Enzyme interagieren, wodurch eine enzymatische Katalyse initiiert wird, welche die Veränderung der spektroskopischen Eigenschaften zur Folge hat. Zu Vergleichszwecken wurden die zeitlich abhängigen Daten gegen eine Polymyxin B Probe normalisiert und die Zeitpunkte errechnet, bei welchen eine halbmaximale Signalintensität detektiert werden konnte.

Der detaillierte Verlauf der äußeren und inneren Membranpermeabilisierung durch die Interaktion mit Melittin offenbarte eine sigmoidale Signalentwicklung über die Zeit, welche eine starke Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration erkennen ließ (Abbildung 4.2). Während eine 50 %ige Permeabilisierung der äußeren Membran bei einer Peptidkonzentration von 32 μM in weniger als einer Minute stattfand, verlängert sich die Zeit bei einer Konzentration von 4 μM auf 14 Minuten. Bei der Permeabilisierung der inneren Membran wurde ein ähnliches Verhalten erkennbar, welches jedoch im Vergleich zur äußeren Membran zwischen 3 und 7 Minuten verzögert war (Tabelle 4.2). So ergab eine Konzentration von 32 μM eine 50 %ige Permeabilisierung nach 6 Minuten, wohingegen 18 Minuten nötigen waren, um eine äquivalente Permeabilisierung durch eine 4 μM Melittin-Konzentration zu erreichen.

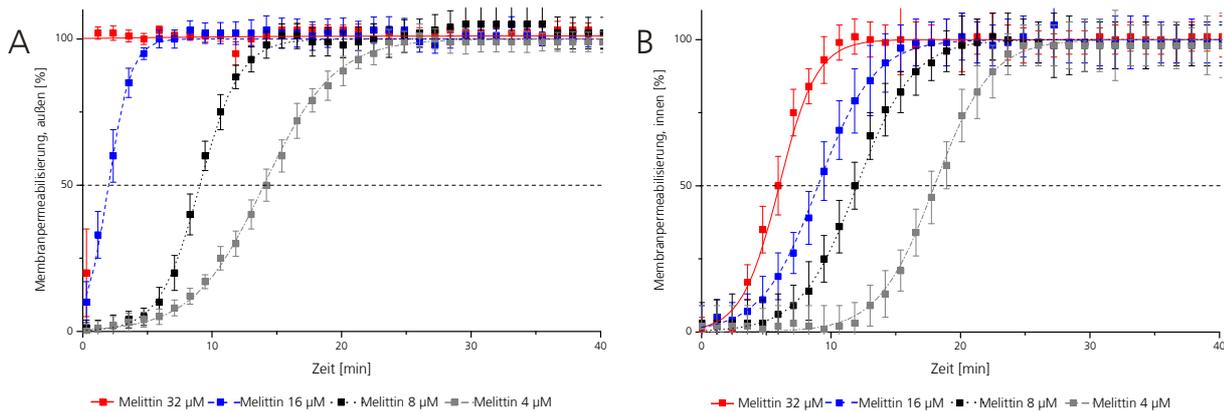


Abbildung 4.2: Detaillierte Darstellung der zeitlichen Permeabilisierung der äußeren und inneren Zellmembran von *E. coli* ML-35p durch verschiedene Konzentrationen des antimikrobiellen Peptids Melittin. (A) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der äußeren Membranpermeabilisierung von *E. coli* ML-35p durch verschiedene Konzentrationen des antimikrobiellen Peptids Melittin, welcher unter Verwendung der periplasmatischen β -Lactamase und dem dazu korrespondierenden Substrat Nitrocefin ermittelt wurde ($n=4$). Für den Vergleich verschiedener antimikrobieller Peptide wurden jeweils die Zeitpunkte errechnet, bei welchen eine halbmaximale Signalintensität detektiert werden konnte, was in der Grafik anhand der gestrichelten Linie dargestellt ist. Melittin verfügte bei allen untersuchten Konzentrationen über eine halbmaximale Permeabilisierung der äußeren Zellmembran in unter 15 min. Während bei einer 32 μM Peptidkonzentration die Permeabilisierung in weniger als einer Minute stattfand, führte eine 4 μM Konzentration erst nach 14 min zu einer 50 %igen Permeabilisierung. (B) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der inneren Membranpermeabilisierung von *E. coli* ML-35p durch verschiedene Konzentrationen des antimikrobiellen Peptids Melittin, welcher unter Verwendung der zytoplasmatischen β -Galactosidase und dem dazu korrespondierenden Substrat ONPG ermittelt wurde ($n=4$). Für den Vergleich von einzelnen Peptiden wurden ebenfalls die Zeitpunkte errechnet, bei welchen eine halbmaximale Signalintensität festgestellt werden konnte. Die Permeabilisierung der inneren Membran war im Vergleich zu der äußeren Membran zeitlich verzögert, wodurch z. B. bei einer Peptidkonzentration von 32 μM erst nach 6 min eine 50 %ige Permeabilisierung erreicht wurde.

Bei den verwendeten Referenz-Peptiden BMAP-27, KL-Helix und Tet127 konnten ähnliche Ergebnisse dokumentiert werden. Hierbei fand eine Permeabilisierung der äußeren und inneren Bakterienmembran ebenfalls in weniger als 20 min statt (Tabelle 4.2). Ebenso zeigte die N-terminale Region von BMAP-27 permeabilisierende Eigenschaften, welche jedoch im Vergleich zum Ausgangspeptid mit einer leichten Verzögerung auftraten. Das Peptid Bac2a wies im Vergleich zu den anderen Referenz-Peptiden eine deutlich reduzierte Kinetik auf, welche lediglich bei einer Konzentration von 32 μM nachweisbar war. In Analogie zu den generellen Membran-permeabilisierenden Eigenschaften, welche mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden, besaßen die Peptide P7, Indolicidin, die C-terminale Region von BMAP-27 sowie die N- und C-terminale Region von Melittin keine permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber der äußeren oder inneren Bakterienmembran von *E. coli* ML-35p. Lediglich das antimikrobielle Peptid Protamin wich von dieser Tendenz ab. Obwohl während der durchflusszytometrischen Analysen keine Aktivität gegenüber *E. coli* festgestellt werden konnte, besaß es starke Aktivitäten gegenüber der äußeren Bakterienmembran von *E. coli* ML-35p, was zu einer signifikanten Reduktion der Membranintegrität in unter einer Minute, bei sämtlichen getesteten Konzentrationen führte. Jedoch konnte auch bei längerer Inkubationszeit keine Beeinträchtigung der Permeabilität der inneren Bakterienmembran festgestellt werden, was einen maßgeblichen Unterschied zu den anderen untersuchten Peptiden darstellte.

Tabelle 4.2: Membran-permeabilisierende Eigenschaften von antimikrobiellen Referenz-Peptiden. Die Daten sind eine Zusammenfassung von Konzentrations- und zeitabhängigen Testreihen (n=4). Dargestellt sind die generellen permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber *E. coli* und *S. xyloso*, welche mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden. Angegeben ist die geringste Konzentration (50 μM / 25 μM / 5 μM) bei welcher eine Permeabilisierung von mehr als 80% der Bakterien zu beobachten war. Darüber hinaus ist die zeitabhängige Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von *E. coli* ML-35p angegeben. Hierbei repräsentieren die angegebenen Zeitpunkte eine 50 %ige Permeabilisierung.

Peptid	Permeabilisierung [μM]		Permeabilisierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]				Permeabilisierung der inneren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]			
	<i>E. coli</i>	<i>S. xyloso</i>	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM
BMAP-27	5	5	<1	<1	<1	<1	16	9	7	5
BMAP-27/1	25	25	5	<1	<1	<1	23	12	11	10
BMAP-27/2	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
Protamin	>50	>50	<1	<1	<1	<1	>90	>90	>90	>90
Indolicidin	>50	50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
Melittin	25	5	14	9	2	<1	18	12	9	6
Melittin/1	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
Melittin/2	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
KL-Helix	5	5	2	<1	<1	<1	14	11	9	6
Bac2a	50	50	>90	>90	>90	19	>90	>90	>90	59
P7	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
Tet127	25	25	11	9	3	<1	19	12	7	5

In diesem Zusammenhang wurden die Membran-permeabilisierenden Eigenschaften des antimikrobiellen Peptids Protamin mittels durchflusszytometrischer Messungen und Fluoreszenzmikroskopie genauer analysiert und mit denen von Melittin verglichen. Es zeigte sich, dass eine Interaktion der *E. coli* Bakterien mit dem antimikrobiellen Peptid Melittin zu einer signifikanten Verschiebung der Fluoreszenzeigenschaften der Lebend-Tot Färbung führte, welche bereits bei einer Konzentration von 8 μM fast vollständig war (Abbildung 4.3 A). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Gesamtzahl der Bakterien in den einzelnen Proben bei Konzentrationen oberhalb der effektiven Membran-permeabilisierenden Konzentration von 8 μM im Vergleich zu der eingesetzten Startkonzentration leicht reduziert war. Bei geringeren Peptidkonzentrationen war hingegen zu beobachten, dass die gemessene Bakterienkonzentration oberhalb der Startkonzentration lag. Des Weiteren ließen sämtliche analysierten Proben keinen signifikanten Anteil an Ereignissen erkennen, welche weder der lebenden noch der toten Bakterienpopulation zugeordnet werden konnten. Im Vergleich dazu resultierte die Interaktion des antimikrobiellen Peptids Protamin mit *E. coli* in einem deutlich anderen Verhalten. Ab einer Peptidkonzentration von 3 μM konnte, im Vergleich zur Negativkontrolle, bereits eine signifikante Reduktion der Bakterienkonzentration mit intakten Membranen sowie der Gesamtkonzentration ermittelt werden (Abbildung 4.3 B). Jedoch wiesen sämtliche Proben keine Erhöhung der Bakterienkonzentration mit beschädigten Membranen auf, wie es bei den mit Melittin behandelten Bakterien zu beobachten war. Stattdessen resultierte die Erhöhung der Protamin-Konzentration in einer stetig sinkenden Konzentration von Bakterien mit intakten Membranen sowie der Gesamtkonzentration. Abweichend von den Ergebnissen bezüglich Melittin ergab jedoch eine Erhöhung der Peptidkonzentration eine Erhöhung der Ereignisse, welche weder als Bakterien mit intakten noch beschädigten Membranen identifiziert werden konnten, was ab einer Konzentration von 60 μM darin resultierte, dass die Menge der unbekannteren Ereignisse der Menge der Gesamt Ereignisse entsprach. Insgesamt wurde somit bei einer Protamin Konzentration von 120 μM eine Reduktion der messbaren

Ereignisse auf $0,3 \times 10^9/\text{ml}$ ersichtlich. Im Vergleich dazu konnte in der Negativkontrolle eine Konzentration von $1,4 \times 10^8$ Ereignisse/ml detektiert werden, was annähernd der Ausgangskonzentration entspricht.

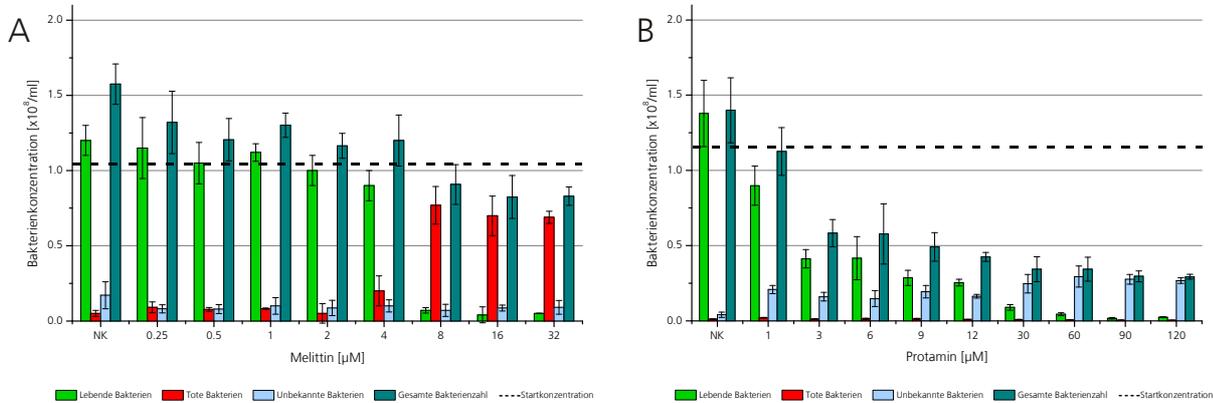


Abbildung 4.3: Detaillierte Darstellung der konzentrationsabhängigen Permeabilisierung von *E. coli* durch die antimikrobiellen Peptide Melittin und Protamin. Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Differenzierung unterschiedlicher Populationen von *E. coli* anhand von Fluoreszenzeigenschaften, welche mittels einer Lebend-Tot Färbung und durchflusszytometrischen Messungen ermittelt wurden ($n=4$). Ferner sind die Gesamtkonzentrationen angegeben, welche unter Verwendung eines Partikel-basierten internen Kalibrierungssystems errechnet wurden. **(A)** Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Permeabilisierung der bakteriellen Membran von *E. coli* aufgrund der Interaktion mit Melittin. Ab einer Konzentration von $8 \mu\text{M}$ wurde eine nahezu vollständige Permeabilisierung der bakteriellen Membran ersichtlich. Hierbei wurden in den einzelnen Proben lediglich bakterielle Konzentrationen unterhalb der Ausgangskonzentration detektiert, wohingegen bei geringeren Peptidkonzentrationen die Bakterienmengen oberhalb der Ausgangskonzentration lagen. Die Menge der gemessenen Ereignisse, welche weder der Bakterienpopulation mit intakten noch defekten Membranen zugeordnet werden konnte war in sämtlichen Proben nahezu identisch und somit unabhängig von der eingesetzten Peptidkonzentration. **(B)** Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Permeabilisierung der bakteriellen Membran von *E. coli* aufgrund der Interaktion mit dem antimikrobiellen Peptid Protamin. Bereits ab einer Peptidkonzentration von $3 \mu\text{M}$ war eine Reduktion der Ereignisse feststellbar, welche aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften als Bakterien mit intakten Membranen identifiziert wurde. Diese Konzentration nahm, ähnlich der Gesamtkonzentration, mit steigenden Peptidkonzentrationen ab, wohingegen die Konzentration der Ereignisse, welche weder als Bakterien mit intakten noch beschädigten Membranen identifiziert wurden, zunahm. Ab einer Peptidkonzentration von $60 \mu\text{M}$ entsprach die Konzentration der unbekannteren Ereignisse der Konzentration der Gesamtzahl, welche deutlich unterhalb der Ausgangskonzentration lag.

Bei genauerer Betrachtung der durchflusszytometrischen Messergebnisse konnten auch veränderte morphologische Eigenschaften und eine stärkere Varianz der Fluoreszenzeigenschaften bei den mit Protamin behandelten Proben im Vergleich zu den mit Melittin behandelten Proben festgestellt werden (Abbildung 4.4). Diesbezüglich wurde ersichtlich, dass die mit Melittin behandelten Bakterien über relativ einheitliche morphologische Eigenschaften verfügten, welche unabhängig von der Membranintegrität waren (Abbildung 4.4 A). Obendrein waren sowohl die bakteriellen Populationen mit signifikanten Membranschädigungen, als auch die Populationen mit intakten Membranen durch definierte Fluoreszenzeigenschaften in einem engen Messbereich gekennzeichnet, welcher durch Vorversuche definiert wurde (Abbildung 4.4 C). Fluoreszenzmikroskopische Analysen verifizierten zudem die mittels Durchflusszytometrie ermittelten Verhältnisse zwischen Bakterien mit intakten und beschädigten Membranen, sowie deren Konzentration anhand von Zellzählungen im Vergleich zu den internen Kalibrierpartikeln (Abbildung 4.4 E). Im Vergleich dazu konnten bei den mit Protamin inkubierten Bakterien deutliche Unterschiede identifiziert werden. Die morphologischen Eigenschaften, welche mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht ermittelt wurden, ließen eine sehr inhomogene Verteilung der Messergebnisse erkennen, die im Vergleich zu den mit Melittin behandelten Proben auch Messergebnisse

umfassten, die deutlich größer und komplexer waren. Dies ließ sich anhand der internen Kalibrierpartikel verifizieren (Abbildung 4.4 B). Diese Tendenz setzte sich auch bei den Fluoreszenzeigenschaften fort, bei welchen keine eindeutige Differenzierung zwischen den Spektren der beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe möglich war (Abbildung 4.4 D). Außerdem konnte hierbei auch beobachtet werden, dass die gemessene Population deutlich inhomogener war als die Bakterien mit intakten und beschädigten Membranen in den mit Melittin behandelten Proben. Aufgrund von fluoreszenzmikroskopischen Analysen konnten die gemessenen Ereignisse als Bakterien identifiziert werden, welche nicht mehr als Individuen sondern vielmehr als komplexe Aggregate vorlagen. Deren Fluoreszenzeigenschaften entsprachen eher dem Spektrum von SYBR Green I, was aber aufgrund der räumlichen Anordnung der Bakterien nicht eindeutig verifiziert werden konnte (Abbildung 4.4 F). Ebenfalls war eine eindeutige Bestimmung der bakteriellen Konzentration aufgrund der Bakterienaggregation nicht möglich. Während der gesamten Versuche war diese Peptid-induzierte Aggregation lediglich bei dem antimikrobiellen Peptid Protamin zu beobachten, wohingegen die antimikrobiellen Eigenschaften und bakteriellen Interaktionen von sämtlichen anderen analysierten Peptiden prinzipiell denen von Melittin entsprachen.

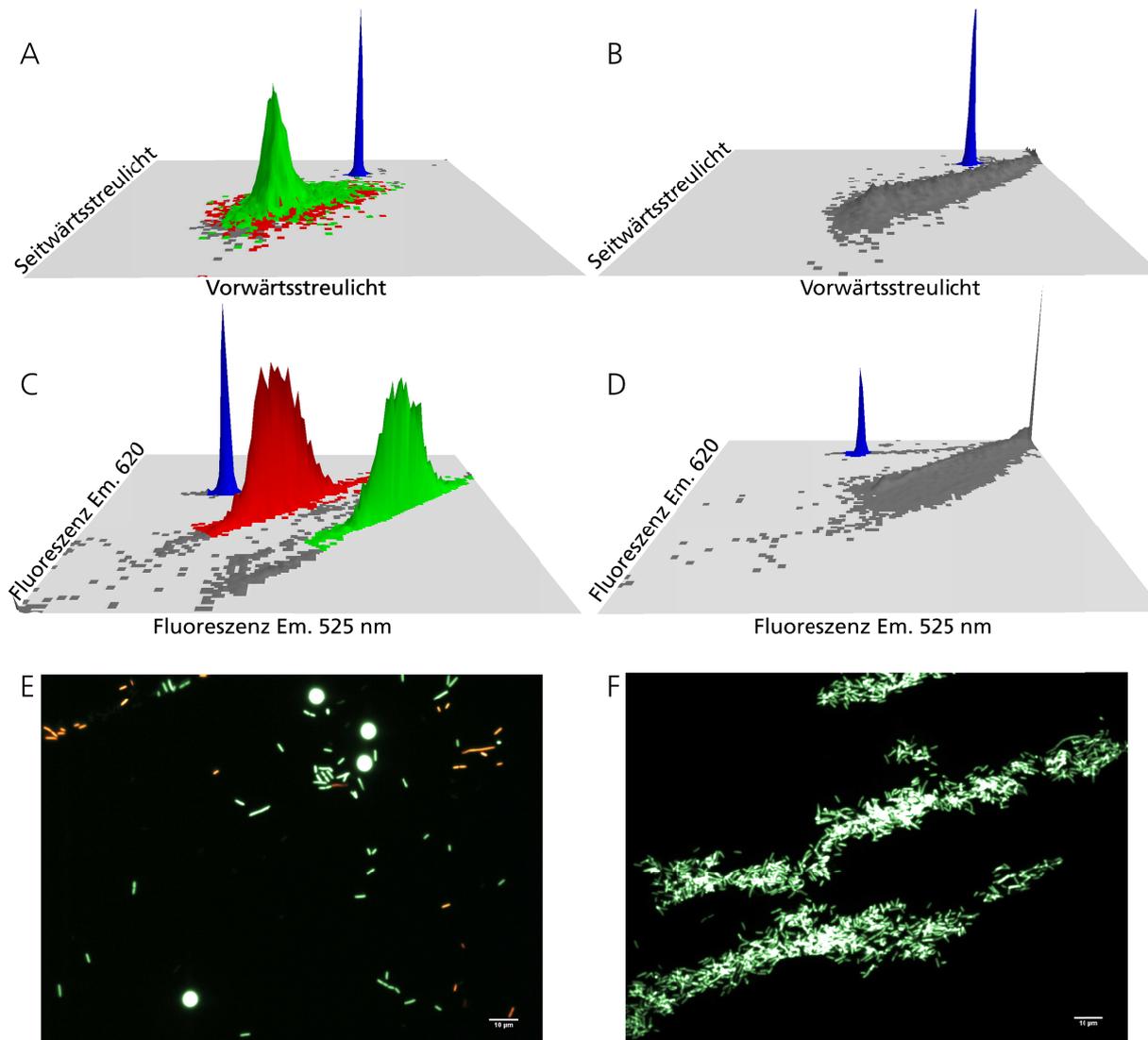


Abbildung 4.4: Detaillierte Darstellung der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Analyse von Bakterien (*E. coli*), welche mit Melittin oder Protamin inkubiert wurden. Dargestellt sind die exemplarischen Ergebnisse einer mit 6 μM Melittin (A, C, E), sowie einer mit 30 μM Protamin inkubierten Bakterienkultur (B, D, F). Bakterielle Populationen, welche über eine Intakte Membran verfügen sind grün gefärbt, wohingegen Bakterien mit beschädigten Membranen in rot dargestellt sind. In den durchflusszytometrischen Analysen ist die Population der internen Kalibrierpartikel blau dargestellt. Ereignisse, welche nicht eindeutig als Bakterien mit intakten oder beschädigten Membranen identifiziert werden konnten sind grau dargestellt. (A, B) Dargestellt sind die morphologischen Eigenschaften der gemessenen Populationen, welche unter Verwendung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts detektiert wurden. Die Z-Achse des Dotplots repräsentiert die Anzahl der gemessenen Ereignisse. Während die mit Melittin behandelten Bakterien (A) über einheitliche morphologische Merkmale verfügten, wiesen die mit Protamin behandelten Bakterien (B) eine deutlich inhomogener Verteilung auf. (C, D) Dargestellt sind die Fluoreszenzeigenschaften der einzelnen Populationen, welche unter Verwendung verschiedener Fluoreszenzfilter in der durchflusszytometrischen Analyse ermittelt wurden. Die Z-Achse des Dotplots repräsentiert die Anzahl der gemessenen Ereignisse. Bei den mit Melittin inkubierten Bakterien (C) war eine deutliche Trennung zwischen den bakteriellen Populationen mit intakten (grün) und beschädigten (rot) Membranen zu erkennen. Ferner waren diese durch eine homogene Verteilung gekennzeichnet und konnten von den internen Kalibrierpartikeln (blau) differenziert werden. Die mit Protamin inkubierten Bakterien (D) besaßen hingegen eine deutlich inhomogenere Verteilung als die mit Melittin behandelten Bakterien. Zudem konnten die Fluoreszenzspektren unter Zuhilfenahme der verwendeten Fluoreszenzfilter nicht eindeutig differenziert und somit die Integrität der Bakterienmembran ermittelt werden. (E, F) Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit Melittin (E) und Protamin (F) inkubierten Bakterien, wie sie bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen verwendet wurden. Die Bakterien sind auf den Bildern entsprechend der verwendeten Fluoreszenzfilter als Bakterien mit intakten (grün) oder beschädigten (rot) Membranen dargestellt. Da die abgebildeten Kalibrierpartikel ebenfalls bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm detektiert wurden sind sie ebenfalls grün dargestellt. Die mit Melittin inkubierte Bakterienkultur umfasste neben den internen Kalibrierpartikeln sowohl Bakterien mit intakten als auch Bakterien mit beschädigten Membranen, welche als Individuen mit definierten morphologischen Eigenschaften, wie sie üblicherweise einem *E. coli* Bakterium entsprechen, vorlagen. Im Gegensatz dazu zeigte die mit Protamin inkubierte Bakterienkultur (F) keine Differenzierung zwischen Bakterien mit intakten oder beschädigten Membranen. Darüber hinaus lagen die Bakterien auch nicht als Individuen vor, sondern vielmehr als Aggregate, in welchen man einzelnen Bakterien erkennen, aber nicht quantitativ voneinander differenzieren konnte.

Neben der Analyse der antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften der Peptide, wurden darüber hinaus auch deren biophysikalische und strukturelle Eigenschaften berechnet, um potentielle Struktur motive zu identifizieren, welche im Allgemeinen maßgebliche Beteiligung bei der Ausprägung der charakteristischen Aktivitäten besitzen. Zu diesem Zweck wurden die Gesamthydrophobizitäten der Peptide, deren Hydrophobizitätsmomente, welche eine quantitative Erfassung der amphipathischen Eigenschaften von idealisierten α -helikalen Strukturen darstellen sowie deren dreidimensionale Struktur berechnet.

Bei den Ergebnissen der Referenz-Peptide ergaben sich deutliche Unterschiede hinsichtlich dieser Parameter. Die Peptide BMAP-27, Melittin und KL-Helix ließen anhand ihrer berechneten dreidimensionalen Strukturen einen hohen α -helikalen Anteil erkennen, welcher nahezu die gesamte Peptidsequenz abdeckte und nur kurze Unterbrechungen des Sequenzmotivs aufwies (Abbildung 4.5). Analog dazu umfasste sowohl der N-terminale Bereich von BMAP-27, als auch der C-terminale Bereich von Melittin einen hohen Anteil an α -helikaler Struktur. Ebenso wurde errechnet, dass Protamin über einen hohen Anteil von α -helikalen Strukturen verfügte, welche jedoch lediglich kurze Sequenzabschnitte umfassten und mehrmals durch unstrukturierte Sequenzmotive unterbrochen wurden. Daraus resultierte im Vergleich zu den anderen α -helikalen Peptiden, deren Motiv nahezu die gesamte Peptidsequenz abdeckten, drei voneinander individuelle, kurze helikale Fragmente, welche sich in der Nähe des N- und C-Terminus, sowie im zentralen Bereich der Sequenz befanden. Im Vergleich dazu verfügte der N-terminale Bereich von Melittin lediglich über einen kleinen Bereich mit einer α -helikalen Struktur. Bei den Peptiden Indolicidin, P7, Bac2a sowie dem C-terminale Bereich von BMAP-27 konnten hingegen keine ausgeprägten Sekundärstruktur motive identifiziert werden. Ebenso wurde bei der Analyse von Tet127 ersichtlich, dass die ausgebildete Sekundärstruktur zwar zu einem gewissen Maß einen helikalen Charakter besaß, deren Ganghöhe und Ausrichtung der Aminosäureseitenketten jedoch nicht denen einer klassischen α -Helix entsprach und deshalb als unstrukturierter Bereich klassifiziert wurde.

Die berechneten Hydrophobizitäten sämtlicher Peptide ergaben Werte zwischen 0,3 und 0,75 (Tabelle 4.1). Lediglich Protamin, Indolicidin und der N-terminale Bereich von BMAP-27 wichen von diesem Wertebereich ab. Während Indolicidin mit 1,069 den höchsten Hydrophobizitätswert aufwies, besaß Protamin mit -0,454 den niedrigsten errechneten Hydrophobizitätswert. Der N-terminale Bereich von BMAP-27 ließ hingegen mit 0,063 ebenfalls einen deutlich geringeren Wert als die anderen Peptide erkennen. Ähnlich starke Varianzen konnten bei der Berechnung der Hydrophobizitätsmomente ermittelt werden. Hierbei ergaben sich Werte zwischen 0,086 und 0,949, wobei insbesondere die Peptide Tet127, KL-Helix und der N-terminale Bereich von BMAP-27 mit Werten oberhalb von 0,7 über deutlich ausgeprägtere Hydrophobizitätsmomente verfügten als andere Peptide. Im Vergleich dazu ergaben sich bei Protamin, Indolicidin, dem C-terminale Bereich von BMAP-27, Bac2a und P7 deutlich geringere Hydrophobizitätsmomente, welche sich unterhalb von 0,26 befanden. Ebenso konnten signifikante Unterschiede bei den Nettoladungen der einzelnen Peptide identifiziert werden. Während sämtliche Peptide prinzipiell über eine positive Nettoladung verfügten, variierte jedoch deren Betrag, wodurch Werte zwischen +1 und +20 errechnet wurden. Die meisten Peptide besaßen Nettoladungen zwischen +4 und +10, wobei jedoch die Peptide Protamin, Indolicidin, der C-terminale Bereich von BMAP-27 und der

N-terminale Bereich von Melittin mit Nettoladung von +20, +3, +2 und +1 stark von den durchschnittlichen Werten abweichen.

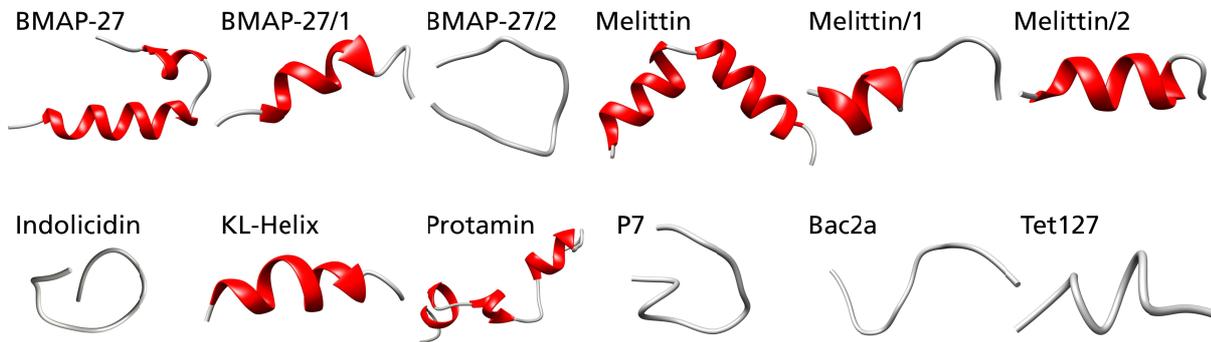


Abbildung 4.5: Darstellung der dreidimensionalen Peptidstruktur von Referenz-Peptiden. Dargestellt sind die berechneten dreidimensionalen Strukturen der antimikrobiellen Referenz-Peptide. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung des „PEP-FOLD web servers“, wobei den Berechnungen eine hydrophile Umgebung zugrunde gelegt wurde. Die Sekundärstrukturmotive sind unter Verwendung von Bändermodellen dargestellt, wobei die rot markierten Bereiche α -helikale Sequenzmotive repräsentieren und Bereiche ohne definierte Sekundärstruktur grau markiert sind. Die in den Sekundärstrukturmotiven integrierten Pfeilspitzen zeigen in die Richtung des C-Terminus. BMAP-27, Melittin, BMAP-27/1, Melittin/2 und KL-Helix umfassten bei den Berechnungen einen hohen Anteil von α -helikalen Strukturen, welche nahezu den gesamten Peptidbereich abdeckten. Es konnten hierbei lediglich wenige unstrukturierte Bereiche identifiziert werden. Ebenso enthielt Protamin ein hohes Maß von α -helikalen Bereichen, welche jedoch durch kurze unstrukturierte Regionen unterbrochen waren, wodurch drei individuelle helikale Bereiche entstanden. Im Vergleich dazu wurde bei Melittin/1 ein deutlich geringerer Anteil von helikalen Strukturen errechnet. Bei den Peptiden BMAP27/2, Indolicidin, P7 und Bac2a konnten keine α -helikalen Bereiche identifiziert werden, wohingegen Tet127 zwar helikalen Charakter aufwies, dieser aufgrund der Ganghöhe und der Ausrichtungen der Aminosäureseitenketten nicht als α -helikal Struktur klassifiziert werden konnte.

4.1.2 Artifizielles Peptiddesign

In vielen Fällen besitzen antimikrobielle Peptide eine hohe Anzahl kationischer und hydrophober Aminosäuren, welche neben den biophysikalischen Eigenschaften auch an der Ausprägung charakteristischer Sekundärstrukturmotive beteiligt sind und oftmals mit den Wirk- und Interaktionsmechanismen dieser Peptide einhergehen. Im Zuge der Entwicklung neuartiger, artifizierlicher, therapeutisch wirksamer Peptide, welche neben antimikrobiellen auch über biologisch kompatible Eigenschaften verfügen und darüber hinaus lediglich eine kurze Minimalsequenz aufweisen, wurden die zehn Modellpeptide M1-M9 generiert, um die prinzipielle Aktivität dieser Peptidklasse zu kategorisieren. Hierbei wurden für das Design dieser Peptide vorrangig Aminosäuren mit kationischen bzw. hydrophoben Seitenketten verwendet, welche in drei definierten Bereichen angeordnet wurden. Während der zentrale Bereich eine Sequenzlänge von fünf Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten umfasste, bestanden die C- und N-terminalen Bereiche aus jeweils drei kationischen Aminosäuren. Es wurden jeweils Kombinationen verschiedener Aminosäuren der gleichen Kategorie verwendet. Die Notwendigkeit dieser drei individuellen Bereiche und ihrer biophysikalischen Eigenschaften wurde anhand einer Substitutionsbibliothek verifiziert, bei welcher komplette Sequenzbereiche ausgetauscht wurden. Die daraus resultierenden Peptidvarianten wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer antimikrobiellen, zytotoxischen und strukturellen Eigenschaften analysiert, um somit den Einfluss einzelner Substitution zu untersuchen. Die Peptide M1a und M1b umfassten sowohl die hydrophobe zentrale Region, als auch die kationischen flankierenden Regionen, unterschieden sich jedoch hinsichtlich ihrer Zusammensetzung der hydrophoben

Aminosäuren. Bei den Ergebnissen konnte festgestellt werden, dass die beiden Peptide über ausgeprägte antimikrobielle Eigenschaften verfügten, was zu MICs von 8 μM gegenüber *E. coli* und 2 bzw. 4 μM gegenüber *S. xylosus* führte (Tabelle 4.3). Zudem konnten während der Experimente weder direkte zytotoxische noch zytostatische Eigenschaften beobachtet werden, wodurch sich ihre antimikrobiellen Eigenschaften maßgeblich in den errechneten therapeutischen Kennzahlen (ϑ) widerspiegeln, deren Berechnung Werte von >8 für *E. coli* und >32 bzw. >16 für *S. xylosus* ergab.

Tabelle 4.3: Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften von artifiziellen Peptiden mit generellem Sequenzmotiv und deren korrespondierender Substitutionsbibliothek. Die Daten sind eine repräsentative Zusammenfassung aus konzentrationsabhängigen Testreihen ($n=4$).

Peptid	Sequenz	Eigenschaften			MIC [μM]		Zytotoxizität [μM]		Therapeutische Kennzahl (ϑ)	
		H	μ	Z	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>	LD ₅₀	MTK	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>
M1a	KRKILILIKRK	0,256	0,290	6	8	2	>64	>64	>8	>32
M1b	KRKIFIFKRRK	0,272	0,293	6	8	4	>64	>64	>8	>16
M2	KRKILILILIL	1,001	0,194	3	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
M3	ILILILIKRK	1,001	0,194	3	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
M4	KRKILILIGSG	0,525	0,249	3	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
M5	GSGILILIKRK	0,525	0,249	3	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
M6	KRKSGSGSKRK	-0,555	0,090	6	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
M7	KRKKRKILILI	0,256	0,301	6	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
M8	KRKILILIEDE	0,342	0,282	0	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
M9	EDEILILIEDE	0,427	0,274	-6	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.

Anhand durchflusszytometrischer Messungen konnten signifikante Membran-permeabilisierende Eigenschaften der Peptide M1a und M1b bei Konzentrationen von 25 μM gegenüber *E. coli* und *S. xylosus* identifiziert werden (Tabelle 4.4). Diese Tendenz wurde ebenfalls durch die Ergebnisse der äußeren und inneren Membranpermeabilisierung von *E. coli* ML-35p verifiziert, bei welchen eine 50 %ige Permeabilisierung der äußeren Membran, je nach verwendeter Konzentration, in einem Zeitbereich zwischen 15 und 41 min nachweisbar war. Während die äußere Membran bei sämtlichen getesteten Peptidkonzentrationen permeabilisiert wurde, konnten Membranschädigungen der inneren Membran lediglich bei den beiden höchsten Konzentrationen von 32 und 16 μM festgestellt werden. Deren Permeabilisierungszeit war im Vergleich zur äußeren Membran um etwa 30 min verzögert, wodurch sich Zeiten zwischen 38 und 59 min ergaben. Im Vergleich dazu wiesen die Peptide M2 und M3, deren N- bzw. C-terminaler kationischer Bereich durch hydrophobe Aminosäuren substituiert wurde, lediglich permeabilisierende Eigenschaften gegenüber der äußeren Membran auf, welche auch nur bei 32 und 16 μM detektierbar und darüber hinaus, im Vergleich zu M1a und M1b, deutlich verzögert waren. Jedoch konnten keine permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber der inneren bakteriellen Membran dokumentiert werden, was ebenfalls mit den nicht nachweisbaren antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften korrelierte (Tabelle 4.3). Weitere Substitutionen der kationischen und hydrophoben Region mittels neutraler oder anionischer Aminosäuren in den Peptiden M3 bis M9 resultierten ebenfalls in dem vollständigen Verlust der antimikrobiellen Eigenschaften, wodurch weder MIC-Werte noch permeabilisierende Eigenschaften innerhalb des analysierten Konzentrationsbereichs ermittelt werden konnten.

Tabelle 4.4: Membran-permeabilisierende Eigenschaften von artifiziellen Peptiden mit generellem Sequenzmotiv und deren korrespondierender Substitutionsbibliothek. Die Daten sind eine Zusammenfassung von Konzentrations- und zeitabhängigen Testreihen (n=4). Dargestellt sind die generellen permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber *E. coli* und *S. xyloso*, welche mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden. Angegeben ist die geringste Konzentration (50 μM / 25 μM / 5 μM) bei welcher eine Permeabilisierung von mehr als 80% der Bakterien zu beobachten war. Darüber hinaus ist die zeitabhängige Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von *E. coli* ML-35p angegeben. Hierbei repräsentieren die angegebenen Zeitpunkte eine 50 %ige Permeabilisierung.

Peptid	Permeabilisierung [μM]		Permeabilisierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]				Permeabilisierung der inneren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]			
	<i>E. coli</i>	<i>S. xyloso</i>	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM
M1a	25	25	39	17	16	16	>90	>90	59	42
M1b	25	25	41	16	15	15	>90	>90	57	38
M2	>50	>50	>90	>90	23	26	>90	>90	>90	>90
M3	>50	>50	>90	>90	42	33	>90	>90	>90	>90
M4	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
M5	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
M6	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
M7	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
M8	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
M9	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90

Bei den berechneten biophysikalischen Eigenschaften der artifiziellen Peptide wurden deutliche Unterschiede erkennbar, welche mit den entsprechenden Substitutionen einhergingen (Tabelle 4.4). Das errechnete Hydrophobizitätsmoment besaß lediglich eine geringe Abhängigkeit von der Substitution einzelner Peptidbereiche, wodurch Werte zwischen 0,194 und 0,301 errechnet wurden. Lediglich das Peptid M6, dessen hydrophobe Region durch neutrale Aminosäuren ersetzt wurde, wies mit 0,090 ein reduziertes Hydrophobizitätsmoment, im Vergleich zu den übrigen Peptiden, auf. Eine deutlich abweichende Tendenz wurde bei den errechneten Gesamthydrophobizitäten ersichtlich. Hierbei wurden Werte zwischen -0,555 und 1,001 errechnet, wobei die Substitution der kationischen mit hydrophoben Aminosäuren in den Peptiden M2 und M3 zu den höchsten Werten und die Substitution der zentralen hydrophoben mit neutralen Aminosäuren in Peptid M6 zu den niedrigsten Werten führte. Sämtliche anderen Peptide besaßen Werte zwischen 0,256 und 0,525. Je nach angewendeter Substitution wurden für die Peptide ebenfalls unterschiedliche Nettoladungen zwischen +6 und +3 errechnet, wobei lediglich die Peptide M8 und M9 geringere Nettoladungen besaßen. Während M8, dessen C-terminale kationische Aminosäuren durch anionische Aminosäuren substituiert wurden, eine neutrale Nettoladung besaß, resultierte die Substitution beider kationischer Regionen durch anionische Aminosäuren in Peptid M9 in einer negativen Nettoladung von -6.

Ähnlich starke Variationen offenbarten sich auch bei den berechneten dreidimensionalen Strukturen, bei welchen sowohl β -Stränge als auch völlig unstrukturierte Konformationen ermittelt wurden (Abbildung 4.6). Prinzipiell umfasste keines der analysierten artifiziellen Peptide α -helikale Strukturen. Bei den Peptiden M1a und M1b wurde ein hoher β -Strang-Anteil in ihrer Sequenz errechnet. Während dieses Motiv in Peptid M1a fast die gesamte Peptidsequenz abdeckte, wurde es in Peptid M1b durch einen kurzen unstrukturierten Bereich in der zentralen Region unterbrochen. Bei beiden Peptiden wurde erkennbar, dass der C-terminale Bereich über eine kurze unstrukturierte Region verfügte. Ähnliche Konformationen konnten bei den Peptiden M5, M7 und M9 beobachtet werden. Diese Strukturen waren

im Vergleich zu denen in den Peptiden M1a und M1b vorliegenden Motiven jedoch deutlich verkürzt und befanden sich lediglich innerhalb der zentralen Peptidregion. Die Substitution der kationischen flankierenden Regionen in M2 und M3 führte zu deutlich veränderten Strukturmotiven. Während in M2 lediglich ein kurzer β -Strang-Anteil im N-terminalen Bereich detektierbar war, konnte dem Peptid M3 kein charakteristisches Sekundärstrukturmotiv zugeordnet werden. Eine zu M2 analoge Struktur zeigte sich auch in Peptid M4, bei welchem ebenfalls der C-terminale kationische Bereich substituiert wurde. Die Peptide M6 und M8, bei welchen der hydrophobe Bereich mittels neutraler, bzw. der C-terminale kationische Bereich mittels anionischer Aminosäuren substituiert wurde, besaßen lediglich unstrukturierte Bereiche.

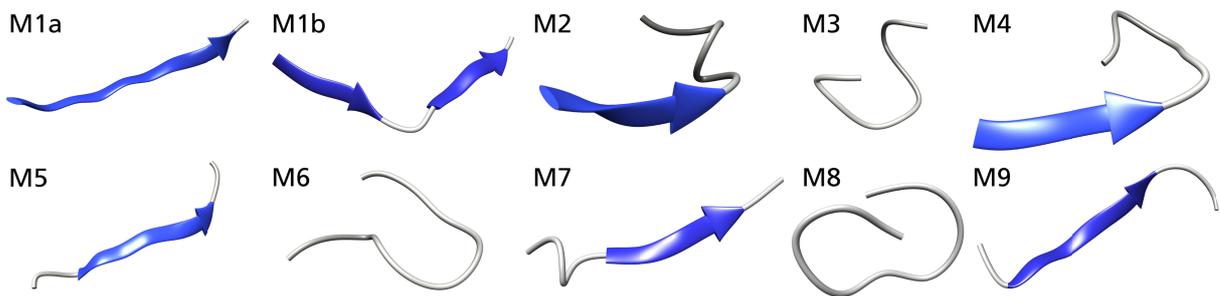


Abbildung 4.6: Darstellung der dreidimensionalen Peptidstruktur von künstlichen Peptiden mit allgemeinem Sequenzmotiv und deren korrespondierender Substitutionsbibliothek. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung des „PEP-FOLD web servers“, wobei den Berechnungen eine hydrophile Umgebung zugrunde gelegt wurde. Die Sekundärstruktur motive sind unter Verwendung von Bändermodellen dargestellt, wobei die blau markierten Sekundärstrukturen β -Strang-Anordnungen repräsentieren und Bereiche ohne definierte Sekundärstruktur grau markiert sind. Die in den Sekundärstrukturmotiven integrierten Pfeilspitzen zeigen in die Richtung des C-Terminus. Die Peptide M1a und M1b besaßen β -Strang-Motive, welche nahezu die gesamte Peptidsequenz umfassten. In Peptid M1b wurde dieses Strukturmotiv lediglich durch einen kurzen unstrukturierten Bereich in der zentralen Region unterbrochen. Ähnliche, wenn jedoch deutlich kürzere Struktur motive besaßen die Peptide M2 und M4, bei welchen lediglich der N-terminale Bereich im Motiv enthalten war, wohingegen der zentrale und C-terminale Bereich über keine charakteristischen Strukturen verfügte. Ebenso konnten in den Peptiden M5, M7 und M9 lediglich deutlich reduzierte Motive detektiert werden, welche diesmal jedoch im zentralen Peptidbereich lokalisiert waren. Im Gegensatz dazu wiesen die Peptide M3, M6 und M8 ausschließlich unstrukturierte Peptidbereiche auf.

4.1.3 Reduktion des N- und C-Terminus

Für die Identifikation der minimalen, notwendigen Sequenzlänge, welche sowohl über antimikrobielle als auch biologisch kompatible Charakteristiken verfügt, wurden Truncation-Bibliotheken generiert und hinsichtlich ihrer biophysikalischen, antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften charakterisiert. Da während der vorangegangenen Charakterisierung der künstlichen Modellpeptide das Peptid M1a sowohl die ausgeprägtesten antimikrobiellen Eigenschaften, als auch nicht nachweisbare zytotoxische Eigenschaften besaß, wurde es als Vorlage für die künstlichen Peptidbibliotheken verwendet. Die Grundstruktur des Peptids, welche aus 5 hydrophoben Aminosäuren in Kombination mit jeweils drei flankierenden kationischen Aminosäuren bestand, wurde durch weitere kationische Aminosäuren am N-Terminus erweitert. Dadurch entstand das Peptid N1, welches abweichend von der Sequenz des Peptids M1a über 5 kationische Aminosäuren am N-Terminus verfügte. Analog dazu wurde das Peptid C1 generiert, dessen C-Terminus durch 5 kationische Aminosäuren charakterisiert war, jedoch ebenfalls über die gleiche Grundstruktur wie das Peptid M1a verfügte. Die in der Bibliothek enthaltenen Peptide wurden

so gewählt, dass eine sukzessive Reduktion der kationischen Aminosäuren, entweder vom N- oder C-Terminus realisiert wurde. Bei den antimikrobiellen Eigenschaften der N-terminalen Truncation-Bibliothek konnte erkannt werden, dass mit abnehmender Sequenzlänge ebenfalls die antimikrobiellen Eigenschaften reduziert wurden (Tabelle 4.5, Abbildung 4.7 A). Bei dem Volllängenpeptid N1 waren Konzentrationen von 8 und 0,5 μM nötig, um das bakterielle Wachstum von *E. coli* bzw. *S. xylosus* vollständig zu inhibieren. Aufgrund der Reduktion auf eine kationische Aminosäure am N-Terminus in Peptid N4, erhöhten sich diese Werte auf 32 und 16 μM . Für die vollständige Inhibierung des bakteriellen Wachstums durch die Zugabe von Peptid N5, welches keine kationischen Aminosäuren am N-Terminus besaß, waren hingegen stark gesteigerte Konzentrationen von 64 μM notwendig. Eine weitere Sequenzverkürzung resultierte darüber hinaus in Peptiden mit weiterhin verringerten antimikrobiellen Eigenschaften, wodurch ab einer Verkürzung der Peptidsequenz auf 7 Aminosäuren keine antimikrobiellen Eigenschaften in dem analysierten Konzentrationsbereich mehr identifiziert werden konnten. Eine ähnliche Tendenz ließ sich auch bei der Reduktion der C-terminalen kationischen Aminosäuren in den Peptiden C1-C8 feststellen (Tabelle 4.5, Abbildung 4.7 A). Diesbezüglich zeigte das Peptid C1, welches analog zu N1 5 kationische Aminosäuren in der C-terminalen Region besaß, antimikrobielle Eigenschaften, welche zu MICs von 16 und 1 μM führten. Durch die sukzessive Reduktion der C-terminalen kationischen Aminosäuren, verringerten sich die antimikrobiellen Eigenschaften, wodurch eine Steigerung der MICs detektiert werden konnte. So besaß das Peptid C4, welches über ein C-terminales Lysin verfügte, MIC-Werte von 32 und 8 μM . Als Folge einer zunehmenden Reduktion der Aminosäuren vom C-Terminus wurden diese MICs weiter erhöht, was dazu führte das keine antimikrobiellen Eigenschaften innerhalb des analysierten Konzentrationsbereichs durch die Interaktion mit Peptid C5 mehr dokumentiert werden konnten.

Tabelle 4.5: Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek. Die Daten sind eine repräsentative Zusammenfassung aus konzentrationsabhängigen Testreihen (n=4).

Peptid	Sequenz	Eigenschaften			MIC [μM]		Zytotoxizität [μM]		Therapeutische Kennzahl (θ)	
		H	μ	Z	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>	LD ₅₀	MTK	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>
N1	KRKRKILILIKRK	0,063	0,294	8	8	0,5	36	32	4,5	72
N2	RKRKILILIKRK	0,151	0,236	7	8	2	>64	>64	>8	>32
M1a	KRKILILIKRK	0,256	0,290	6	8	2	>64	>64	>8	>32
N3	RKILILIKRK	0,381	0,400	5	16	4	>64	>64	>4	>16
N4	KILILIKRK	0,536	0,381	4	32	16	58	>64	1,8	3,6
N5	ILILIKRK	n. a.	n. a.	3	64	64	>64	>64	>1	>1
N6	LILIKRK	n. a.	n. a.	3	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
N7	ILIKRK	n. a.	n. a.	3	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
N8	LIKRK	n. a.	n. a.	3	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
C1	KRKILILIKRKRK	0,063	0,294	8	16	1	61	>64	3,8	61
C2	KRKILILIKRKR	0,151	0,236	7	16	2	>64	>64	>4	>32
M1	KRKILILIKRK	0,256	0,290	6	8	2	>64	>64	>8	>32
C3	KRKILILIKR	0,381	0,400	5	16	8	>64	>64	>4	>8
C4	KRKILILIK	0,536	0,381	4	32	8	>64	>64	>2	>8
C5	KRKILILI	n. a.	n. a.	3	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
C6	KRKILIL	n. a.	n. a.	3	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
C7	KRKILI	n. a.	n. a.	3	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
C8	KRKIL	n. a.	n. a.	3	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.

Bei der grafischen Analyse der sequenzabhängigen Variation der MIC-Werte konnte beobachtet werden, dass die Tendenzen hinsichtlich der N- und C-terminalen Verkürzung Ähnlichkeiten aufwiesen (Abbildung 4.7 A). Es wurde erkennbar, dass eine signifikante Erhöhung der MIC-Werte und der dazu korrespondierenden verringerten antimikrobiellen Aktivitäten, bei einer Reduktion von 2 auf 1 Aminosäure stattfand. Diese Tendenz war sowohl für den N-terminalen als auch den C-terminalen Bereich identisch. Ferner wurde ersichtlich, dass das bakterielle Wachstum von *S. xylosus* im Vergleich zu *E. coli* bei deutlich geringeren Peptidkonzentrationen vollständig inhibiert wurde, die jeweiligen Tendenzen in Abhängigkeit der Peptidverkürzung jedoch identisch waren.

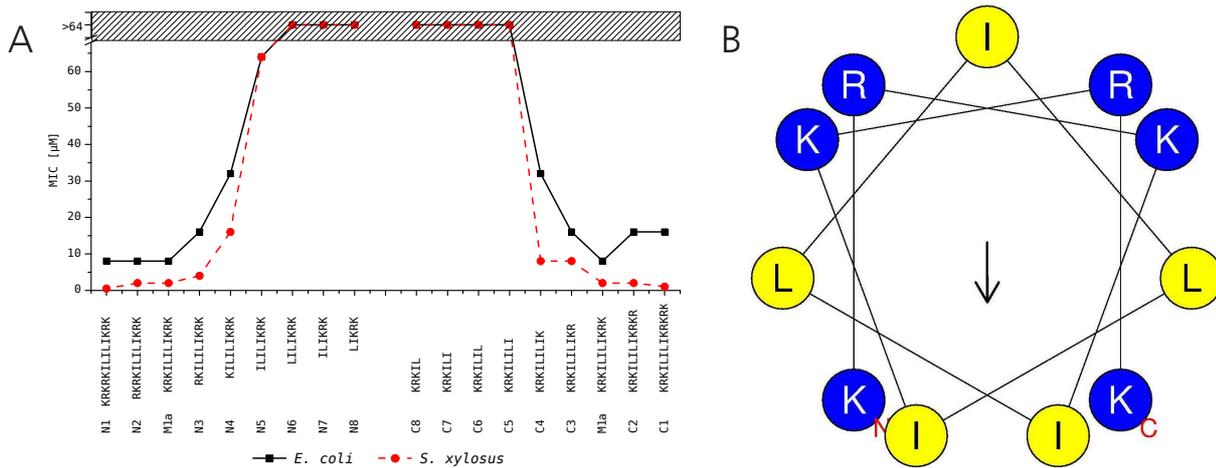


Abbildung 4.7: Grafische Darstellung der MIC-Werte in Abhängigkeit der Peptidsequenz. (A) Dargestellt sind die MIC-Werte der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek für die beiden Organismen *E. coli* und *S. xylosus* ($n=4$). Der schraffierte Bereich kennzeichnet den Konzentrationsbereich, welcher sich außerhalb des analysierten Messbereichs befand. Die antimikrobiellen Eigenschaften, welche durch die MIC-Werte repräsentiert werden, stiegen aufgrund der Reduktion der N- oder C-terminalen kationischen Aminosäuren an. Während die Vollängenpeptide N1 und C1 ausgeprägte antimikrobielle Eigenschaften mit MIC-Werten von 8 bzw. 16 μ M für *E. coli* und 0,5 bzw. 1 μ M für *S. xylosus* besaßen, wurden diese Aktivitäten mit abnehmender Peptidlänge verringert. Ein drastischer Anstieg der MIC-Werte ließ sich bei den Peptiden N4 und C4 beobachten, welche lediglich durch 1 kationische Aminosäure am terminalen Bereich charakterisiert waren. Peptide mit kurzen Sequenzlängen wies zudem deutlich reduzierte, bzw. nicht mehr nachweisbare Aktivitäten auf. Bei der Analyse wurde darüber hinaus ersichtlich, dass die Tendenzen für die antimikrobiellen Aktivitäten gegenüber *E. coli* und *S. xylosus* einhergingen, wobei jedoch die MIC-Werte für *S. xylosus* deutlich geringer waren als für *E. coli*. **(B)** Dargestellt ist die Helixrad-Projektion des künstlichen Peptids M1a. Bei der Analyse wurde ersichtlich, dass bei einer hypothetischen Ausprägung einer α -helikalen Struktur die hydrophoben und kationischen Aminosäuren gleichmäßig über die Helixoberflächen verteilt wären, was in einer nicht amphipathischen Struktur resultiert hätte.

Hinsichtlich der zytotoxischen Eigenschaften war ein vergleichbarer Trend jedoch nicht ersichtlich. Lediglich die beiden Vollängenpeptide N1 und C1 sowie N4, welches lediglich ein Lysin am N-Terminus besaß, ließen zytotoxische Eigenschaften erkennen (Tabelle 4.5). Hierbei verfügte N1 mit einem LD_{50} -Wert von 36 μ M über die stärksten zytotoxischen Charakteristiken, wohingegen C1 und N4 mit 61 und 58 μ M deutlich geringere Aktivitäten erkennen ließen. Diese Tendenz konnte auch bei den wachstumshemmenden Eigenschaften gegenüber den Eukaryoten beobachtet werden. Lediglich die Applikation des Peptids N1 führte zu einer vollständigen Wachstumsinhibition. Sämtliche anderen Peptide demonstrierten keine zytotoxischen oder zytostatischen Aktivitäten innerhalb des analysierten Konzentrationsbereichs und wurden somit als biologisch kompatibel eingestuft. Basierend darauf spiegelte sich die Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften, aufgrund der Verkürzung der Peptidsequenz in den therapeutischen Kennzahlen wider, wodurch Werte zwischen >8 und >1 für *E. coli* bzw. Werte zwischen 72 und >1 für *S. xylosus* errechnet wurden.

Analog zu den ermittelten MIC-Werten zeigten die künstlichen Peptide unterschiedliche permeabilisierende Eigenschaften gegenüber den bakteriellen Membranen von *E. coli* und *S. xylosus* (Tabelle 4.6, Abbildung 4.8). Während das Vollängenpeptid N1 permeabilisierende Eigenschaften bei einer Konzentration von 25 bzw. 5 μ M offenbarte, verringerten sich diese Eigenschaften mit der Reduktion der Peptidlänge. Dadurch waren Konzentrationen von 50 bzw. 25 μ M nötig um einen vergleichbaren Effekt durch die Applikation des Peptids N4 zu erreichen. Die weitere Reduktion kationischer Aminosäuren führte zu Peptiden, die innerhalb des analysierten Konzentrationsbereichs keine permeabilisierenden Eigenschaften besaßen. Diese Ergebnisse wurden durch die Analyse der permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber der äußeren und inneren Bakterienmembran von *E. coli*

ML-35p verifiziert. Es wurde ersichtlich, dass sämtliche Peptide, welche wenigstens eine kationische Aminosäure am N-Terminus besaßen, die äußere Bakterienmembran bei jeder untersuchten Konzentration permeabilisierten. Außerdem wurde ersichtlich, dass die jeweiligen Permeabilisierungszeiten mit abnehmender Peptidlänge zunahmten (Abbildung 4.8). Bei einer Konzentration von 32 μM wurden Permeabilisierungszeiten zwischen 11 und 17 min durch die Interaktion mit den Peptiden N1 bis N4 detektiert. Bei geringeren Konzentrationen konnte eine stärkere Abhängigkeit der Permeabilisierungszeit von der Peptidlänge festgestellt werden, wodurch bei einer Konzentration von 4 μM Permeabilisierungszeiten zwischen 21 und 54 min detektiert wurden. Das Peptid N5, welches über keine kationischen Aminosäuren am N-Terminus verfügte, führte lediglich zu einer Permeabilisierung der äußeren Bakterienmembran bei den beiden höchsten analysierten Konzentrationen, welche mit 37 und 48 min, im Vergleich zu den Peptiden mit einer höheren Anzahl an kationischen Aminosäuren, deutlich verzögert war. Während die Peptide starke permeabilisierende Eigenschaften gegenüber der äußeren Membran, selbst in geringen Konzentrationen besaßen, konnten Beschädigungen der inneren Membran lediglich bei den beiden höchsten Konzentrationen von 32 und 16 μM festgestellt werden. Zudem waren für die Permeabilisierung wenigstens 2 kationische Aminosäuren am N-Terminus in Peptid N3 notwendig, wohingegen Peptide mit kürzeren Peptidsequenzen zu keiner Beschädigung der inneren bakteriellen Membran führten. In Analogie dazu resultierte die sukzessive Reduktion der C-terminalen kationischen Aminosäuren ebenfalls in einer Reduktion der Membran-permeabilisierenden Eigenschaften. Hierbei zeichnete sich ab, dass die Tendenz mit den Analysen der N-terminalen Truncation-Bibliothek einherging, wobei jedoch leichte Unterschiede hinsichtlich der Permeabilisierungszeiten detektiert wurden. Außerdem konnte eine Beschädigung der inneren Membran auch durch das Peptid C4 festgestellt werden, welches lediglich eine kationische Aminosäure am C-Terminus besaß.

Tabelle 4.6: Membran-permeabilisierende Eigenschaften der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek. Die Daten sind eine Zusammenfassung von konzentrations- und zeitabhängigen Testreihen (n=4). Dargestellt sind die generellen permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber *E. coli* und *S. xyloso*, welche mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden. Angegeben ist die geringste Konzentration (50 μM / 25 μM / 5 μM) bei welcher eine Permeabilisierung von mehr als 80% der Bakterien zu beobachten war. Darüber hinaus ist die zeitabhängige Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von *E. coli* ML-35p angegeben. Hierbei repräsentieren die angegebenen Zeitpunkte eine 50 %ige Permeabilisierung.

Peptid	Permeabilisierung [μM]		Permeabilisierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]				Permeabilisierung der inneren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]			
	<i>E. coli</i>	<i>S. xyloso</i>	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM
N1	25	5	21	14	12	11	>90	>90	38	32
N2	25	5	20	13	12	12	>90	>90	40	32
M1a	25	25	39	16	17	17	>90	>90	59	42
N3	25	25	41	40	21	13	>90	>90	>90	56
N4	50	25	54	49	31	17	>90	>90	>90	>90
N5	>50	>50	>90	>90	48	37	>90	>90	>90	>90
N6	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
N7	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
N8	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
C1	25	25	38	30	23	13	>90	>90	62	45
C2	25	25	40	27	22	16	>90	>90	64	47
M1a	25	25	39	16	17	17	>90	>90	59	42
C3	50	25	42	30	21	19	>90	>90	50	45
C4	50	25	41	37	25	12	>90	>90	53	42
C5	>50	>50	>90	>90	26	23	>90	>90	>90	>90
C6	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
C7	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
C8	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90

Die Analyse der berechneten dreidimensionalen Struktur motive ergab, dass bei sämtlichen Peptiden ein β -Strang als dominantes Motiv vorlag (Abbildung 4.9). In Peptid C1 war dieser nahezu über die gesamte Peptidstruktur vertreten. Lediglich der finale C-terminale Bereich verfügte über ein kleines unstrukturiertes Motiv. Durch die sukzessive Reduktion der N-terminalen kationischen Aminosäuren auf 3 in Peptid M1a blieb dieses β -Strang-Motiv nahezu unverändert. Bei einer weiteren Reduktion der kationischen Aminosäuren in Peptid N3 verkürzte sich dieses Motiv und war darüber hinaus lediglich in der zentralen Peptidregion vertreten, wohingegen die N- und C-terminalen Bereiche unstrukturierte Konformationen umfassten. Die weitere Verkürzung der Peptidsequenz auf 1 kationische Aminosäure resultierte in dem Peptid N4, welches lediglich über einen geringen β -Strang-Anteil im zentralen Bereich verfügte. Vielmehr zeigte sich, dass mit zunehmender Reduktion der Aminosäuren der Anteil der unstrukturierten Bereiche sowohl am N- als auch am C-Terminus anstieg. Im Vergleich dazu ergaben die errechneten dreidimensionalen Strukturen der C-terminalen Truncation-Bibliothek eine nahezu identische Tendenz. Analog zu N1 und N2 besaßen die Peptide C1 und C2 ein ausgedehntes β -Strang-Motiv, welches nahezu die gesamte Sequenz umfasste. Ebenfalls prägten sämtliche Peptide eine kleine unstrukturierte Region am C-Terminus der jeweiligen Peptide aus. Analog zu N3 ließ das Peptid C3 ein verkürztes Motiv in der mittleren Region erkennen, welches von zwei flexiblen Bereichen flankiert wurde. In Peptid N4 war dieses Motiv weiter reduziert und vollständig am N-terminalen Ende des Peptids lokalisiert.

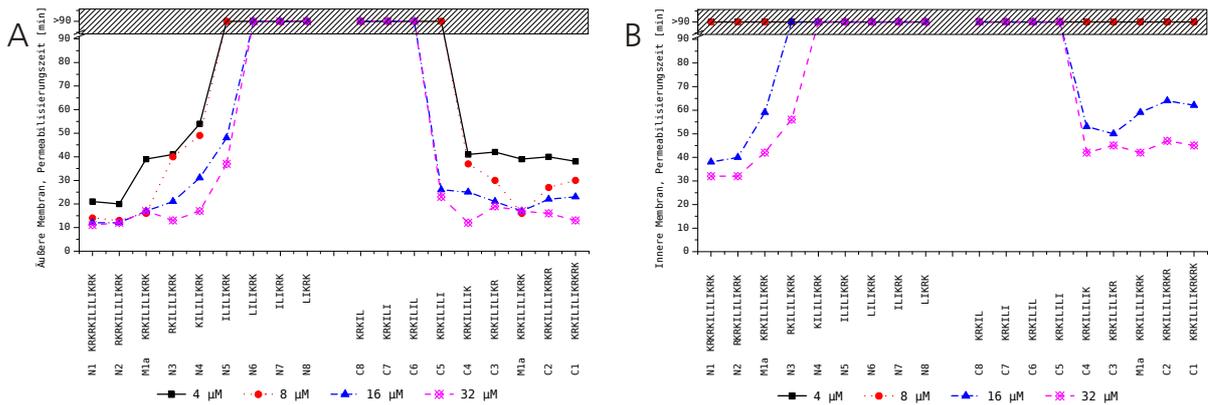


Abbildung 4.8: Grafische Darstellung der zeitabhängigen Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von *E. coli* ML-35p in Abhängigkeit der Peptidsequenz der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek. Dargestellt sind die Permeabilisierungszeiten der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek gegenüber der äußeren und inneren Bakterienmembran ($n=4$). Der schraffierte Bereich kennzeichnet den Zeitbereich welcher sich außerhalb des analysierten Messzeitraums befand. **(A)** Dargestellt ist die konzentrations- und zeitabhängige Permeabilisierung der äußeren Bakterienmembran. Die äußere Membran wurde bei sämtlichen analysierten Konzentrationen durch die Vollängenpeptide N1 und C1 in weniger als 40 min permeabilisiert. Mit zunehmender Reduktion der kationischen Aminosäuren an den C- bzw. N-terminalen Bereichen der Peptide erhöhten sich die Permeabilisierungszeiten. Diese Zeiten waren bei den Peptiden N5 und C5, welche über keine kationischen Aminosäuren an den jeweiligen Termini verfügten, drastisch erhöht, was darin resultierte, dass innerhalb des analysierten Zeitbereichs lediglich permeabilisierende Eigenschaften bei den beiden höchsten Konzentrationen festgestellt werden konnten. Eine weitere Reduktion der Aminosäuren führte zu Peptiden ohne nachweisbare permeabilisierende Eigenschaften. **(B)** Dargestellt ist die konzentrations- und zeitabhängige Permeabilisierung der inneren Bakterienmembran. Im Vergleich zur äußeren Membran wurde die innere Membran lediglich bei den beiden höchsten Konzentrationen von 16 und 32 μM permeabilisiert. Mit zunehmender Reduktion der kationischen Aminosäuren nahmen die Permeabilisierungszeiten ab, wodurch bei den Peptiden N5 und C5 keine antimikrobiellen Aktivitäten mehr identifiziert werden konnten.

Bei der Betrachtung der biophysikalischen Eigenschaften der Peptide wurde ersichtlich, dass mit einer Reduktion der kationischen Aminosäuren eine entsprechende Reduktion der Nettoladung, sowie eine entsprechende Erhöhung der Gesamthydrophobizität einhergingen. Hinsichtlich des Hydrophobizitätsmoments konnte beobachtet werden, dass dieses, basierend auf der Verkürzung der Peptidsequenz, lediglich leicht variierte. Somit wurden Werte zwischen 0,236 und 0,400 ermittelt. Die genauere Betrachtung der entsprechenden Helixrad-Projektion von Peptid M1a ergab, dass bei der Ausprägung einer hypothetischen α -Helix die kationischen und hydrophoben Aminosäuren gleichmäßig über die Helixoberfläche verteilt wären und somit dieses Peptid keine amphipathische Struktur ausgebildet hätte (Abbildung 4.7 B). Diese Tendenz konnte auch für die anderen untersuchten artifizialen Peptide festgestellt werden.

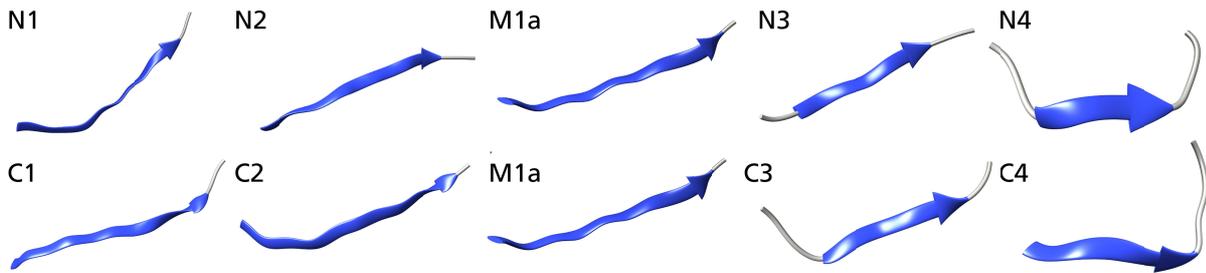


Abbildung 4.9: Dreidimensionale Peptidstruktur der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung des „PEP-FOLD web servers“, wobei den Berechnungen eine hydrophile Umgebung zugrunde gelegt wurde. Die Sekundärstruktur motive sind unter Verwendung von Bändermodellen dargestellt, wobei die blau markierten Sekundärstrukturen β -Strang-Anordnungen repräsentieren und Bereiche ohne definierte Sekundärstruktur grau markiert sind. Die in den Motiven integrierten Pfeilspitzen zeigen in die Richtung des C-Terminus. Sämtliche Peptide wiesen ein β -Strang-Motiv auf. Während dieses bei den Volllängenpeptiden N1 und C1 nahezu die gesamte Peptidsequenz umfasste, konnte bei einer Reduktion der kationischen Aminosäuren eine Verkürzung festgestellt werden. Dadurch wurde bei den Peptiden N3 und C3, welche jeweils nur eine kationische Aminosäure an ihren Termini besaßen ein deutlich reduziertes Motiv erkenntlich, welches sich im zentralen Bereich der Peptidsequenz befand. Die Peptide N4 und C4 wiesen darüber hinaus ein weiter verkürztes Motiv auf.

4.1.4 Hydrophobe Region und Anordnung der Aminosäuren

In Analogie zu den N- und C-terminalen Truncation-Bibliotheken wurde der Einfluss des zentralen hydrophoben Bereichs auf die antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften der künstlichen Peptide untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Peptidbibliothek angelegt, bei welcher der hydrophobe Bereich mittels sukzessiver Reduktion der Aminosäuren schrittweise verkürzt wurde. Als Vorlage für die Bibliothek wurde ebenfalls das zuvor charakterisierte Modellpeptid M1a verwendet, welches einen zentralen Bereich von 5 hydrophoben Aminosäuren besaß, welcher von jeweils 3 kationischen Aminosäuren an den Termini flankiert wurde. Bei den Ergebnissen wurde erkenntlich, dass das analysierte Volllängenpeptid H1, welches über 7 hydrophobe Aminosäuren im zentralen Peptidbereich verfügte ausgeprägte antimikrobielle Eigenschaften aufwies, welche zu MIC-Werten von 8 und 1 μM führten (Tabelle 4.7, Abbildung 4.10 A).

Tabelle 4.7: Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften von Peptidbibliotheken für die Analyse des hydrophoben Bereichs, sowie der Anordnung von kationischen und hydrophoben Aminosäuren. Die Daten sind eine repräsentative Zusammenfassung aus konzentrationsabhängigen Testreihen (n=4).

Peptid	Sequenz	Eigenschaften			MIC [μ M]		Zytotoxizität [μ M]		Therapeutische Kennzahl (ϕ)	
		H	μ	Z	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>	LD ₅₀	MTK	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>
H1	KRKILILILIKRK	0,486	0,054	6	8	1	>64	>64	>8	>64
M1a	KRK ILILIKRK	0,256	0,290	6	8	2	>64	>64	>8	>32
H2	KRK LILIKRK	0,102	0,209	6	>64	16	>64	>64	n. a.	>4
H3	KRK ILIKRK	-0,008	0,045	6	>64	64	>64	>64	n. a.	>1
H4	KRK LIKRK	n. a.	n. a.	6	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
H5	KRK IKRK	n. a.	n. a.	6	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
H6	KRK KRK	n. a.	n. a.	6	>64	16	>64	>64	n. a.	>4
H7	KRK GKRK	n. a.	n. a.	6	>64	64	>64	>64	n. a.	>1
H8	KRK GSGRK	-0,669	0,078	6	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
A1	RKRKLILILIKRKR	0,179	0,191	8	8	0,5	>64	>64	>8	>128
A2	KRKLILIKRILIKRK	0,179	0,054	8	16	8	>64	>64	>4	>8
A3	RKLILKRRKRIIKR	0,179	0,283	8	16	8	>64	>64	>4	>8
A4	KLILKRRKRILIK	0,179	0,034	8	32	16	>64	>64	>2	>4
A5	LILKRRKRKRILI	0,179	0,221	8	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.

Durch eine Reduktion der hydrophoben Aminosäuren auf 4 in Peptid H2 wurden diese Aktivitäten drastisch reduziert, woraus MIC-Werte von >64 und 16 μ M resultierten. Eine weitere Verkürzung der hydrophoben Aminosäuren führte zu einer weiteren Reduktion der antimikrobiellen Aktivität. Während das Peptid H3 mit 3 hydrophoben Aminosäuren noch eine geringe Aktivität gegenüber *S. xylosus* zeigte, konnten bei der Analyse der Peptide H4 und H5 keine messbaren Aktivitäten mehr festgestellt werden.

Ebenfalls führte die Applikation der Peptide H6 und H7 nicht zu einer Inhibierung des bakteriellen Wachstums von *E. coli*. Bei diesen Peptiden war jedoch eine Abweichung von der zuvor beobachteten Tendenz festzustellen, welche sowohl bei den Modellpeptiden, als auch bei der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek einheitlich war. Die artifiziellen Peptide H6 und H7, welche lediglich 6 kationische Aminosäuren, bzw. ein zentrales Glycin besaßen, ließen eine Aktivität gegenüber *S. xylosus* erkennen. Während das Peptid H5, welches eine zentrale hydrophobe Aminosäure besaß, keine antimikrobielle Aktivität gegenüber *S. xylosus* ausprägte, konnte das bakterielle Wachstum durch die Zugabe des Peptids H6 bei einer Konzentration von 16 μ M vollständig inhibiert werden. Ebenso ergab sich, dass eine neutrale Aminosäure im zentralen Bereich des Peptids H7 ebenfalls in einem Peptid mit antimikrobiellen Eigenschaften gegenüber *S. xylosus* resultiert. Bei der Analyse der zytotoxischen Eigenschaften konnten durch sämtliche Peptide keine direkten Aktivitäten nach einer Einwirkzeit von 2 h ermittelt werden, woraus sich LD₅₀-Werte von >64 ergaben. Zudem fand keine Inhibierung oder Reduktion des Wachstums der eukaryotischen Zellen statt, wodurch die Tendenz der errechneten therapeutischen Kennzahlen direkt mit den antimikrobiellen Eigenschaften der Peptide korreliert. Demzufolge wurde für *E. coli* der Wert >8 für die Peptide H1 und M1a und Werte zwischen >64 und >1 für *S. xylosus* berechnet.

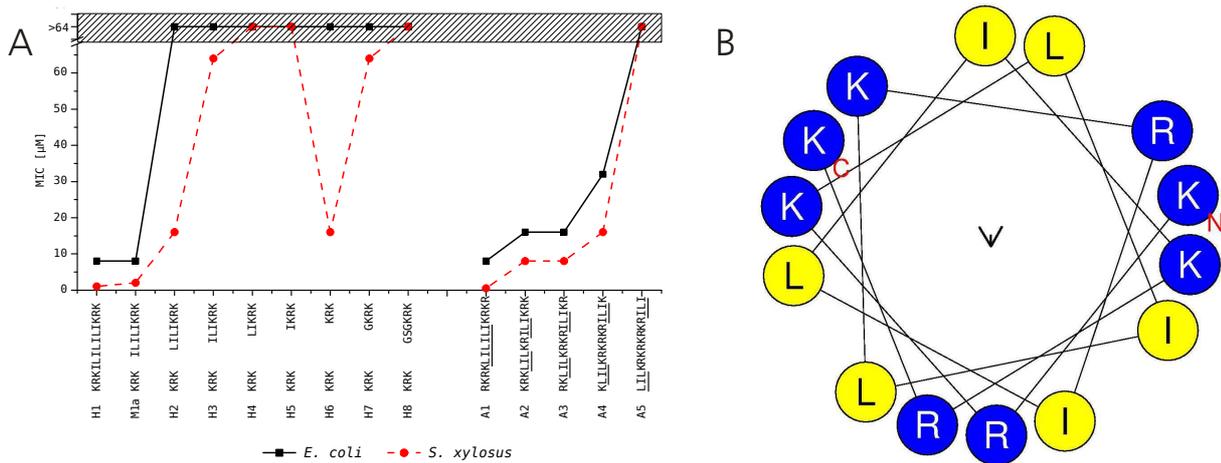


Abbildung 4.10: Grafische Darstellung der MIC-Werte in Abhängigkeit des hydrophoben Bereichs und der Sequenzanordnung. (A) Dargestellt sind die MIC-Werte der Peptidbibliotheken für die Analyse des hydrophoben Bereichs, sowie der Anordnung von kationischen und hydrophoben Aminosäuren ($n=4$). Der schraffierte Bereich kennzeichnet den Konzentrationsbereich welcher sich außerhalb des analysierten Messbereichs befand. Während das Vollängenpeptid H1 ausgeprägte antimikrobielle Eigenschaften mit MIC-Werten von 8 bzw. 0,5 μM für *E. coli* und *S. xylosus* aufwies, wurden diese Aktivitäten mit abnehmender Peptidlänge stark verringert. Ein drastischer Anstieg der MIC-Werte ließ sich bei dem Peptid H2 für *E. coli* beobachten, wohingegen eine drastische Steigerung des MIC-Werts gegenüber *S. xylosus* bei Peptid H3 zu beobachten war. Peptide mit kürzeren Sequenzlängen besaßen keine nachweisbaren Aktivitäten gegenüber *E. coli*. Lediglich die Peptide H6 und H7, welche über keine hydrophoben, bzw. eine neutrale zentrale Aminosäure verfügten, ließen MIC-Werte von 16 bzw. 64 μM gegenüber *S. xylosus* erkennen. Bei der Analyse der Aminosäureanordnung konnte beobachtet werden, dass mit zunehmender Variation der Sequenz die MIC-Werte anstiegen, was nach einer vollständigen Invertierung der Peptidsequenz in Peptid A5 zu keinen nachweisbaren antimikrobiellen Eigenschaften führte. (B) Dargestellt ist die Helixrad-Projektion des artifiziiellen Peptids A2. Bei der Analyse wurde ersichtlich, dass bei einer hypothetischen Ausprägung einer α -helikalen Struktur die hydrophoben und kationischen Aminosäuren gleichmäßig über die Helixoberfläche verteilt wären, was in einer nicht amphipathischen Struktur resultiert hätte.

In Analogie zu der Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften aufgrund der Reduktion der hydrophoben zentralen Aminosäuren, konnte ebenso eine signifikante Veränderung der permeabilisierenden Eigenschaften identifiziert werden (Tabelle 4.8). Hierbei wurde erkennbar, dass die Peptide H1 und M1a die Membran von *E. coli* und *S. xylosus* permeabilisierten, wobei die effektiven Konzentrationen für eine 80 %ige Permeabilisierung der gesamten Bakterienpopulation bei *S. xylosus* niedriger ausfielen als bei *E. coli*. Während die Peptide H2 und H3, welche 4 bzw. 3 hydrophobe Aminosäuren im zentralen Bereich aufwiesen, keine Aktivitäten gegenüber *E. coli* besaßen, führten sie dennoch zu einer Permeabilisierung der bakteriellen Membran von *S. xylosus* bei Konzentrationen von 25 bzw. 50 μM . Bezüglich *E. coli* wurde diese Tendenz bei den Versuchen hinsichtlich der Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran verifiziert (Tabelle 4.8, Abbildung 4.11). Es konnte festgestellt werden, dass die Permeabilisierungszeiten gegenüber der äußeren Membran mit der Verkürzung der Peptidsequenz zunahmten, was besonders gut bei niedrigen Konzentrationen zu beobachten war.

Tabelle 4.8: Membran-permeabilisierende Eigenschaften von Peptidbibliotheken für die Analyse des hydrophoben Bereichs, sowie der Anordnung von kationischen und hydrophoben Aminosäuren. Die Daten sind eine Zusammenfassung von konzentrations- und zeitabhängigen Testreihen (n=4). Dargestellt sind die generellen permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber *E. coli* und *S. xylosus*, welche mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden. Angegeben ist die geringste Konzentration (50 μM / 25 μM / 5 μM) bei welcher eine Permeabilisierung von mehr als 80% der Bakterien zu beobachten war. Darüber hinaus ist die zeitabhängige Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von *E. coli* ML-35p angegeben. Hierbei repräsentieren die angegebenen Zeitpunkte eine 50 %ige Permeabilisierung.

Peptid	Permeabilisierung [μM]		Permeabilisierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]				Permeabilisierung der inneren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]			
	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM
H1	50	5	26	20	19	17	>90	37	35	33
M1a	25	25	39	16	17	17	>90	>90	59	42
H2	>50	25	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
H3	>50	50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
H4	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
H5	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
H6	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
H7	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
H8	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
A1	25	5	26	21	17	16	>90	42	40	35
A2	>50	25	>90	>90	21	16	>90	>90	80	60
A3	>50	50	>90	>90	>90	17	>90	>90	>90	72
A4	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
A5	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90

Das Peptid H1 führte bei einer Konzentration von 4 μM nach 26 min zu einer 50 %igen Permeabilisierung, wohingegen durch das Peptid M1a, welches lediglich eine hydrophobe Aminosäure weniger besaß, erst nach 39 min eine äquivalente Membranschädigung detektiert werden konnte. Diese Tendenz konnte bei der Analyse der inneren Membranpermeabilisierung verifiziert werden, bei welcher eine Konzentration von 16 μM nach 35 min zu einer Beschädigung der Bakterienmembran durch das Peptid H1 führte, wohingegen durch die Applikation von M1a unter identischen Bedingungen erst nach 59 min eine 50 %ige Beschädigung erkennbar wurde. Darüber hinaus ließ H1 auch bei einer Konzentration von 8 μM eine Permeabilisierung der inneren Bakterienmembran erkennen, wohingegen die anderen Peptide diese innerhalb der untersuchten Messdauer von 90 min nicht aufwiesen.

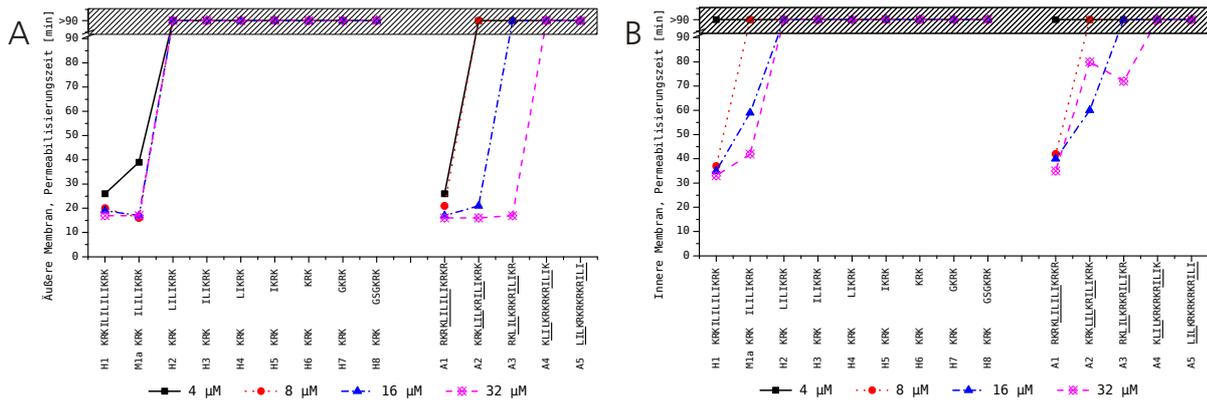


Abbildung 4.11: Grafische Darstellung der zeitabhängigen Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von *E. coli* ML-35p in Abhängigkeit der Deletion der hydrophoben Aminosäuren des zentralen Bereichs, sowie der Verschiebung der kationischen und hydrophoben Aminosäuren. Dargestellt sind die Permeabilisierungszeiten gegenüber der äußeren und inneren Bakterienmembran ($n=4$). Der schraffierte Bereich kennzeichnet den Zeitbereich welcher sich außerhalb des analysierten Messzeitraums befand. **(A)** Dargestellt ist die konzentrations- und zeitabhängige Permeabilisierung der äußeren Bakterienmembran. Die Membran wurde bei sämtlichen analysierten Konzentrationen durch das Volllängenpeptid H1 in weniger als 27 min permeabilisiert. Mit zunehmender Reduktion der hydrophoben Aminosäuren erhöhten sich die Permeabilisierungszeiten, wodurch ab dem Peptid H2 mit 4 hydrophoben Aminosäuren keine Beschädigungen der Membran mehr ersichtlich wurden. Eine ähnliche Tendenz zeichnete sich bei der Verschiebung der hydrophoben Aminosäuren ab. Hierbei stiegen die Permeabilisierungszeiten ebenfalls mit der Variation der Peptidsequenz an, wodurch ab Peptid A4 keine Membranschädigung mehr nachweisbar war. **(B)** Dargestellt ist die konzentrations- und zeitabhängige Permeabilisierung der inneren Bakterienmembran. Im Vergleich zu der äußeren Bakterienmembran wurde die innere Bakterienmembran lediglich durch die drei höchsten Konzentrationen von 8, 16 und 32 μM des Peptids H1 permeabilisiert. In Analogie zu der äußeren Bakterienmembran, stiegen die Permeabilisierungszeiten mit der Reduktion der hydrophoben Aminosäuren an, wodurch ab dem Peptid H2 mit 4 hydrophoben Aminosäuren keine permeabilisierenden Eigenschaften mehr erkennbar waren. Bei der Verschiebung der hydrophoben Aminosäuren konnte ein ähnliches Verhalten detektiert werden, was dazu führte, dass die Permeabilisierungszeiten mit zunehmender Variation anstiegen, wodurch ab dem Peptid A4 keine Permeabilisierung mehr stattfand.

Entsprechend den zuvor berechneten dreidimensionalen Strukturen der anderen Peptidbibliotheken, zeigte sich bei der Reduktion der hydrophoben Region eine ähnliche Tendenz. So konnte beobachtet werden, dass die Peptide ebenfalls ein ausgeprägtes β -Strang-Motiv umfassten, welches in Peptid H1 durch eine kleine flexible Region innerhalb des hydrophoben Peptidbereichs unterbrochen war (Abbildung 4.12). Das Peptid H2, mit lediglich 4 hydrophoben Aminosäuren, besaß in Analogie zu M1a ein β -Strang-Motiv, welches nahezu die gesamte Peptidsequenz umfasste. Lediglich ein kleines Fragment wurde am C-Terminus als flexible Region berechnet. Aufgrund der sukzessiven Reduktion der hydrophoben Aminosäuren auf 3 in Peptid H3 nahm der Anteil der flexiblen Regionen an den Termini zu und das β -Strang-Motiv konnte lediglich im zentralen Peptidbereich festgestellt werden. Eine weitere Reduktion der hydrophoben Aminosäuren führte zu Peptiden mit völlig flexiblen Strukturen, wie es bei dem Peptid H4 zu beobachten war. Hinsichtlich der biophysikalischen Eigenschaften ergab sich, dass mit einer Reduktion der hydrophoben Aminosäuren sowohl die Hydrophobizität als auch das Hydrophobizitätsmoment abnahmen, wohingegen die Nettoladung innerhalb der Bibliothek konstant blieb (Tabelle 4.7).

Da sich sowohl bei der N- und C-terminalen, als auch der hydrophoben Truncation-Bibliothek die biophysikalischen Eigenschaften, sowie die Sequenzlängen veränderten, wurde darüber hinaus eine Bibliothek verwendet, bei welcher diese Parameter konstant blieben, jedoch die Anordnung der Aminosäuren variiert wurde. Als Vorlage wurde demzufolge das Peptid A1 verwendet, welches einen zentralen Bereich von 6 hydrophoben Aminosäuren sowie zwei flankierenden Regionen mit jeweils 4 kationischen Aminosäuren umfasste. Im Zuge der Variation der Peptidbibliothek wurden diese

hydrophoben Aminosäuren schrittweise aus dem zentralen Bereich zu den Termini verlagert, wodurch eine vollständige Invertierung der hydrophoben und kationischen Aminosäuren in Peptid A5 stattfand. Hinsichtlich der antimikrobiellen Eigenschaften konnte festgestellt werden, dass mit zunehmender Verschiebung der Aminosäuren die MIC-Werte anstiegen (Tabelle 4.7, Abbildung 4.10 A). Während das Peptid A1 MIC-Werte von 8 und 0,5 μM aufwies, wurde das bakterielle Wachstum durch die Applikation von Peptid A4 lediglich bei Konzentrationen von 32 und 16 μM vollständig inhibiert. Die vollständige Invertierung der hydrophoben und kationischen Aminosäuren in Peptid A5 resultiert in einem weiteren Anstieg der MIC-Werte, wodurch keine antimikrobiellen Aktivitäten innerhalb des analysierten Konzentrationsbereichs mehr identifiziert werden konnten. Analog zu den Peptiden H1 bis H8 konnten bei der Analyse der Peptide A1 bis A5 keine zytotoxischen Eigenschaften detektiert werden, wodurch die errechneten therapeutischen Kennzahlen ebenfalls direkt mit den MIC-Werten korrelierten. In Analogie zu der Erhöhung der MIC-Werte, aufgrund der Verschiebung der hydrophoben und kationischen Aminosäuren, wurde eine Verringerung der permeabilisierenden Eigenschaften erkennbar, welche ebenfalls mit der Sequenzvariation einherging (Tabelle 4.8, Abbildung 4.11). Während A1 sowohl durch permeabilisierende Eigenschaften gegenüber der äußeren und inneren Membran bei sämtlichen getesteten Konzentrationen gekennzeichnet war, konnte dies bei Peptid A3 lediglich bei 32 μM detektiert werden. Eine weitere Verschiebung der Aminosäuren führte dazu, dass keine Beschädigung der bakteriellen Membran mehr festgestellt werden konnte. Im Vergleich zu den zuvor analysierten Peptidbibliotheken resultierte die Variation der Aminosäureanordnung in einer deutlich stärkeren Veränderung der errechneten dreidimensionalen Strukturen (Abbildung 4.12). So ergaben die Berechnungen, dass das Peptid A1, ähnlich dem Peptid H1, über zwei separate β -Strang-Motive verfügte, welche durch eine kleine flexible Region unterbrochen waren. Als Folge der schrittweisen Verschiebung der Aminosäuren wurde eine signifikante Veränderung der dreidimensionalen Struktur von Peptid H2 beobachtet, bei welcher ein α -helikales Motiv in Kombination mit zwei flexiblen flankierenden Regionen erkennbar wurde. Die genauere Analyse ergab, dass sowohl die hydrophoben als auch die kationischen Aminosäuren in diesem Motiv auf unterschiedlichen Helixoberflächen lokalisiert waren, was anhand der Helixrad-Projektion sichtbar wurde (Abbildung 4.10 B). Dementsprechend entstand keine Separation der hydrophoben und kationischen Aminosäuren, woraus sich demzufolge keine amphipathische Struktur ergab. Dies spiegelte sich ebenfalls in einer signifikanten Reduktion des Hydrophobizitätsmoments wider (Tabelle 4.7). Eine weitere Verschiebung der Aminosäuren in den Peptiden A3 und A4 führte zu jeweils zwei separaten antiparallelen β -Strang-Motiven. Die vollständige Invertierung der Primärsequenz in Peptid A5 ging mit einer flexiblen dreidimensionalen Struktur einher, bei welcher keine charakteristischen Struktur motive mehr vorhanden waren.

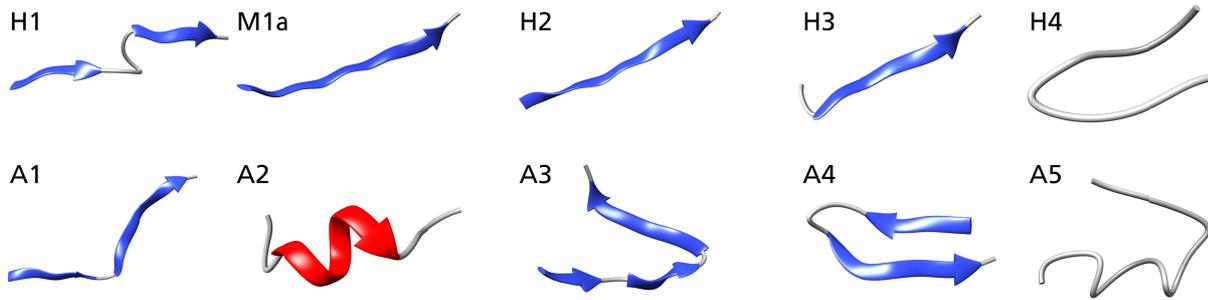


Abbildung 4.12: Darstellung der dreidimensionalen Peptidstruktur der Peptidbibliotheken für die Analyse des hydrophoben Bereichs, sowie der Anordnung von kationischen und hydrophoben Aminosäuren. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung des „PEP-FOLD web servers“, wobei den Berechnungen eine hydrophile Umgebung zugrunde gelegt wurde. Die Sekundärstrukturmotive sind unter Verwendung von Bändermodellen dargestellt. Die blau markierten Bereiche repräsentieren β -Strang-Motive, die rot markierten Bereiche α -Helices und Bereiche ohne definierte Sekundärstruktur sind grau markiert. Die in den Sekundärstrukturmotiven integrierten Pfeilspitzen zeigen in die Richtung des C-Terminus. Das Volllängenpeptid H1 war durch zwei separate β -Strang-Motive charakterisiert, welche durch einen kurzen flexiblen Bereich separiert waren. Durch die Reduktion der hydrophoben Aminosäuren im zentralen Peptidbereich veränderte sich die Struktur zu einem kontinuierlichen β -Strang in den Peptiden M1a und H2, welcher nahezu die gesamte Sequenz umfasste. Durch eine weitere Reduktion der Aminosäuren in Peptid H3 konnte eine Reduktion des Motivs festgestellt werden, welches ab einer Anzahl von 2 hydrophoben Aminosäuren in Peptid H4 nicht mehr nachweisbar war. Die Variation der Anordnung der hydrophoben und kationischen Aminosäuren ließ eine deutlich andere Tendenz erkennen. Während das Volllängenpeptid A1 zwei β -Strang-Motive aufwies, führte die sukzessive Verschiebung der Aminosäuren zunächst zu der Ausprägung einer α -helikalen Struktur in Peptid A2 und anschließend zu einem antiparallelen, aus zwei separaten β -Strängen bestehenden Motiv, welches in Peptid A4 besonders ausgeprägt war. Die vollständige Invertierung der Aminosäuresequenz in Peptid A5 resultierte in einer vollständig flexiblen Konformation, bei welcher keine charakteristischen Sekundärstrukturmotive nachweisbar waren.

4.1.5 Partielle Nettoladung am C-Terminus

Aufgrund der Tatsache, dass die vorangegangenen Analysen der Peptidbibliotheken gezeigt haben, dass die antimikrobiellen Eigenschaften sowohl von der Anzahl der hydrophoben bzw. kationischen Aminosäuren, als auch von deren Positionierung innerhalb der Peptidsequenz abhängig waren, wurden darüber hinaus auch die Auswirkungen der Nettoladung am C-Terminus untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Substitutionsbibliothek generiert, bei welcher die C-terminalen kationischen Aminosäuren sukzessiv durch anionische Aminosäuren substituiert wurden. Hierbei wurde das artifizielle Peptid D5, welches einen zentralen hydrophoben Bereich bestehend aus 5 Isoleucinen, sowie zwei flankierende Bereiche mit jeweils 5 Lysinen besaß, als Vorlage verwendet. Die Substitution der kationischen Aminosäuren wurde auf zweierlei Arten durchgeführt, zum Einen erfolgte sie direkt am C-Terminus und zum Anderen direkt an den hydrophoben Bereich angrenzend. Bei den Ergebnissen ließ sich beobachten, dass das Peptid D5, welches als Bibliotheksvorlage diente und lediglich kationische und hydrophobe Aminosäuren besaß, durch antimikrobielle Eigenschaften gekennzeichnet war, welche das bakterielle Wachstum von *E. coli* und *S. xylosus* bei Konzentrationen von 16 und 2 μM vollständig inhibierten (Tabelle 4.9). Aufgrund der Substitution des C-terminalen Lysins durch Asparaginsäure in Peptid D4 verringerten sich diese Werte auf 32 und 16 μM . Eine weitere Substitution führte in den Peptiden D3 bis D1 zu einer stetigen Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften. Lediglich das Peptid D3 besaß bei 32 μM noch inhibierende Eigenschaften gegenüber *S. xylosus*, wohingegen das bakterielle Wachstum durch die Applikation der Peptide D2 und D1 bis zu einer Konzentration von 64 μM nicht beeinträchtigt wurde. In Analogie dazu resultierte die Substitution der an den hydrophoben Bereich angrenzenden kationischen Aminosäuren ebenfalls in der Reduktion der antimikrobiellen Aktivitäten. So führte die Substitution eines

Lysins in Peptid D6 mit Asparaginsäure zu einer Erhöhung der MIC-Werte von 16 und 2 μM auf 32 und 16 μM . Ähnlich den Peptiden D3 bis D1 ergab eine weitere Substitution die stetige Erhöhung der MIC-Werte, wodurch ab einer Substitution von 3 Lysinen in dem Peptid D7 keine antimikrobiellen Eigenschaften mehr detektiert werden konnten. Aufgrund der Tatsache, dass sämtliche analysierten Peptide keine nachweisbaren zytotoxischen oder zytostatischen Eigenschaften besaßen, korrelierten, wie in einigen Fällen zuvor, die errechneten therapeutischen Kennzahlen direkt mit den antimikrobiellen Eigenschaften. Dementsprechend wurden Werte zwischen >2 und >4 für *E. coli* und Werte zwischen >4 und >32 für *S. xylosus* errechnet.

Tabelle 4.9: Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften der C-terminalen Asparaginsäure Substitutions-Bibliothek. Die Daten sind eine repräsentative Zusammenfassung aus konzentrationsabhängigen Testreihen ($n=4$).

Peptid	Sequenz	Eigenschaften			MIC [μM]		Zytotoxizität [μM]		Therapeutische Kennzahl (θ)	
		H	μ	Z	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>	LD ₅₀	MTK	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>
D1	KKKKKIIIIIDDDDD	0,013	0,258	0	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
D2	KKKKKIIIIIKDDDD	-0,001	0,265	2	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
D3	KKKKKIIIIIKKKDD	-0,031	0,265	6	>64	32	>64	>64	n. a.	>2
D4	KKKKKIIIIIKKKD	-0,045	0,258	8	32	16	>64	>64	>2	>4
D5	KKKKKIIIIIKKKK	-0,060	0,271	10	16	2	>64	>64	>4	>32
D6	KKKKKIIIIIDKKK	-0,045	0,264	8	32	16	>64	>64	>2	>4
D7	KKKKKIIIIIDDDK	-0,016	0,264	4	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
D8	KKKKKIIIIIDDDK	-0,001	0,271	2	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.

Hinsichtlich der generellen Membran-permeabilisierenden Eigenschaften wurde erkennbar, dass das Peptid D5 sowohl die gramnegative als auch die grampositive Bakterienmembran permeabilisierte, wobei eine Konzentration von 25 μM für eine Beschädigung der Membran bei 80 % der bakteriellen Population von *E. coli* und 5 μM bei *S. xylosus* notwendig war (Tabelle 4.10). Diese Tendenz konnte ebenfalls anhand der detaillierten Analyse der äußeren und inneren Membranpermeabilisierung beobachtet werden. Hierbei ergab sich, dass die äußere Membran selbst bei einer Konzentration von 4 μM permeabilisiert wurde, wohingegen die Beschädigung der inneren Membran lediglich bei Konzentrationen von ≥ 8 μM beobachtet werden konnte. Als Folge der Substitution der C-terminalen kationischen Aminosäuren konnte eine Reduktion der permeabilisierenden Eigenschaften der Peptide D4 und D6 festgestellt werden, welche lediglich bei den durchflusszytometrischen Experimenten beobachtet werden konnte. Weitere Substitutionen resultierten in Analogie zu der Erhöhung der MIC-Werte in Peptiden ohne nachweisbare membranschädigende Wirkung.

Tabelle 4.10: Membran-permeabilisierende Eigenschaften der C-terminalen Asparaginsäure Substitutions-Bibliothek. Die Daten sind eine Zusammenfassung von konzentrations- und zeitabhängigen Testreihen (n=4). Dargestellt sind die generellen permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber *E. coli* und *S. xylosum*, welche mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden. Angegeben ist die geringste Konzentration (50 μM / 25 μM / 5 μM) bei welcher eine Permeabilisierung von mehr als 80% der Bakterien zu beobachten war. Darüber hinaus ist die zeitabhängige Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von *E. coli* ML-35p angegeben. Hierbei repräsentieren die angegebenen Zeitpunkte eine 50 %ige Permeabilisierung.

Peptid	Permeabilisierung [μM]		Permeabilisierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]				Permeabilisierung der inneren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]			
	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosum</i>	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM
D1	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
D2	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
D3	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
D4	50	25	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
D5	25	5	32	29	28	26	>90	68	66	59
D6	50	25	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
D7	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
D8	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90

Ähnlich der Variation bei den antimikrobiellen Eigenschaften zeichneten sich bei der Analyse der errechneten dreidimensionalen Peptidstrukturen eine ähnlich starke Abhängigkeit von der Anzahl der Aminosäuresubstitutionen ab (Abbildung 4.13). Während das Peptid D5 ein zentrales β -Strang-Motiv aufwies, welches von zwei flexiblen Regionen flankiert wurde, führten die Substitutionen der C-terminalen kationischen Aminosäuren zu Strukturen mit größtenteils antiparallelen Ausrichtungen. So umfassten insbesondere die Peptide D1, D2, D3, D7 und D8 Motive, bei welchen die C-terminalen anionischen Aminosäuren mit den N-terminalen kationischen Aminosäuren interagierten, wodurch stabile antiparallele Struktur motive entstanden. Im Gegensatz dazu ließ sich anhand der Analyse der Peptide D6 und D4, welche lediglich eine anionische Aminosäure im C-terminalen kationischen Bereich der Peptidsequenz besaßen, feststellen, dass deren Struktur motive durch weniger antiparallelen Charakter und mehr flexible Regionen geprägt waren. Neben diesen starken Variationen hinsichtlich der strukturellen Eigenschaften resultierten die sukzessiven Substitutionen der kationischen Aminosäuren lediglich in der Reduktion der effektiven Nettoladung der Peptide, wohingegen deren Hydrophobizitäten und Hydrophobizitätsmomente keine Korrelation zu den durchgeführten Substitutionen zeigten und innerhalb der Peptidbibliothek nahezu konstant blieben.

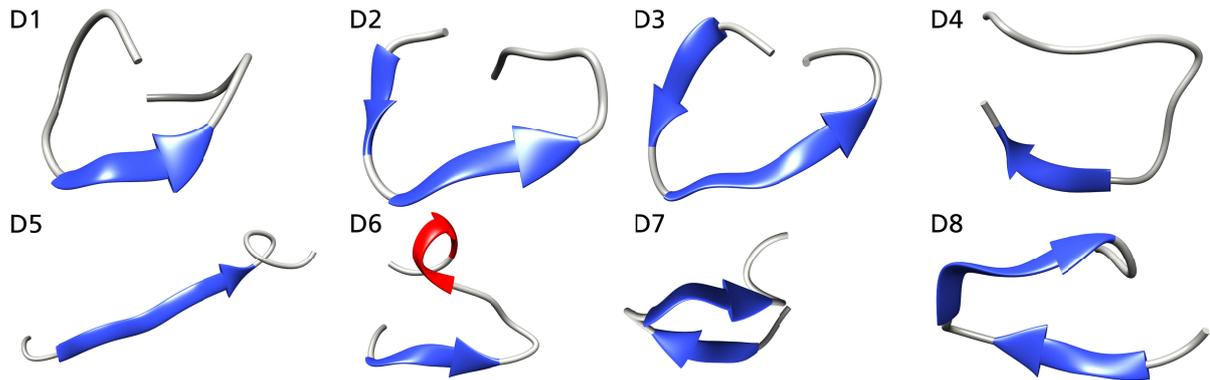


Abbildung 4.13: Darstellung der dreidimensionalen Peptidstruktur der C-terminalen Asparaginsäure Substitutions-Bibliothek. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung des „PEP-FOLD web servers“, wobei den Berechnungen eine hydrophile Umgebung zugrunde gelegt wurde. Die Sekundärstrukturmotive sind unter Verwendung von Bändermodellen dargestellt. Die blau markierten Bereiche repräsentieren β -Strang-Motive, die rot markierten Bereiche α -Helices und Bereiche ohne definierte Sekundärstruktur sind grau markiert. Die in den Sekundärstrukturmotiven integrierten Pfeilspitzen zeigen in die Richtung des C-Terminus. Das Peptid D5, welches lediglich kationische und hydrophobe Aminosäuren umfasste, wies ein zentrales β -Strang-Motiv auf, welches von zwei flexiblen Regionen flankiert wurde. Die Peptide D6 und D4, bei welchen eine anionische Aminosäure im C-terminalen kationischen Bereich substituiert wurde, ließen schwach ausgeprägte antiparallele Strukturen erkennen, welche hauptsächlich durch flexible Regionen charakterisiert waren. Im Gegensatz dazu verfügten die Peptide D1, D2, D3, D7 und D8 über deutlich stabilere antiparallele Struktur motive, welche auf der Interaktion der N-terminalen kationischen Aminosäuren und der substituierten C-terminalen anionischen Aminosäuren beruhten.

4.1.6 Peptid-Komposition

Aufgrund der Tatsache, dass die biophysikalischen Eigenschaften unterschiedlicher hydrophober oder kationischer Seitenketten untereinander stark variieren, wurde eine Substitutionsbibliothek verwendet, um den Einfluss einzelnen Aminosäuren auf die antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften zu untersuchen. Hierbei wurden Peptide generiert, welche über einen aus fünf hydrophoben Aminosäuren bestehenden zentralen Bereich verfügten, welcher von jeweils drei kationischen Aminosäuren flankiert wurde. Bei der Komposition der einzelnen Bereiche wurden in dieser Peptidbibliothek stets identische Aminosäuren verwendet und entsprechende kombinatorische Substitutionen durchgeführt, welche die zwei kationischen Aminosäuren Lysin und Arginin, sowie die vier hydrophoben Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Valin und Phenylalanin umfassten. Bei den Ergebnissen wurde ersichtlich, dass die beiden Peptide S9 und S10, deren zentraler hydrophober Bereich durch neutrale Glycine substituiert wurde, keine wachstumsinhibierenden Eigenschaften bis einschließlich zu einer Konzentration von 64 μM erkennen ließen (Tabelle 4.11). Im Gegensatz dazu resultierte die Applikation sämtlicher anderer Peptide, die sowohl über eine zentrale hydrophobe Region als auch zwei flankierende kationische Regionen verfügten, in der vollständigen Inhibierung des Wachstums beider analysierter Bakterien. Es konnte beobachtet werden, dass die ermittelten MIC-Werte stark variierten und durch die jeweiligen Aminosäuresubstitutionen beeinflusst wurden. So wurden wachstumsinhibierende Eigenschaften gegenüber *E. coli* in einem Konzentrationsbereich zwischen 4 und 64 μM festgestellt, wohingegen für die Inhibierung des Wachstums von *S. xylosus* Konzentrationen zwischen 0,5 und 8 μM ausreichend waren. Bei der detaillierteren Betrachtung der einzelnen Substitutionen und deren Einfluss auf die antimikrobiellen Eigenschaften wurde ersichtlich, dass die aus Arginin bestehenden Peptide S1, S3, S5 und S7 geringere oder identische MIC-Werte im Vergleich zu den entsprechenden Lysin beinhaltenden Peptiden

offenbaren. Die einzige Ausnahme repräsentierte das Peptid S2 mit einem MIC-Werte von 0,5 gegenüber *S. xyloso*, welcher im Vergleich zu dem dazu korrespondierenden Peptid S1 um das 4-fache verringert war.

Tabelle 4.11: Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften der Substitutionsbibliothek für die Analyse der Peptidkomposition. Die Daten sind eine repräsentative Zusammenfassung aus konzentrationsabhängigen Testreihen (n=4).

Peptid	Sequenz	Eigenschaften			MIC [μ M]		Zytotoxizität [μ M]		Therapeutische Kennzahl (ϕ)	
		H	μ	Z	<i>E. coli</i>	<i>S. xyloso</i>	LD ₅₀	MTK	<i>E. coli</i>	<i>S. xyloso</i>
S1	RRRIIIIIIRR	0,267	0,293	6	8	2	>64	64	(>8)	(>32)
S2	KKKIIIIKKK	0,278	0,291	6	8	0,5	>64	>64	>8	>128
S3	RRLLLLLRRR	0,222	0,281	6	8	1	>64	64	(>8)	(>64)
S4	KKLLLLLKKK	0,233	0,280	6	16	8	>64	>64	>2	>4
S5	RRRVVVVRRR	0,004	0,228	6	32	2	>64	>64	>2	>32
S6	KKKVVVVKKK	0,015	0,226	6	64	8	>64	>64	>1	>8
S7	RRRFFFFRRR	0,263	0,291	6	4	0,5	>64	32	(>16)	(>128)
S8	KKKFFFFKKK	0,274	0,290	6	16	4	>64	>64	>4	>16
S9	KKKGGGGKKK	-0,540	0,090	6	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.
S10	RRRGGGGRRR	-0,551	0,092	6	>64	>64	>64	>64	n. a.	n. a.

Die stärkeren antimikrobiellen Eigenschaften der Arginin-enthaltenden Peptide konnten ebenfalls bei den Membran-permeabilisierenden Eigenschaften beobachtet werden (Tabelle 4.12). Während die Peptide S1 und S2 ähnliche Aktivitäten und nahezu identische Permeabilisierungszeiten besaßen, konnten bei den anderen Peptidpaaren deutlich stärkere Variationen beobachtet werden. Der drastischste Unterschied konnte hierbei bei der Analyse der Peptide S7 und S8 nachgewiesen werden. Während das Lysin-enthaltende Peptid S8 schwache permeabilisierende Eigenschaften gegenüber beiden Organismen besaß, resultierte die Applikation des Arginin-enthaltenden Peptids in einer äußeren und inneren Membranpermeabilisierung bei Konzentrationen von $\geq 8 \mu$ M in weniger als 15 bzw. 40 min. Bei den Analysen hinsichtlich der zytotoxischen Eigenschaften konnte keine direkte Beschädigung der eukaryotischen Zellen beobachtet werden (Tabelle 4.11). Jedoch führten die Peptide S1, S3 und S7 bei Konzentrationen von 32 bzw. 64 μ M zu einer Inhibierung des Wachstums über einen Zeitraum von 4 Tagen, weshalb deren korrespondierende therapeutische Kennzahlen nur eingeschränkte Gültigkeit besaßen. Vergleichbare Aktivitäten konnten bei den anderen Peptiden nicht identifiziert werden, weshalb diese als biologisch kompatibel eingestuft wurden und somit deren therapeutische Kennzahlen direkt mit den antimikrobiellen Eigenschaften korrelierten.

Tabelle 4.12: Membran-permeabilisierende Eigenschaften der Substitutionsbibliothek für die Analyse der Peptidkomposition. Die Daten sind eine Zusammenfassung von Konzentrations- und zeitabhängigen Testreihen (n=4). Dargestellt sind die generellen permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber *E. coli* und *S. xylosus*, welche mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden. Angegeben ist die geringste Konzentration (50 μM / 25 μM / 5 μM) bei welcher eine Permeabilisierung von mehr als 80% der Bakterien zu beobachten war. Darüber hinaus ist die zeitabhängige Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von *E. coli* ML-35p angegeben. Hierbei repräsentieren die angegebenen Zeitpunkte eine 50 %ige Permeabilisierung.

Peptid	Permeabilisierung [μM]		Permeabilisierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]				Permeabilisierung der inneren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]			
	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM
S1	25	25	25	24	22	19	>90	63	61	56
S2	25	5	26	23	21	21	>90	62	58	51
S3	50	25	>90	32	22	15	>90	>90	>90	83
S4	50	50	>90	>90	>90	24	>90	>90	>90	90
S5	50	25	>90	>90	>90	19	>90	>90	>90	>90
S6	>50	>50	>90	>90	>90	31	>90	>90	>90	>90
S7	25	25	>90	14	13	9	>90	39	37	34
S8	50	50	>90	>90	>90	20	>90	>90	>90	64
S9	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90
S10	>50	>50	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90

Ein deutlich weniger einheitliches Verhalten konnte anhand der Analyse der zentralen hydrophoben Aminosäuren und deren Einfluss auf die antimikrobiellen Eigenschaften festgestellt werden. Die Substitution von Isoleucin mit Leucin in den Peptiden S1 und S3 resultierte in nahezu identischen MIC-Werten von 8 und 2 μM , bzw. 8 und 1 μM , obwohl die permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber der äußeren und inneren Bakterienmembran von *E. coli* ML-35p aufgrund der Substitution deutlich reduziert wurden. Die Substitution mit Valin in dem Peptid S5 führte hingegen zu einer deutlich drastischeren Reduktion der antimikrobiellen Aktivität, wodurch eine Erhöhung der MIC-Werte auf 32 und 2 μM festgestellt werden konnte. Darüber hinaus verringerten sich ebenfalls die Membran-permeabilisierenden Eigenschaften, wodurch lediglich bei einer Konzentration von 32 μM die äußere Membran beschädigt wurde. Die innere Membran blieb in dem analysierten Zeitraum hingegen vollständig intakt. Abschließend resultierte die Substitution mit Phenylalanin in Peptid S7 in der Verringerung der MIC-Werte auf 4 und 0,5 μM , sowie zu verkürzten Permeabilisierungszeiten im Vergleich zu S1.

In Analogie dazu führte die Substitution der hydrophoben Aminosäuren in den Lysin-enthaltenden Peptiden zu vergleichbaren, wenn auch nicht immer identischen Tendenzen. So resultierte die Substitution der Isoleucine in Peptid S2 mit Leucinen in Peptid S4 in einer Erhöhung der MIC-Werte um das 2-fache gegenüber *E. coli* bzw. das 6-fache gegenüber *S. xylosus*. Dazu korrespondierend verringerten sich ebenfalls die permeabilisierenden Eigenschaften, wodurch für eine effektive Beschädigung der gramnegativen und grampositiven Membran eine Erhöhung der Konzentration auf 50 μM nötig war. Ebenso konnten Beschädigungen der äußeren und inneren Bakterienmembran lediglich bei einer Konzentration von 32 μM festgestellt werden. In Analogie zu den Arginin-enthaltenden Peptiden resultierte die Substitution mit der hydrophoben Aminosäure Valin in dem Lysin-enthaltenden Peptid S6 in einer drastischen Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften, wodurch die MIC-Werte auf 64 und 8 μM anstiegen und permeabilisierende Eigenschaften lediglich gegenüber der äußeren Bakterienmembran bei der höchsten analysierten Konzentration nachgewiesen werden konnten. Die Substitution mit

Phenylalanin in Peptid S8 resultierte lediglich in einer schwachen Steigerung der antimikrobiellen Eigenschaften im Vergleich zu dem Valin-enthaltenden Peptid S6. Hierbei wurden MIC-Werte von 16 und 4 μM in Kombination mit leichten Membran-permeabilisierenden Eigenschaften ersichtlich. Zusammenfassend ließ sich bei den Substitutionen feststellen, dass die hydrophobe Aminosäure Isoleucin in Kombination mit der kationischen Aminosäure Lysin bzw. die hydrophobe Aminosäure Phenylalanin in Kombination mit der kationischen Aminosäure Arginin, zu den ausgeprägtesten antimikrobiellen Eigenschaften führte. Bei der Analyse der biophysikalischen Eigenschaften wurde ersichtlich, dass entsprechend dem generellen Peptidaufbau die Nettoladung innerhalb der Peptidbibliothek identisch blieb. Ferner waren die Ergebnisse lediglich durch geringfügige Variationen hinsichtlich der Hydrophobizitäten gekennzeichnet, welche den vorgenommenen Substitutionen entsprachen. Lediglich die beiden Peptide S5 und S6, in deren zentralem Bereich die hydrophobe Aminosäure Valin verwendet wurde, besaßen geringere Gesamthydrophobizitäten. Bei den Hydrophobizitätsmomenten ließ sich erkennen, dass diese keine Abhängigkeit von den durchgeführten Substitutionen besaßen und innerhalb der analysierten Peptidbibliothek nahezu identisch blieben. Bei der Analyse der errechneten dreidimensionalen Strukturen war festzustellen, dass diese mit der errechneten Struktur des Peptids M1a korrelierten und aufgrund der vorgenommenen Substitutionen keine signifikanten Variationen induziert wurden. Lediglich die Phenylalanin-enthaltenden Peptide S7 und S8 waren durch einen kurzen, flexiblen Bereich innerhalb der hydrophoben Region gekennzeichnet, welcher das β -Strang-Motiv unterbrach. Während sämtliche antimikrobiell wirksamen Peptide über ähnliche Strukturen verfügten, konnten bei der Analyse der Peptide S9 und S10, deren zentrale hydrophobe Region mit neutralen Aminosäuren substituiert wurde, ausschließlich unstrukturierte und flexible Sekundärstrukturen beobachtet werden.

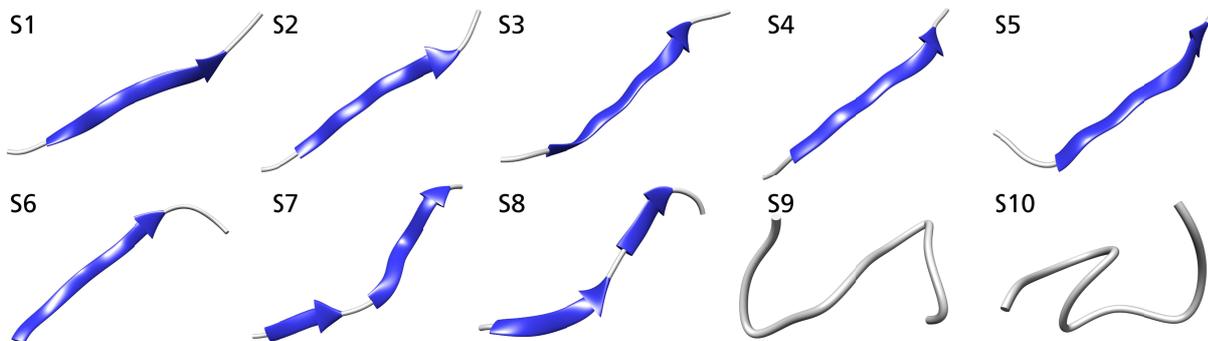


Abbildung 4.14: Dreidimensionale Peptidstruktur der Substitutionsbibliothek für die Analyse der Peptidkomposition. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung des „PEP-FOLD web servers“, wobei den Berechnungen eine hydrophile Umgebung zugrunde gelegt wurde. Die Sekundärstrukturmodelle sind unter Verwendung von Bändermodellen dargestellt, wobei die blau markierten Sekundärstrukturen β -Strang-Anordnungen repräsentieren und Bereiche ohne definierte Sekundärstruktur grau markiert sind. Die in den Sekundärstrukturmodellen integrierten Pfeilspitzen zeigen in die Richtung des C-Terminus. Sämtliche Peptide umfassten ein nahezu identisches β -Strang-Motiv. Lediglich die Phenylalanin-enthaltenden Peptide S7 und S8 besaßen eine kurze unstrukturierte Region innerhalb des zentralen hydrophoben Bereichs.

4.1.7 Optimierte Peptidsequenz und Behandlung von kontaminierten Zellkulturen

Basierend auf den vorangegangenen Experimenten hinsichtlich der Anzahl und Position der kationischen und hydrophoben Aminosäuren sowie der Gesamtkomposition der artifiziellen Peptide wurde eine optimierte Peptidsequenz abgeleitet und hinsichtlich der antimikrobiellen, zytotoxischen und biophysikalischen Eigenschaften charakterisiert. Das Peptid O1 bestand aus einer zentralen Region mit 6 Isoleucinen, welche von jeweils 3 Lysinen flankiert wurden. Alternativ dazu wurde das Peptid O2 generiert, welches über eine identische Sequenz verfügte, dessen C-Terminus jedoch amidiert wurde, um die Nettoladung des Peptids zu erhöhen und gleichzeitig die negative Ladung am C-Terminus zu entfernen. Bei der Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften ergaben sich MIC-Werte von 8 und 0,5 μM für das Peptid O1, wohingegen die C-terminale Amidierung in Peptid O2 zu einer Reduktion dieser MIC-Werte auf 4 und 0,25 μM , und somit zu einer Steigerung der antimikrobiellen Aktivität führte (Tabelle 4.13).

Tabelle 4.13: Biophysikalische, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften der beiden optimierten antimikrobiellen Peptide O1 und O2. Die Daten sind eine repräsentative Zusammenfassung aus konzentrationsabhängigen Testreihen (n=4).

Peptid	Sequenz	Eigenschaften			MIC [μM]		Zytotoxizität [μM]		Therapeutische Kennzahl (θ)	
		H	μ	Z	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>	LD ₅₀	MTK	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>
O1	KKKIIIIIIKKK	0,405	0,170	6	8	0,5	>64	>64	>8	>128
O2	KKKIIIIIIKKK-NH ₂	n. a.	n. a.	8	4	0,25	>64	>64	>16	>256

Dazu korrespondierend konnten starke Membran-permeabilisierende Eigenschaften gegenüber dem grampositiven als auch dem gramnegativen Bakterium bei Konzentrationen von 25 bzw. 5 μM durch die Applikation des Peptids O1 detektiert werden (Tabelle 4.14). Analog zu der Reduktion der MIC-Werte durch die C-terminale Amidierung in Peptid O2 zeigte sich ebenfalls eine Steigerung der permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber *E. coli*, wodurch die effektive Konzentration von 25 μM auf 5 μM verringert werden konnte. Während die Amidierung zu einer Reduktion der wirksamen Konzentrationen führte konnten jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der Permeabilisierungszeiten der äußeren und inneren Bakterienmembran von *E. coli* ML-35p festgestellt werden. Prinzipiell konnten selbst bei der geringsten analysierten Konzentration von 4 μM Beschädigungen gegenüber der äußeren als auch der inneren Bakterienmembran nachgewiesen werden. Während die Permeabilisierung der äußeren Membran je nach verwendeter Konzentration in einem Zeitraum zwischen 17 und 24 min stattfand, war die Permeabilisierung der inneren Membran um ca. 20 min verzögert, was in Permeabilisierungszeiten zwischen 36 und 41 min resultierte.

Tabelle 4.14: Membran-permeabilisierende Eigenschaften der beiden optimierten antimikrobiellen Peptide O1 und O2. Die Daten sind eine Zusammenfassung von konzentrations- und zeitabhängigen Testreihen (n=4). Dargestellt sind die generellen permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber *E. coli* und *S. xylosus*, welche mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden. Angegeben ist die geringste Konzentration (50 μM / 25 μM / 5 μM) bei welcher eine Permeabilisierung von mehr als 80% der Bakterien zu beobachten war. Darüber hinaus ist die zeitabhängige Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von *E. coli* ML-35p angegeben. Hierbei repräsentieren die angegebenen Zeitpunkte eine 50 %ige Permeabilisierung.

Peptid	Permeabilisierung [μM]		Permeabilisierung der äußeren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]				Permeabilisierung der inneren Membran von <i>E. coli</i> ML-35p [min]			
	<i>E. coli</i>	<i>S. xylosus</i>	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM	4 μM	8 μM	16 μM	32 μM
	O1	25	5	23	21	19	17	41	39	39
O2	5	5	24	22	18	18	40	38	36	36

Neben den antimikrobiellen Eigenschaften konnte zusätzlich festgestellt werden, dass sowohl das Peptid O1, als auch die amidierte Variante O2 keine nachweisbaren zytotoxischen Eigenschaften innerhalb des analysierten Konzentrationsbereichs besaßen (Tabelle 4.13). Die daraus abgeleiteten therapeutischen Kennzahlen korrelierten somit direkt mit den antimikrobiellen Eigenschaften und ergaben mit Werten von >8 und >16 gegenüber *E. coli* sowie >128 und >256 gegenüber *S. xylosus* die höchsten errechneten Kennzahlen aller analysierten artifiziellen und natürlich vorkommenden Peptide. Bei der Analyse der biophysikalischen Eigenschaften und der errechneten dreidimensionalen Peptidstrukturen wurde ersichtlich, dass das Peptid O1, ebenso wie etliche Peptide in den zuvor analysierten Bibliotheken, durch ein ausgedehntes β -Strang-Motiv gekennzeichnet war, welches nahezu die gesamte Peptidsequenz umfasste und lediglich eine kleine flexible Region am C-Terminus erkennen ließ (Abbildung 4.15 A-C). Dieses Motiv besaß weiterhin keine Abhängigkeit von dem der Berechnung zugrunde liegenden Algorithmus und blieb auch bei der Berechnung in einer hydrophoben Umgebung unverändert. Ferner konnte anhand der hypothetischen Helixrad-Projektion beobachtet werden, dass sowohl die kationischen als auch hydrophoben Aminosäuren gleichmäßig über die Helixoberfläche verteilt wären, wodurch keine Ausprägung einer amphipathischen Struktur stattgefunden hätte (Abbildung 4.15 D). Dies spiegelte sich auch in dem mit 0,170 errechneten Hydrophobizitätsmoment wider (Tabelle 4.13).

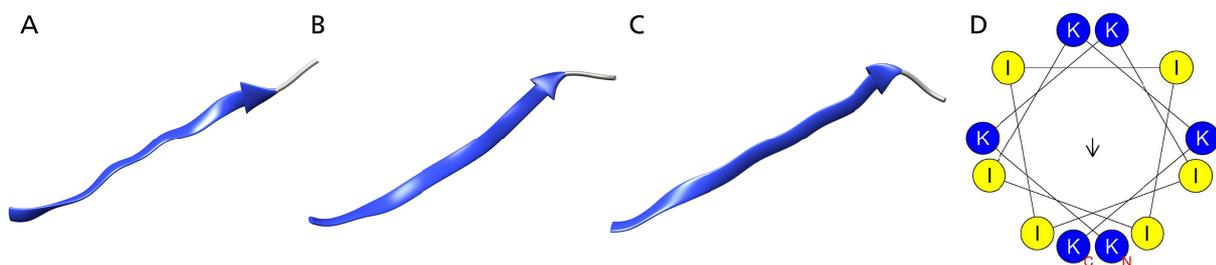


Abbildung 4.15: Dreidimensionale Peptidstruktur des antimikrobiellen Peptids O1 und seine Helixrad-Projektion. Dargestellt ist die berechnete dreidimensionale Peptidstruktur des antimikrobiellen Peptids O1. Die Berechnung erfolgte in einer (A) hydrophilen Umgebung unter Verwendung des „PEP-FOLD web servers“, sowie in einer (B) hydrophilen als auch (C) hydrophoben Umgebung mittels des „PEPSTR Peptide Tertiary Prediction web servers“. Die Sekundärstrukturmotive sind unter Verwendung von Bändermodellen dargestellt, wobei die blau markierten Sekundärstrukturen β -Strang Anordnungen repräsentieren und Bereiche ohne definierte Sekundärstruktur grau markiert sind. Die in den Sekundärstrukturmotiven integrierten Pfeilspitzen zeigen in die Richtung des C-Terminus. Die Berechnete Struktur ergab ein β -Strang-Motiv, welches unabhängig von dem verwendeten Algorithmus als auch der Kalkulation zugrunde liegenden Umgebung war. (D) Dargestellt ist die Helixrad-Projektion des antimikrobiellen Peptids O1. Bei der Analyse wurde ersichtlich, dass bei einer hypothetischen Ausprägung einer α -helikalen Struktur die hydrophoben und kationischen Aminosäuren gleichmäßig über die Helixoberfläche verteilt wären, wodurch sich keine amphipathische Struktur ausgeprägt hätte.

Aufgrund der Tatsache, dass das optimierte Peptid O1 über ausgeprägte antimikrobielle Eigenschaften in Kombination mit biologisch kompatiblen Eigenschaften verfügte, wurde seine Fähigkeit zur selektiven Permeabilisierung der bakteriellen Membran in einer Mischkultur von *S. xylosus* und U-937 Zellen bzw. L-929 Zellen analysiert. Hierbei war nachweisbar, dass selbst in einer Mischkultur die selektiven permeabilisierenden Eigenschaften des antimikrobiellen Peptids O1 erhalten blieben (Abbildung 4.16). Während durch die Applikation des Peptids Melittin sowohl die Membranen der Pro-, als auch Eukaryoten beschädigt wurden, konnten durch die Applikation des Peptids O1 in hohen Dosen keine permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber den Eukaryoten detektiert werden. Außerdem war zu beobachten, dass die mit Melittin behandelten Zellen starke morphologische Veränderungen aufwiesen, wohingegen die mit O1 inkubierten U-937 Zellen hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften unverändert blieben.

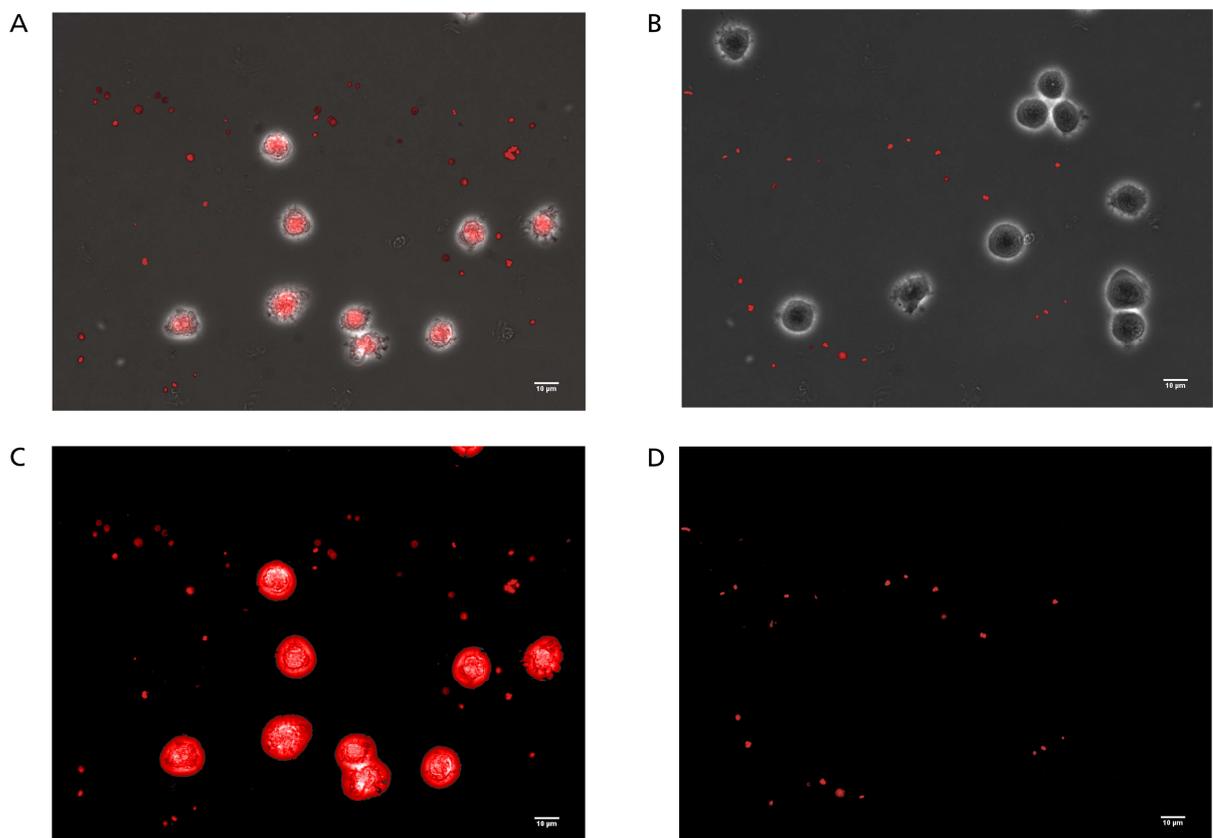


Abbildung 4.16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von kontaminierten U-937 Kulturen. Dargestellt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von U-937 Kulturen, welche im Vorfeld mit *S. xylosus* kontaminiert und denen anschließend das antimikrobielle Peptid Melittin bzw. O1 zugegeben wurde. Für die Verifizierung der Membranpermeabilität wurde der membranundurchlässige Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid verwendet. **(A)** Überlagerung der licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme einer mit 50 µM Melittin behandelten Mischkultur. **(C)** Separate fluoreszenzmikroskopische Aufnahme korrespondierend zu (A), deren Fluoreszenzsignal verstärkt wurde, um die schwach fluoreszierenden Bakterien besser detektieren zu können. Bei der Applikation des antimikrobiellen Peptids Melittin zu Mischkulturen von U-937 Zellen und *S. xylosus* ließ sich eine starke permeabilisierende Aktivität gegenüber der eu- und prokaryotischen Membran feststellen. Darüber hinaus wiesen die eukaryotischen Zellen deutliche morphologische Veränderungen auf. **(B)** Überlagerung der licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme einer mit 50 µM O1 behandelten Mischkultur. **(D)** Separate fluoreszenzmikroskopische Aufnahme korrespondierend zu (B), deren Fluoreszenzsignal verstärkt wurde, um die schwach fluoreszierenden Bakterien besser detektieren zu können. Bei der Applikation des antimikrobiellen Peptids O1 zu den Mischkulturen konnten selektive permeabilisierende Eigenschaften festgestellt werden. Während die bakteriellen Membranen maßgebliche Beschädigungen erkennen ließen, konnte keine Beeinträchtigung der Membranintegrität der U-937 Zellen beobachtet werden.

Analog dazu ergaben die Analysen der Mischkulturen von L-929 Zellen und Bakterien ähnliche Ergebnisse (Abbildung 4.17). Bei der qualitativen fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnte festgestellt werden, dass die Applikation des Peptids Melittin zu einer signifikanten Permeabilisierung der pro- und eukaryotischen Membranen führte. Ebenso wie bei den U-937 Zellen führte dies zu morphologischen Veränderungen. Im Gegensatz dazu resultierte die Applikation des Peptids O1 in einer selektiven Permeabilisierung der in der Mischkultur enthaltenen Bakterien. Ferner konnten bei den L-929 Zellen keine Veränderungen hinsichtlich der Morphologie festgestellt werden. Durch eine verlängerte Inkubationszeit von 6 h konnten darüber hinaus in der mit Melittin behandelten Mischkultur weder Zellteilung noch Bakterienwachstum beobachtet werden (Abbildung 4.18).

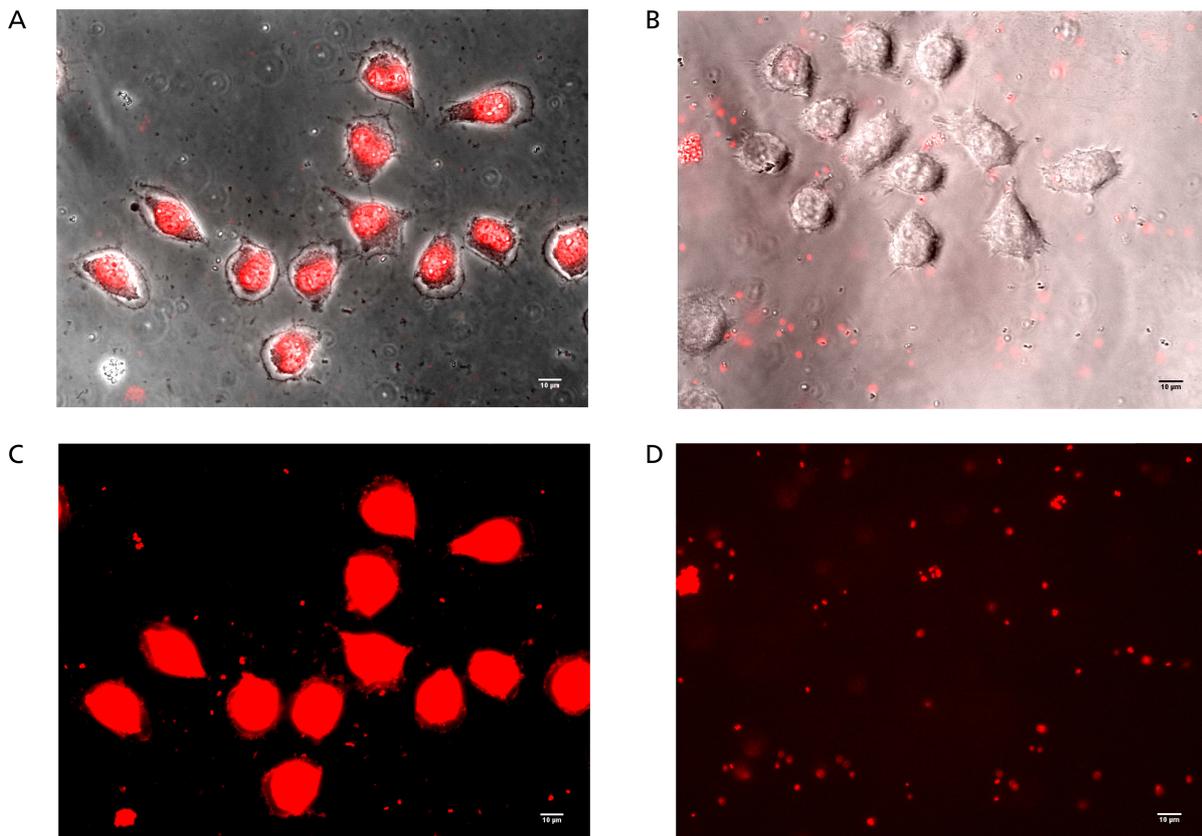


Abbildung 4.17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kontaminierten L-929 Kulturen. Dargestellt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von L-929 Kulturen, welche im Vorfeld mit *S. xylosus* kontaminiert und denen anschließend das antimikrobielle Peptid Melittin bzw. O1 zugegeben wurde. Für die Verifizierung der Membranpermeabilität wurde der membranundurchlässige Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid verwendet. **(A)** Überlagerung der licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme einer mit 50 µM Melittin behandelten Mischkultur. **(C)** Separate fluoreszenzmikroskopische Aufnahme korrespondierend zu (A), deren Fluoreszenzsignal verstärkt wurden, um die schwach fluoreszierenden Bakterien besser detektieren zu können. Bei der Analyse konnten starke permeabilisierende Eigenschaften gegenüber den L-929 Zellen als auch den Bakterien detektiert werden. Darüber hinaus wiesen die eukaryotischen Zellen morphologische Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf. **(B)** Überlagerung der licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme einer mit 50 µM Melittin behandelten Mischkultur. **(D)** Separate fluoreszenzmikroskopische Aufnahme korrespondierend zu (B), deren Fluoreszenzsignal verstärkt wurde, um die schwach fluoreszierenden Bakterien besser detektieren zu können. Bei der Analyse konnten selektive Membran-permeabilisierende Eigenschaften des antimikrobiellen Peptids O1 festgestellt werden.

In Analogie dazu wurde ebenfalls das bakterielle Wachstum bei den mit O1 behandelten Mischkulturen inhibiert, wohingegen jedoch die L-929 Zellen durch eine kontinuierliche Zellteilung gekennzeichnet waren, bei welcher sie die üblichen Stadien einer adhärennten Zellkultur durchliefen und als Folge dessen sich in Richtung einer konfluent gewachsenen Zellkultur weiter entwickelten (Abbildung 4.18). Bei der

genauerer Analyse konnten keine Einschränkungen der Adhäsion oder Zellteilung durch die Anwesenheit des antimikrobiellen Peptids O1 festgestellt werden.

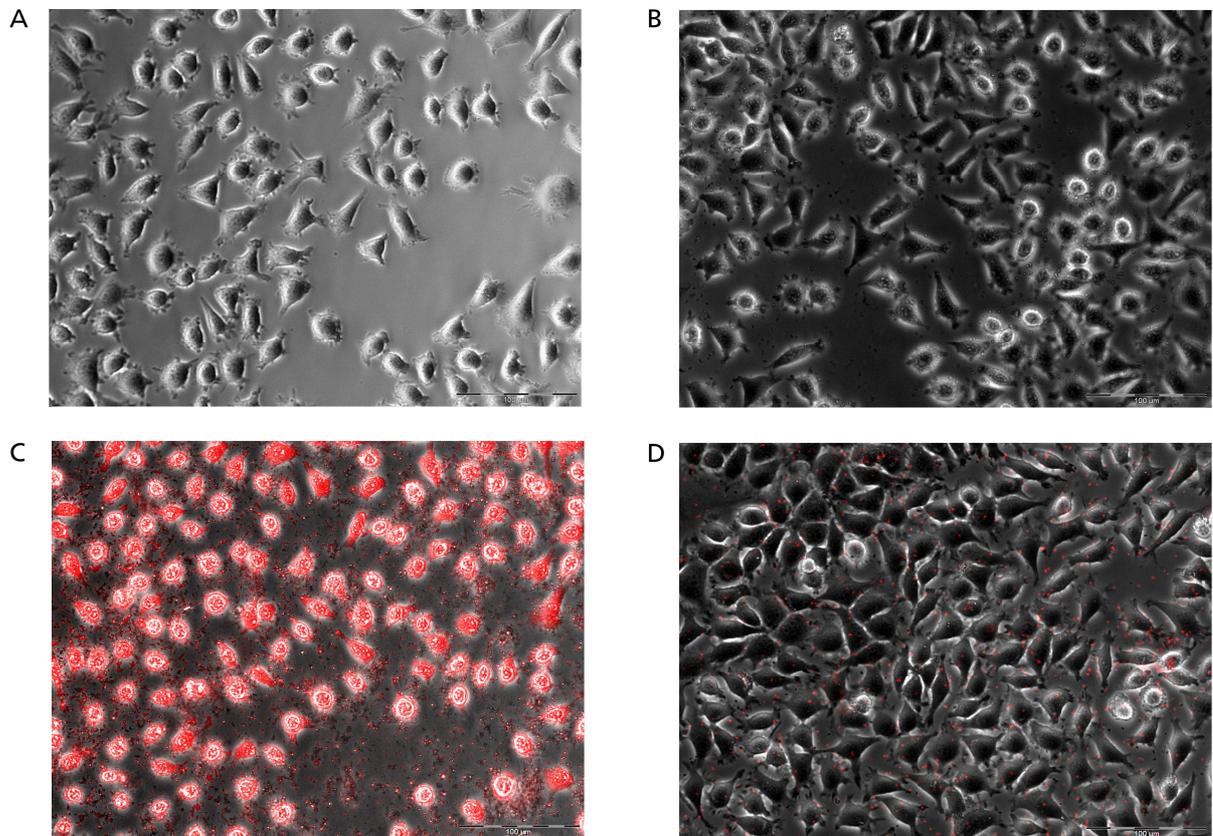


Abbildung 4.18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von kontaminierten L-929 Kulturen nach 6 h. Dargestellt sind die Überlagerungen der licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von **(A)** L-929 Zellen, **(B)** L-929 Zellen in Kombination mit Bakterien, **(C)** L-929 Zellen in Kombination mit Bakterien und 50 µM Melittin, sowie **(D)** L-929 Zellen in Kombination mit Bakterien und 50 µM O1 nach einer Inkubation von jeweils 6 h. Die Analysen ergaben, dass durch die Zugabe des antimikrobiellen Peptids Melittin zu der Mischkultur sowohl die eukaryotischen, als auch prokaryotischen Membranen permeabilisiert wurden. Im Gegensatz dazu konnte durch die Applikation des Peptids O1 eine selektive Beschädigung der bakteriellen Membranen festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Eukaryoten, welche über einen Zeitraum von 6 h dem antimikrobiellen Peptid O1 ausgesetzt waren, die normalen Zyklen einer eukaryotischen Zellkultur durchliefen und keine Einschränkungen hinsichtlich der Adhäsion oder des Teilungsverhaltens beobachtet werden konnte.

Diese Ergebnisse wurden zudem durch quantitative Analysen verifiziert. Hierbei wurden, in Analogie zu den qualitativen Experimenten, Mischkulturen von U-937 Zellen und *S. xylosus* mittels durchflusszytometrischer Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich ihrer Organismuskonzentration, als auch ihrer Membranpermeabilität untersucht (Abbildung 4.19). Diesbezüglich wurde ersichtlich, dass ohne den Zusatz eines antimikrobiellen Peptids nach 2 h sowohl die Rein- als auch die Mischkultur der U-937 Zellen sowie die darin enthaltenden Bakterien über intakte Membranen verfügten. Ferner konnte festgestellt werden, dass sowohl die Konzentration der Eu- als auch Prokaryoten im Vergleich zur Anfangskonzentration erhöht war. Im Vergleich dazu führte die Inkubation der Mischkultur mit dem antimikrobiellen Peptid Melittin zu einer Reduktion der Anzahl an Bakterien und Zellen mit intakten Membranen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass bei beiden analysierten Konzentrationen das antimikrobielle Peptid Melittin die Membran beider Organismen permeabilisierte. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die Konzentration der Bakterien

lediglich zu einem geringen Maß von der Anfangskonzentration abwich und im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich reduziert war. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der Mischkultur mit beiden Konzentrationen des optimierten Peptids O1 zu einer selektiven Permeabilisierung der bakteriellen Membran, wohingegen die eukaryotischen Zellen keine Beschädigungen aufwiesen. Hinsichtlich der gemessenen Organismuskonzentrationen wurde ersichtlich, dass die Bakterienmenge im Vergleich zu den korrespondierenden Proben, welche mit Melittin inkubiert wurden, leicht erhöht war und einen deutlich größeren Unterschied zu der Anfangskonzentration besaß. Eine verlängerte Inkubation der Mischkulturen für weitere 96 h ergab, dass bei den Zellen der Negativkontrolle Wachstum stattfand (Abbildung 4.19 B). So konnte eine Erhöhung der Zellzahl der U-937 Zellen von ca. $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml auf ca. $3,5 \times 10^6$ Zellen/ml in der Reinkultur festgestellt werden. Die Mischkultur war hingegen durch einen starken Anstieg der Bakterienkonzentration auf über 50×10^6 Bakterien/ml gekennzeichnet, wodurch neben den Bakterien keine eukaryotischen Zellen detektiert werden konnten. Die Inkubation der Mischkultur mit dem antimikrobiellen Peptid Melittin resultierte in Bakterien und Eukaryoten mit permeabilisierten Membranen, deren Konzentrationen im Vergleich zur Ausgangskonzentration verringert waren. Im Vergleich dazu konnte bei den mit dem Peptid O1 inkubierten Mischkulturen eine selektive Inhibierung des bakteriellen Wachstums beobachtet werden. Nach einer Inkubationszeit von 96 h konnten lediglich Bakterien mit beschädigten Membranen detektiert werden, wohingegen die Eukaryoten keine Membranpermeabilisierung erkennen ließen. Ferner wurde eine deutlich erhöhte Zellkonzentration im Vergleich zu der Anfangskonzentration detektiert.

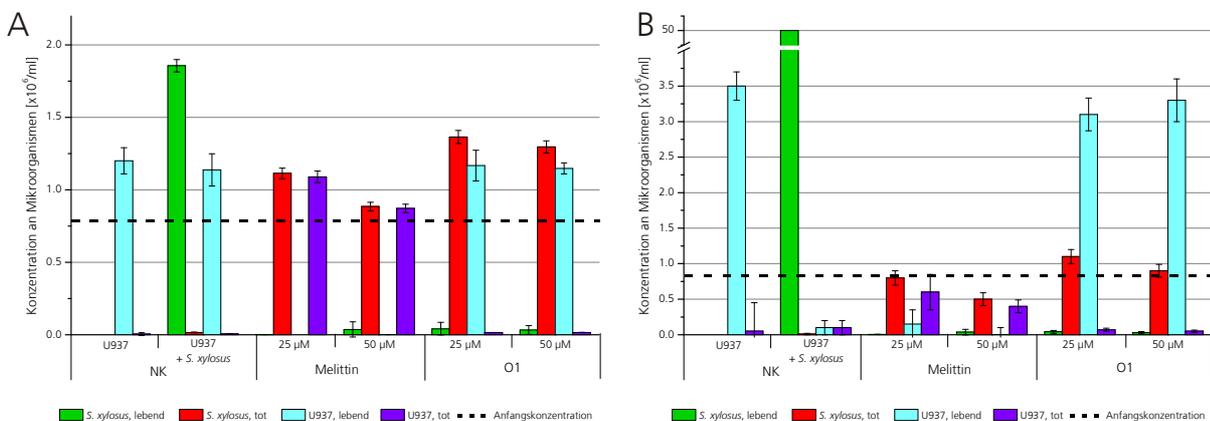


Abbildung 4.19: Quantitative, durchflusszytometrische Analyse von mit antimikrobiellem Peptid behandelten Mischkulturen. Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Differenzierung der U-937 Zellen und *S. xylosus*, anhand von Fluoreszenzeigenschaften, welche mittels einer Lebend-Tot Färbung realisiert wurden (n=4). Die Konzentrationen wurden unter Verwendung interner Kalibrierpartikel errechnet. **(A)** Dargestellt ist die Differenzierung der einzelnen Populationen nach einer Inkubation von 2 h. Die Inkubation mit dem antimikrobiellen Peptid Melittin resultierte in einer signifikanten Permeabilisierung der eu- und prokaryotischen Membranen, wohingegen die Applikation des optimierte Peptids O1 durch eine selektive Permeabilisierung der bakteriellen Membran charakterisiert war. **(B)** Dargestellt ist die Differenzierung der einzelnen Populationen nach einer Inkubation von 96 h. Nach einer Inkubation von 96 h wiesen die Negativkontrollen eine starke Erhöhung der Organismuskonzentrationen auf. Bei den mit Melittin inkubierten Mischkulturen konnte beobachtet werden, dass beide Organismen über permeabilisierte Membranen verfügten und deren Konzentration zudem keine Erhöhung im Vergleich zur Startkonzentration aufwies. Im Vergleich dazu resultierte die Inkubation der Mischkultur mit dem antimikrobiellen Peptid O1 in einer selektiven Permeabilisierung der bakteriellen Membran und einer damit verbundenen Inhibierung des Wachstums, wohingegen die Population der eukaryotischen Zellen durch eine starke Zunahme der Organismuskonzentration gekennzeichnet war.

4.2 Antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen

4.2.1 Kovalente Modifikation

Antimikrobielle Peptide verfügen über ein breites antimikrobielles Wirkspektrum, dessen charakteristische antimikrobielle Wirkung auf der direkten Permeabilisierung der bakteriellen Membran, oder aber der Inhibierung von essenziellen zellulären Prozessen beruht. In vielen Fällen verfügen sie über biologisch kompatible Eigenschaften, weshalb sie aussichtsreiche Kandidaten für die Entwicklung von antimikrobiell wirkenden Oberflächen darstellen. Jedoch gehen ihre charakteristische Interaktion mit den bakteriellen Membranen in vielen Fällen mit einer Veränderung der Konformation oder aber einer Aggregation mehrere Peptide einher. Außerdem finden oftmals Veränderungen der Orientierung relativ zur bakteriellen Membran statt. Demzufolge können ihre antimikrobiellen Aktivitäten aufgrund einer kovalenten Immobilisierung maßgeblich beeinträchtigt werden, weshalb ihre Aktivitäten in Lösung und im immobilisierten Zustand nicht zwangsläufig miteinander einhergehen. Im Zuge der Entwicklung von kovalenten, Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen wurden mehrere repräsentative antimikrobielle Peptide mittels verschiedener chemischer Reaktionen an Modelloberflächen immobilisiert, um die antimikrobiellen Aktivitäten genauer zu untersuchen. Außerdem wurde der Einfluss der Immobilisierungsstrategie auf die relative Menge der immobilisierten Peptide und die daraus resultierende Variation der antimikrobiellen Aktivität untersucht. Ferner wurden die zytotoxischen Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide im löslichen und immobilisierten Zustand evaluiert.

4.2.1.1 Quantifizierung von immobilisierten antimikrobiellen Peptiden

Für die relative Quantifizierung der antimikrobiellen Peptide im immobilisierten Zustand wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, welche entweder auf der charakteristischen Reaktion mit sequenzinternen Argininen oder aber mit sequenzinternen Lysinen beruhten. Zur Charakterisierung der verwendeten Quantifizierungsmethoden wurden zunächst Kalibrierungsmessungen in Lösung durchgeführt, um einerseits die Sensitivität und andererseits die Quantifizierbarkeit einzelner Peptide zu analysieren. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die PHQ Methode, als auch die Quantifizierung mittels Epicocconone dazu verwendet werden konnte, um eine relative Quantifizierung der antimikrobiellen Peptide, innerhalb des relevanten Konzentrationsbereichs, zu realisieren (Abbildung 4.20). Jedoch konnte unter Verwendung der PHQ Methode lediglich das antimikrobielle Peptid Protamin hinreichend genau quantifiziert werden, wohingegen die anderen analysierten Peptide nur sehr schlecht detektiert werden konnten (Abbildung 4.20 A). Dies spiegelte sich auch in den dazu korrespondierenden linearen Korrelationskoeffizienten wider, welche mit weniger als 0,770 deutlich geringer ausfielen als der des antimikrobiellen Peptids Protamin mit 0,959. Im Vergleich dazu konnten bei der Quantifizierung der antimikrobiellen Peptide in Lösung mittels Epicocconone deutlich bessere Korrelationen zwischen den Peptidkonzentrationen und den relativen Fluoreszenzen ermittelt werden (Abbildung 4.20 B). Dies resultierte in Korrelationsfaktoren zwischen 0,990 und 0,997. Darüber hinaus konnte beobachtet werden,

das die Varianz der Fluoreszenzintensitäten Peptid-übergreifend deutlich geringer ausfiel als bei der PHQ Methode. Aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit und der geringeren Abhängigkeit von der Primärsequenz der analysierten Peptide, wurde für die relative Quantifizierung der an der Oberfläche immobilisierten antimikrobiellen Peptide die Epicocconone Methode verwendet.

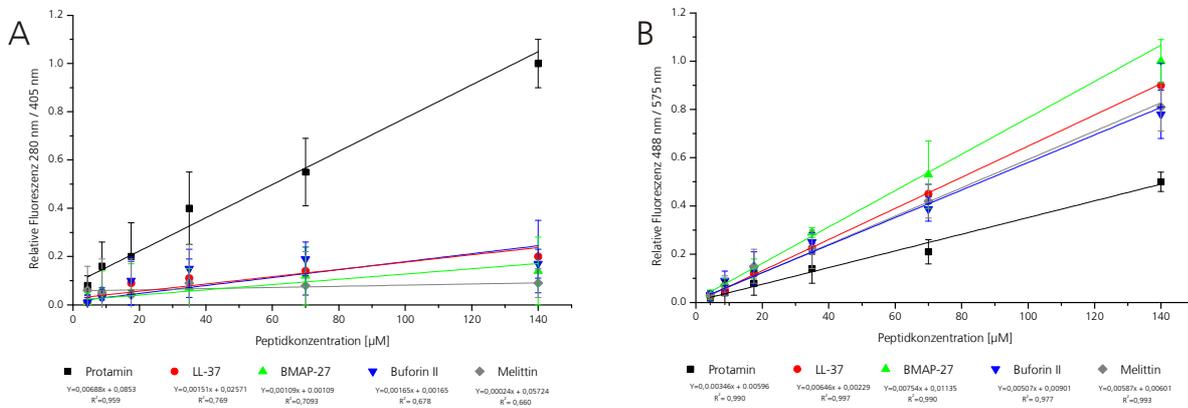


Abbildung 4.20: Relative Peptidquantifizierung verschiedener antimikrobieller Peptide in Lösung unter Verwendung der PHQ und Epicocconone Methode. (A) Dargestellt ist die relative Peptidquantifizierung von fünf gelösten antimikrobiellen Peptiden unter Verwendung der PHQ Methode, sowie die aus den Messungen errechneten linearen Regressionen ($n=4$). Während bei den Analysen der Protaminkonzentration ein linearer Zusammenhang zwischen der relativen Fluoreszenz und der eingesetzten Konzentration zu beobachten war, wies Protamin einen Korrelationskoeffizienten von 0,959 auf, während die anderen Peptide deutlich geringere Korrelationen aufwiesen. So ließen diese Peptide lediglich eine geringe Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der eingesetzten Peptidkonzentration erkennen, was sich auch in den Korrelationskoeffizienten widerspiegelte, deren Werte unterhalb von 0,770 lagen. **(B)** Dargestellt ist die relative Peptidquantifizierung von fünf gelösten antimikrobiellen Peptiden unter Verwendung der Epicocconone Methode, sowie die aus den Messungen errechneten linearen Regressionen ($n=4$). Sämtliche Peptide besaßen eine Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der analysierten Peptidkonzentration, wodurch Korrelationsfaktoren zwischen 0,990 und 0,997 errechnet wurden.

Für die Analyse der relativen Oberflächenbeladung wurde das antimikrobielle Peptid BMAP-27 mittels verschiedener chemischer Reaktionen auf planen Oberflächen immobilisiert (Abbildung 4.21 A). Hierbei ergab sich ein asymptotischer Anstieg der relativen immobilisierten Peptidmenge in Abhängigkeit der verwendeten Immobilisierungskonzentration. Prinzipiell waren sämtliche Oberflächen durch einen starken Anstieg der immobilisierten Peptidmenge bei steigenden Immobilisierungskonzentrationen geprägt, was in einer Sättigung bei hohen Immobilisierungskonzentrationen resultierte. Insbesondere wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich der relativen immobilisierten Peptidmenge unter Verwendung verschiedener Immobilisierungsstrategien deutlich. Während die Ausprägung einer Schiff'schen Base, durch die Kondensation der an der Oberfläche befindlichen funktionellen Aldehyde und der in den antimikrobiellen Peptiden enthaltenen Amine, in einer maximalen relativen Oberflächenbeladung von 0,95 im Vergleich zu der verwendeten NHS-Modifikation resultierte, führte die Verwendung einer PDITC- bzw. Epoxy-Modifikation zu einer relativen Peptidbeladung von 2,7 bzw. 2,3. Basierend auf dem asymptotischen Kurvenverlauf der immobilisierten Peptidmenge wurden ebenfalls die Immobilisierungskonzentrationen errechnet, bei welchen eine 90 %ige Beladung der Oberfläche mit antimikrobiellem Peptid realisiert wurde. Diesbezüglich ergaben sich Konzentrationen von $14,7 \mu\text{M}$ für die mit NHS, $25,4 \mu\text{M}$ für die mit Aldehyden, $41,1 \mu\text{M}$ für die mit PDITC und $47,1 \mu\text{M}$ für die mit Epoxiden modifizierten Oberflächen. Zur weiteren Verifizierung der relativen immobilisierten Peptidmenge, wurde das antimikrobielle Peptid BMAP-27 C-terminal mit einem Fluorophor modifiziert und ebenfalls auf

sämtlichen Oberflächen immobilisiert und die korrespondierende Fluoreszenz quantifiziert (Abbildung 4.21 B). Hierbei zeigte sich eine nahezu identische Abhängigkeit der relativen immobilisierten Peptidmenge von der verwendeten Immobilisierungskonzentration und der verwendeten chemischen Oberflächenmodifikation, im Vergleich zu der Quantifizierung mit Epicocconone. Lediglich bei geringen Immobilisierungskonzentrationen ließen sich leichte Abweichungen feststellen, welche jedoch keine signifikante Auswirkung auf die maximale Beladungsdichte besaßen.

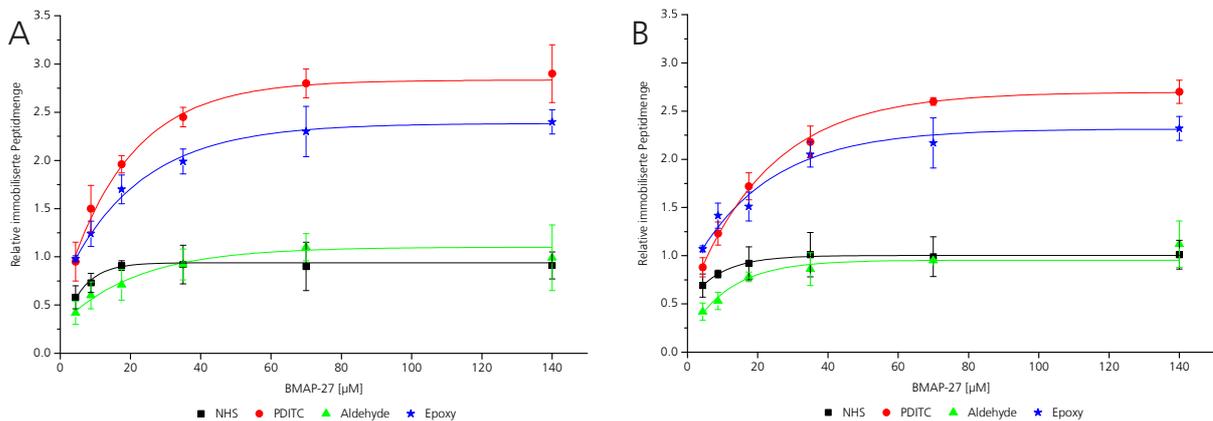


Abbildung 4.21: Relative Quantifizierung von immobilisiertem BMAP-27 auf verschiedenen modifizierten Oberflächen unter Verwendung der Epicocconone Methode, sowie unter Verwendung eines peptidinternen Fluorophores. (A) Dargestellt sind die Epicocconone-basierten, relativen Peptidquantifizierungen von BMAP-27, welches mittels unterschiedlicher chemischer Reaktionsstrategien immobilisiert wurde, sowie die aus den Messungen errechneten asymptotischen Regressionen ($n=4$). Sämtliche Peptide wiesen eine Abhängigkeit der relativen immobilisierten Peptidmenge von der verwendeten Immobilisierungskonzentration auf, welche einem asymptotischen Kurvenprofil entsprach. Hierbei resultierten jedoch unterschiedliche Oberflächenmodifikationen für die kovalente Immobilisierung in unterschiedlichen maximalen Beladungsdichten. Während die Verwendung von Aldehyd- und NHS-Modifikationen in relativen maximalen Peptidbeladungen von 0,95 und 1,0 resultierten, führte die Verwendung von PDITC- und mit Epoxy-Modifikationen zu relativen immobilisierten Peptidmengen von 2,7 bzw. 2,3. **(B)** Dargestellt sind die relativen Peptidquantifizierungen von fluoreszenzmarkiertem BMAP-27, welches mittels verschiedener chemischer Reaktionen immobilisiert wurde. Für die Quantifizierung wurde der peptidinterne Fluorophor Alexa 647 des BMAP-27-Derivats verwendet. Die Ergebnisse ließen eine nahezu identische Abhängigkeit der relativen immobilisierten Peptidmenge von der Immobilisierungskonzentration, im Vergleich zu den Epicocconone-basierten Quantifizierungen, erkennen.

4.2.1.2 Antimikrobielle Oberflächeneigenschaften

Für die Evaluierung der antimikrobiellen Eigenschaften der generierten Peptid-basierten Oberflächenbeschichtungen wurden zunächst die antimikrobiellen Aktivitäten der Peptide in Lösung untersucht und hinsichtlich ihrer minimalen inhibitorischen Konzentration, sowie ihrer Membran-permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber *E. coli* charakterisiert. Zusätzlich wurden die beiden Antibiotika Ampicillin und Polymyxin B als Referenzproben verwendet. Anhand der gemessenen MIC-Werte wurde ersichtlich, dass sämtliche analysierten Peptide und Antibiotika über eine generelle antimikrobielle Aktivität verfügten (Tabelle 4.15). Diesbezüglich wurden MIC-Werte zwischen 1 und 8 μM für die analysierten antimikrobiellen Peptide ermittelt, wobei BMAP-27 das bakterielle Wachstum bereits bei einer Konzentration von 1 μM vollständig inhibierte und somit die ausgeprägtesten antimikrobiellen Eigenschaften aufwies. Im Vergleich dazu resultierte die Applikation der analysierten Antibiotika in einer vollständigen Inhibierung des bakteriellen Wachstums bei der geringsten analysierten Konzentration von 0,25 μM . In Analogie zu den MIC-Werten besaß BMAP-27 ebenfalls die ausgeprägteste Membran-permeabilisierende Aktivität gegenüber *E. coli*, was in einer effektiven

Permeabilisierungskonzentration von 2 μM resultierte, bei welcher wenigstens 80 % der Bakterien durch eine signifikante Reduktion der Membranintegrität charakterisiert waren. Im Vergleich dazu führte die Applikation der antimikrobiellen Peptide LL-37 und Melittin zu einer effektiven Permeabilisierung der bakteriellen Membran bei Konzentrationen von 8 bzw. 32 μM . Im Gegensatz dazu demonstrierten die beiden Peptide Protamin und Buforin II eine vollständige Inhibierung des bakteriellen Wachstums bei Konzentrationen von 2 bzw. 8 μM . Deren Applikation resultierte jedoch in keiner Permeabilisierung der bakteriellen Membran innerhalb des analysierten Konzentrationsbereichs. Im Vergleich dazu konnten ebenfalls unterschiedliche Eigenschaften der getesteten Antibiotika hinsichtlich ihrer Membran-permeabilisierenden Eigenschaften identifiziert werden. Während die Applikation von Polymyxin B bereits bei einer Konzentration von 1 μM in einer effektiven Permeabilisierung der bakteriellen Membran resultierte, konnte durch die Interaktion des Antibiotikums Ampicillin mit den Bakterien keine signifikante Membranschädigung innerhalb des analysierten Konzentrationsbereichs festgestellt werden.

Tabelle 4.15: Biophysikalische, antimikrobielle und Membran-permeabilisierende Eigenschaften antimikrobieller Peptide gegenüber *E. coli*. Die Daten sind eine repräsentative Zusammenfassung von konzentrationsabhängigen Testreihen (n=4). Die Membranpermeabilisierung wurde anhand von durchflusszytometrischen Messungen ermittelt, bei welchen Konzentrationen zwischen 0,25 und 64 μM analysiert wurden. Angegeben ist die geringste Konzentration, bei welcher mindestens 80 % der Bakterien eine signifikante Beschädigung der Membran aufwiesen.

Peptid	Sequenz	H	μ	Z	MIC <i>E. coli</i> [μM]	80 % Membran-permeabilisierung [μM]
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	0,201	0,521	6	4	8
BMAP-27	GRFKRFRKKFKKLFKKLSPVIPLLHLG	0,380	0,456	10	1	2
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	0,511	0,394	5	8	32
Polymyxin B	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	<0,25	1
Buforin II	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	0,210	0,367	6	2	>64
Protamin	MPPRRRSSSRPVRRRRPRVSRRRRRGGRRR	-0,454	0,086	20	8	>64
Ampicillin	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	<0,25	>64

Für die Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften der zuvor charakterisierten Peptide im immobilisierten Zustand, wurden Peptid-basierte Oberflächenbeschichtungen unter Verwendung verschiedener chemischer Reaktionen generiert. Die daraus resultierenden antimikrobiellen Eigenschaften waren durch erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Membran-permeabilisierenden Eigenschaften als auch der Reduktion von koloniebildenden Einheiten gekennzeichnet (Abbildung 4.22, Tabelle 4.16). Die beiden verwendeten Antibiotika, welche mittels einer NHS-basierten Reaktionschemie immobilisiert wurden, verfügten im immobilisierten Zustand über vollständig unterschiedliche Aktivitäten. Während die mit Polymyxin B modifizierten Oberflächen zu einer nahezu vollständigen Permeabilisierung der bakteriellen Population in Kombination mit einer Reduktion der koloniebildenden Einheiten um mehr als 3 Zehnerpotenzen führten, konnten durch die Interaktion der Bakterien mit den Ampicillin-modifizierten Oberflächen weder permeabilisierende noch wachstumshemmende Aktivitäten beobachtet werden. Somit entsprachen die antimikrobiellen Aktivitäten der Ampicillin-modifizierten Oberflächen denen der unbehandelten oder chemisch inaktivierten Oberflächen. Zudem konnten anhand der durchflusszytometrischen Messungen maßgebliche Differenzen bei den bakteriellen Konzentrationen nach

der Interaktion mit den modifizierten Oberflächen detektiert werden. Während die Interaktion mit den Polymyxin B-modifizierten Oberflächen in einer Bakterienkonzentration von $1,1 \times 10^6$ Bakterien/ml resultierte und somit lediglich in einer leichten Erhöhung im Vergleich zu der anfänglichen Bakterienkonzentration von $0,95 \times 10^6$ Bakterien/ml, verzeichneten die mit Ampicillin modifizierten Oberflächen mit $1,9 \times 10^6$ Bakterien/ml eine ca. 2-fache Erhöhung der Bakterienkonzentration im Vergleich zur Startkonzentration.

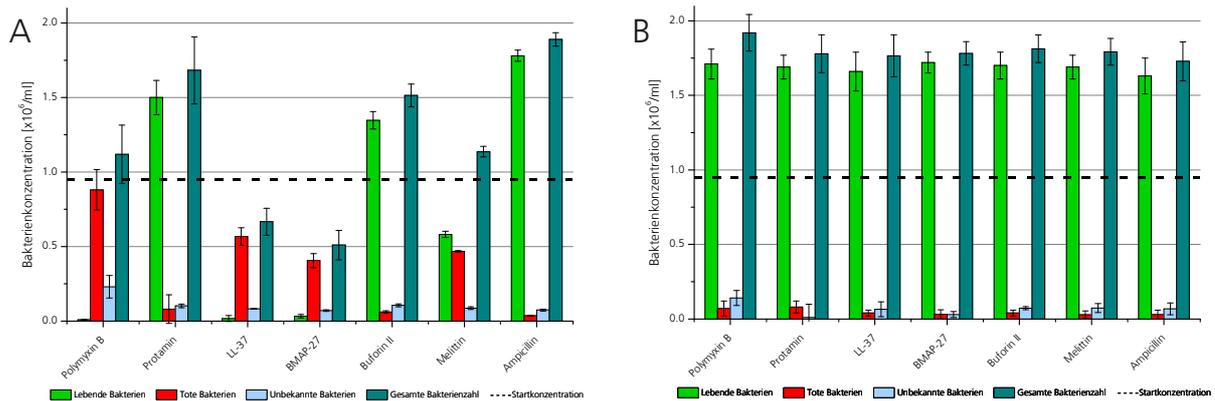


Abbildung 4.22: Membran-permeabilisierende Eigenschaften von immobilisierten antimikrobiellen Peptiden. Dargestellt ist die Differenzierung unterschiedlicher Populationen von *E. coli* anhand von Fluoreszenzeigenschaften, welche mittels einer Lebend-Tot Färbung in Kombination mit durchflusszytometrischen Messungen ermittelt wurden ($n=4$). Ferner sind die Gesamtkonzentrationen angegeben, welche unter Verwendung eines Partikel-basierten internen Kalibrierungssystems errechnet wurden. **(A)** Dargestellt sind die Permeabilisierungen der bakteriellen Membran von *E. coli* aufgrund der Interaktion mit immobilisierten antimikrobiellen Peptiden, welche unter Verwendung von NHS-modifizierten Oberflächen mit einer Immobilisierungskonzentration von $140 \mu\text{M}$ generiert wurden. Die Peptide wiesen unterschiedliche permeabilisierende Eigenschaften hinsichtlich der bakteriellen Membran auf. Während die Interaktion mit LL-37-, BMAP-27- und Polymyxin B-modifizierten Oberflächen in bakteriellen Populationen mit permeabilisierten Membranen resultierte, führte eine Interaktion mit Protamin-, Buforin II- und Ampicillin-modifizierten Oberflächen zu keinen signifikanten Beschädigungen. Die mit dem antimikrobiellen Peptid Melittin modifizierten Oberflächen besaßen im Vergleich zu den LL-37-, BMAP-27- und Polymyxin B-modifizierten Oberflächen geringere permeabilisierende Eigenschaften. **(B)** Dargestellt sind die Permeabilisierungen der bakteriellen Membran von *E. coli* aufgrund der Interaktion mit den Inkubationsüberständen der Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen. Bei der Analyse der Inkubationsüberstände konnten keine permeabilisierenden Eigenschaften festgestellt werden, wodurch lediglich Bakterien mit intakten Membranen detektiert wurden. Darüber hinaus waren sämtliche bakterielle Populationen durch eine signifikante Erhöhung der Bakterienkonzentration im Vergleich zur Startkonzentration gekennzeichnet.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei den mittels NHS-basierter Reaktionschemie immobilisierten Peptiden beobachtet werden (Abbildung 4.22, Tabelle 4.16). Hierbei resultierte die Interaktion der Bakterien mit den LL-37- oder BMAP-27-modifizierten Oberflächen in einer Reduktion der koloniebildenden Einheiten von mehr als 3 Zehnerpotenzen in Kombination mit einer signifikanten Permeabilisierung von mehr als 90 % der Bakterien. Im Vergleich dazu resultierte die Interaktion der Bakterien mit den Melittin-modifizierten Oberflächen in einer deutlich geringeren antimikrobiellen Aktivität, wodurch eine Reduktion der koloniebildenden Einheiten von einer Zehnerpotenz und eine Permeabilisierung der Bakterienmembran bei ca. 49 % der Mikroorganismen detektiert werden konnte. Darüber hinaus konnten anhand durchflusszytometrischer Messungen Differenzen bezüglich der gesamten Bakterienkonzentration beobachtet werden. So resultierte die Interaktion mit den BMAP-27- und LL-37-modifizierten Oberflächen in einer Reduktion der Bakterienkonzentration um ca. 45 bzw. 63 %, wohingegen bei den Melittin-modifizierten Oberflächen eine leichte Erhöhung auf $1,1 \times 10^6$ Bakterien/ml im Vergleich zu der Ausgangskonzentration detektiert werden konnte. Im Vergleich

dazu ließ die Interaktion der Bakterien mit den Protamin- und Buforin II-modifizierten Oberflächen eine deutlich andere Tendenz erkennen. Es konnten weder wachstumsinhibierende noch permeabilisierende Eigenschaften durch die an der Oberfläche immobilisierten antimikrobiellen Peptide beobachtet werden. Aufgrund zytometrischer Messungen konnte lediglich die Erhöhung der Bakterienkonzentration auf 1,5 bzw. $1,7 \times 10^6$ Bakterien/ml festgestellt werden. Eine ähnliche Tendenz konnte auch bei den Peptid-basierten Oberflächenbeschichtungen beobachtet werden, welche unter Verwendung einer Aldehyd-basierten Kondensationsreaktion modifiziert wurden (Tabelle 4.16). Diesbezüglich konnte ebenfalls eine nahezu vollständige Permeabilisierung der bakteriellen Population durch die Interaktion mit den BMAP-27-, LL-37- sowie den Polymyxin B-modifizierten Oberflächen nachgewiesen werden. Ebenso war eine Reduktion der koloniebildenden Einheiten im Vergleich zu unbehandelten oder inaktivierten Oberflächen um mehr als 3 Zehnerpotenzen erkennbar. In Analogie zu der verwendeten NHS-basierten Reaktionschemie, resultierte die Verwendung einer Aldehyd-basierten Reaktionschemie in Kombination mit dem antimikrobiellen Peptid Melittin in einer geringeren antimikrobiellen Aktivität im Vergleich zu den Peptiden BMAP-27 und LL-37. Zudem konnten ebenfalls keine antimikrobiellen Eigenschaften durch die Peptide Protamin und Buforin II im immobilisierten Zustand detektiert werden. Im Vergleich zu den NHS- und Aldehyd-modifizierten Oberflächen führte die Verwendung von PDITC- und Epoxy-modifizierten Oberflächen zu gegenteiligen Ergebnissen. Prinzipiell waren die antimikrobiellen Aktivitäten deutlich weniger ausgeprägt als bei den verwendeten NHS- und Aldehyd-basierten Immobilisierungsstrategien. Dies spiegelte sich in einer Reduktion der Membran-permeabilisierende, sowie wachstumsinhibierenden Eigenschaften der immobilisierten antimikrobiellen Peptide BMAP-27, LL-37 und Melittin wieder. Die verwendete PDITC-basierte Immobilisierungsstrategie resultierte in dem kompletten Verlust der antimikrobiellen Aktivität von Melittin, wohingegen unter Verwendung einer Epoxy-basierten Immobilisierungsstrategie lediglich geringe Aktivitäten nachweisbar waren. Analog dazu resultierte die Immobilisierung von BMAP-27 unter Verwendung einer PDITC- oder Epoxy-basierten Reaktionschemie ebenfalls in einer drastischen Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften im Vergleich zu den NHS- und Aldehyd-basierten Immobilisierungsstrategien. Als Folge dessen konnte lediglich die Reduktion der koloniebildenden Einheiten um 1,0 bzw. 1,6 Zehnerpotenzen in Kombination mit einer lediglich 50 %igen Permeabilisierung der Bakterien beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnten keine antimikrobiellen Aktivitäten durch die Interaktion mit den immobilisierten Peptiden Protamin und Buforin II bei keiner verwendeten chemischen Immobilisierungsstrategie identifiziert werden.

Tabelle 4.16: Zusammenfassung der Aktivitäten von immobilisierten antimikrobiellen Peptiden. Dargestellt sind die wachstumsinhibierenden und Membran-permeabilisierenden Eigenschaften von antimikrobiellen Peptiden, welche unter Verwendung verschiedener chemisch aktivierter Oberflächen kovalent immobilisiert wurden (n=4). Die Negativkontrolle (NK) ist eine repräsentative Zusammenfassung von unmodifizierten, sowie chemisch modifizierten und anschließend inaktivierten Oberflächen.

Peptid	Überlebende Bakterien [Log KBE/mL]				Menge permeabilisierter Bakterien [%]			
	NHS	Aldehyd	PDITC	Epoxy	NHS	Aldehyd	PDITC	Epoxy
LL-37	<3	<3	5,9	5,9	97,0	95,0	13,0	20,0
BMAP-27	<3	<3	4,4	5,0	93,0	96,0	48,0	45,0
Melittin	5,1	5,1	6,2	5,3	49,0	54,0	5,0	17,0
Polymyxin B	<3	<3	4,9	4,6	>98	95,0	53,0	61,0
Buforin II	5,9	6,3	6,3	6,2	11,0	8,0	7,0	8,0
Protamin	6,3	6,1	6,5	6,0	11,0	11,0	9,0	7,0
Ampicillin	6,4	6,2	6,0	5,8	6,0	9,0	11,0	10,0
NK	6,3	6,2	6,5	6,3	6,0	11,0	8,0	8,0

Für die weitere Untersuchung der Peptid-vermittelten antimikrobiellen Eigenschaften im immobilisierten Zustand wurde das antimikrobielle Peptid BMAP-27 unter Verwendung von PDITC- und NHS-modifizierten Oberflächen immobilisiert, wobei unterschiedliche Konzentrationen verwendet wurden. Analog zu den zuvor generierten antimikrobiellen Oberflächenmodifikationen resultierte eine 140 μM Immobilisierungskonzentration in Kombination mit einer NHS-modifizierten Oberfläche in einer nahezu vollständigen Permeabilisierung, sowie einer Reduktion der koloniebildenden Einheiten von mehr als 3 Zehnerpotenzen (Tabelle 4.17, Abbildung 4.23 A). Die Reduktion der Immobilisierungskonzentration resultierte ab einer Konzentration von 8,8 μM in verringerten antimikrobiellen Eigenschaften. Hierbei konnte lediglich bei ca. 50 % der Bakterien eine signifikante Beschädigung der bakteriellen Membran festgestellt werden, wohingegen die verbliebenen Bakterien, basierend auf ihren Fluoreszenzeigenschaften, in etwa zu gleichen Anteilen als Bakterien mit intakten oder unbekanntem Membranintegritäten klassifiziert wurden. Außerdem konnte ab dieser Immobilisierungskonzentration eine Reduktion der wachstumsinhibierenden Eigenschaften festgestellt werden, was lediglich in der Verminderung der koloniebildenden Einheiten von einer Zehnerpotenz im Vergleich zur Negativkontrolle resultierte. Eine weitere Reduktion der Immobilisierungskonzentration auf 4,4 μM führte darüber hinaus zu dem vollständigen Verlust der antimikrobiellen Eigenschaften des immobilisierten Peptids. Neben den antimikrobiellen Eigenschaften konnte anhand durchflusszytometrischer Messungen auch eine Reduktion der gesamten Bakterienkonzentration um ca. 60 %, im Vergleich zu der Startkonzentration, bei sämtlichen Oberflächen, welche auch permeabilisierende Eigenschaften besaßen, beobachtet werden. Basierend auf dieser Beobachtung wurden die Oberflächen im Anschluss an die Versuche hinsichtlich adhäsiv gebundener Bakterien mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Jedoch konnte bei keiner Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenmodifikation eine adhäsive Anlagerung von Bakterien festgestellt werden.

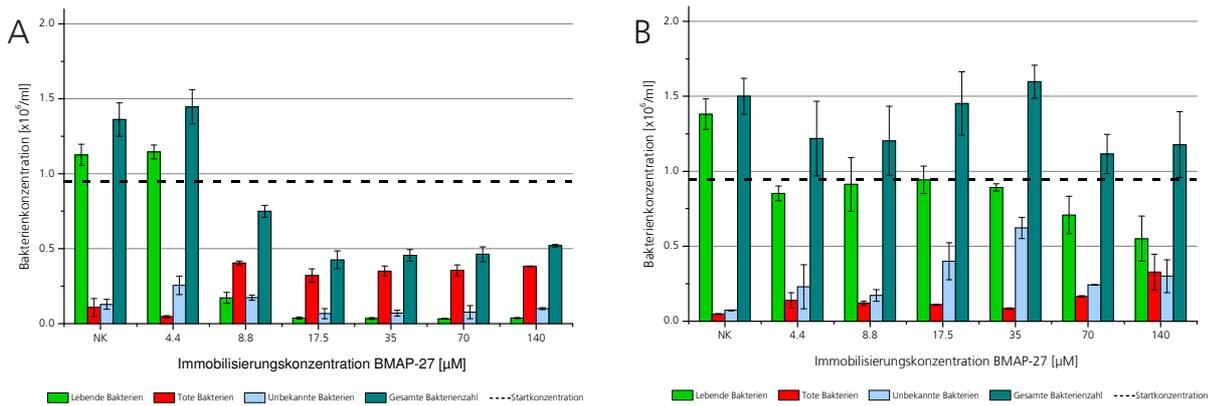


Abbildung 4.23: Immobilisierungskonzentrationsabhängige Membranpermeabilisierung von *E. coli* durch BMAP-27-modifizierte Oberflächen. Dargestellt ist die Differenzierung unterschiedlicher Populationen von *E. coli* anhand von Fluoreszenzeigenschaften, welche mittels einer Lebend-Tot Färbung in Kombination mit durchflusszytometrischen Messungen ermittelt wurden ($n=4$). Ferner sind die Gesamtkonzentrationen angegeben, welche unter Verwendung eines Partikel-basierten internen Kalibrierungssystems errechnet wurden. **(A)** Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Permeabilisierung der bakteriellen Membran von *E. coli* aufgrund der Interaktion mit BMAP-27-basierten Oberflächenbeschichtungen, denen NHS-modifizierte Oberflächen zugrunde lagen. Bei Konzentrationen von mehr als $8,8 \mu\text{M}$ konnte eine Permeabilisierung bei nahezu sämtlichen Bakterien beobachtet werden. Zudem konnte bei sämtlichen Proben eine reduzierte Bakterienkonzentration im Vergleich zur Startkonzentration und der Negativkontrolle gemessen werden. Bei einer Immobilisierungskonzentration von $8,8 \mu\text{M}$ zeigte sich bereits eine Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften im Vergleich zu höheren Konzentration. **(B)** Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Permeabilisierung der bakteriellen Membran von *E. coli* aufgrund der Interaktion mit BMAP-27-basierten Oberflächenbeschichtungen, denen PDITC-modifizierte Oberflächen zugrunde lagen. Lediglich bei einer Immobilisierungskonzentration von $140 \mu\text{M}$ konnten geringe permeabilisierende Eigenschaften gegenüber den Bakterien nachgewiesen werden. Diese Aktivität nahm mit verringerten Konzentration ab und resultierte ab einer Konzentration von $35 \mu\text{M}$ in Oberflächenbeschichtungen, welche über keine signifikanten antimikrobiellen Eigenschaften verfügten.

Im Vergleich zu den NHS-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen resultierte die Verwendung einer PDITC-basierten Immobilisierungsstrategie in deutlich geringeren antimikrobiellen Aktivitäten. Hierbei zeigte sich in Analogie zu den vorangegangenen Experimenten, dass bei einer Immobilisierungskonzentration von $140 \mu\text{M}$ lediglich eine Reduktion der koloniebildenden Einheiten von ca. 1,6 Zehnerpotenzen detektiert werden konnte (Abbildung 4.23 B). Dazu korrespondierend konnte anhand durchflusszytometrischer Messungen lediglich eine Permeabilisierung bei ca. 47 % der bakteriellen Population detektiert werden. Die sukzessive Reduktion der Immobilisierungskonzentration führte, in Analogie zu den NHS-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen zu einer signifikanten Reduktion der antimikrobiellen Oberflächeneigenschaften. Daraus folgte, dass bei einer Konzentration unterhalb von $70 \mu\text{M}$ keine antimikrobiellen Aktivitäten mehr identifiziert werden konnten. Um während der Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften der Peptide im immobilisierten Zustand die ungewollte Freisetzung von Peptiden aufgrund verbliebener adhäsiv gebundener Moleküle oder aber aufgrund der Hydrolyse von instabilen kovalenten chemischen Verbindungen ausschließen zu können, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Anhand der analysierten Inkubationsüberstände der Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen konnten keine permeabilisierenden oder wachstumshemmenden Eigenschaften verzeichnet werden (Abbildung 4.22 B).

Tabelle 4.17: Immobilisierungskonzentrationsabhängige Inhibierung des bakteriellen Wachstums von *E. coli* durch BMAP-27-basierte antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen. Dargestellt sind die wachstumsinhibierenden Eigenschaften des immobilisierten Peptids BMAP-27 in Abhängigkeit der verwendeten Oberflächenmodifikation, sowie der Immobilisierungskonzentration (n=4). Darüber hinaus sind die relativen immobilisierten Peptidmengen angegeben, wobei diese entweder auf die Werte einer 140 µM Konzentration in Kombination mit einer NHS- oder PDITC-Modifikation normalisiert wurden.

Immobilisierungskonzentration [µM]	NHS		PDITC		
	relative Menge bezüglich NHS	Überlebende Bakterien [Log KBE/ml]	relative Menge bezüglich NHS	relative Menge bezüglich PDITC	Überlebende Bakterien [Log KBE/ml]
NK	n. a.	6,1	n. a.	n. a.	6,1
4,4	0,69	6,3	0,88	0,33	5,8
8,8	0,81	4,7	1,23	0,46	6,0
17,5	0,92	<3	1,72	0,64	5,7
35	1,01	<3	2,18	0,81	5,7
70	0,99	<3	2,6	0,96	5,5
140	1,00	<3	2,7	1,00	4,4

4.2.1.3 Zytotoxizität von antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen

Neben den antimikrobiellen Eigenschaften der Peptid-basierten kovalenten Oberflächenbeschichtungen sind darüber hinaus auch die biologischen Kompatibilitäten von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund wurden die antimikrobiellen, sowie zytotoxischen Eigenschaften, des antimikrobiellen Peptids BMAP-27 im löslichen, sowie im immobilisierten Zustand genauer untersucht. Hierfür wurden zunächst anhand durchflusszytometrischer Messungen die Membran-permeabilisierenden Eigenschaften des antimikrobiellen Peptids BMAP-27 in Lösung sowohl gegenüber den Bakterien als auch den eukaryotischen U-937 Zellen analysiert. Wie bereits in früheren Ergebnissen konnten starke Membran-permeabilisierende Eigenschaften gegenüber beiden Organismen beobachtet werden (Abbildung 4.24). Während eine effektive Permeabilisierung der bakteriellen Membran ab einer Peptidkonzentration von 2 µM eintrat (Abbildung 4.24 A), waren permeabilisierende Eigenschaften gegenüber der eukaryotischen Membran ab einer Konzentration von 4 µM feststellbar, bei welcher ca. 50 % der analysierten Zellen eine signifikante Beeinträchtigung der Membranpermeabilität aufwiesen (Abbildung 4.24 B). Diese zytotoxischen Eigenschaften gingen mit der Steigerung der Peptidkonzentration einher, wodurch ab einer Konzentration von 8 µM nahezu sämtliche Zellen über beschädigte Membranen verfügten.

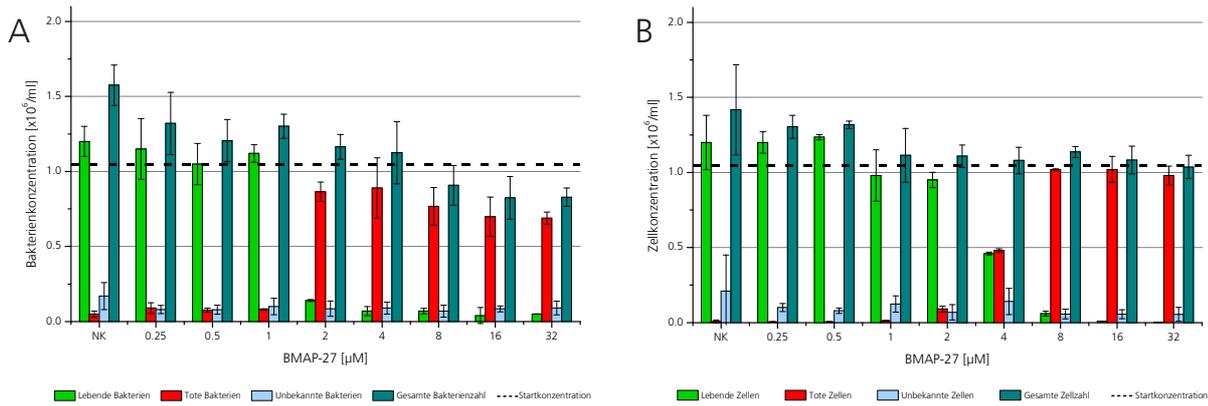


Abbildung 4.24: Konzentrationsabhängige Membranpermeabilisierung von *E. coli* und U-937 Zellen durch das gelöste antimikrobielle Peptid BMAP-27. Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Differenzierung unterschiedlicher Populationen von *E. coli* und U-937 Zellen anhand von Fluoreszenzeigenschaften, welche mittels einer Lebend-Tot Färbung in Kombination mit durchflusszytometrischen Messungen ermittelt wurden ($n=4$). Ferner sind die Gesamtkonzentrationen angegeben, welche unter Verwendung eines Partikel-basierten internen Kalibrierungssystems errechnet wurden. **(A)** Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Permeabilisierung der bakteriellen Membran von *E. coli* aufgrund der Interaktion mit gelöstem BMAP-27. Ab einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ konnte eine nahezu vollständige Membranpermeabilisierung der bakteriellen Population festgestellt werden, wohingegen geringere Konzentrationen zu keinen signifikanten Beschädigungen der Membran führten und somit den Ergebnissen der Negativkontrolle entsprachen. **(B)** Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Permeabilisierung der eukaryotischen Membran von U-937 Zellen aufgrund der Interaktion mit gelöstem BMAP-27. Ab einer Konzentration von $8 \mu\text{M}$ konnte eine signifikante Permeabilisierung bei nahezu der gesamten Zellpopulation detektiert werden, wohingegen bei geringeren Konzentrationen keine maßgeblichen Beschädigungen der eukaryotischen Membran erkennbar waren.

Obwohl das antimikrobielle Peptid BMAP-27 in Lösung über ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften verfügte, konnten nach der Immobilisierung, unter Verwendung einer NHS-basierten chemischen Ligation, keine zytotoxischen Eigenschaften durch die direkte Interaktion der eukaryotischen Zellen mit den antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen beobachtet werden. Diese Tendenz war nicht nur bei individuellen Experimenten mit einzelnen Mikroorganismen zu beobachten, sondern konnte zudem auch anhand von Mischkulturen verifiziert werden (Abbildung 4.25 A). Hierbei konnte eine selektive Permeabilisierung der bakteriellen Membran beobachtet werden. Dies wurde ab einer Immobilisierungskonzentration von $8,8 \mu\text{M}$ sichtbar, bei welcher sowohl Bakterien mit beschädigten als auch intakten Membranen detektiert werden konnten. Bei Immobilisierungskonzentrationen von mehr als $8,8 \mu\text{M}$ hingegen waren nahezu sämtliche Bakterien durch signifikante Membranschädigungen gekennzeichnet, wohingegen die Permeabilität der eukaryotischen Zellen nicht beeinflusst wurde. Diese Tendenz setzte sich bis zur höchsten Immobilisierungskonzentration von $140 \mu\text{M}$ fort. Im Vergleich dazu resultierten Oberflächenbeschichtungen, welche unter Verwendung einer $4,4 \mu\text{M}$ Immobilisierungskonzentration generiert wurden weder in Beschädigungen der bakteriellen noch der eukaryotischen Membran und die gemessenen Populationen entsprachen, sowohl hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften als auch ihrer analysierten Konzentrationen, denen der Negativkontrolle. Im Anschluss an die Analyse der direkten antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften wurde, durch eine ausgedehnte Inkubation der Mischkulturen auf den antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen für weitere 72 h, der Einfluss auf die Lebensfähigkeit der einzelnen Organismen untersucht. Es zeigte sich, dass bei Immobilisierungskonzentrationen von mehr als $17,5 \mu\text{M}$ das bakterielle Wachstum erheblich inhibiert wurde, wodurch Konzentrationen von ca. $0,8 \times 10^6$ Bakterien/ml gemessen wurden, welche außerdem maßgebliche Beschädigungen der bakteriellen Membran aufwiesen (Abbildung 4.25 B). Des Weiteren konnte bei diesen Konzentrationen eine Steigerung der Anzahl der U-937 Zellen auf mehr als

3×10^6 Zellen/ml beobachtet werden, welche im Vergleich zu den Bakterien keinerlei Beschädigungen der Zellmembran besaßen. Im Vergleich dazu führten die antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen, bei welchen Konzentrationen von weniger als $17,5 \mu\text{M}$ BMAP-27 in Kombination mit einer NHS-basierten chemischen Ligation verwendet wurde, zu deutlich anderen Ergebnissen. Diesbezüglich konnte ein drastischer Anstieg der bakteriellen Konzentration auf mehr als 50×10^6 Bakterien/ml festgestellt werden, welche darüber hinaus keine beschädigten Membranen besaßen. Ferner konnte aufgrund der stark gestiegenen Bakterienkonzentration keine hinreichend genaue Analyse der eukaryotischen Zellen mehr durchgeführt werden. Somit entsprachen die Ergebnisse der kovalenten Oberflächenmodifikationen, bei welchen Immobilisierungskonzentrationen von weniger als $17,5 \mu\text{M}$ verwendet wurden, denen der Negativkontrollen.

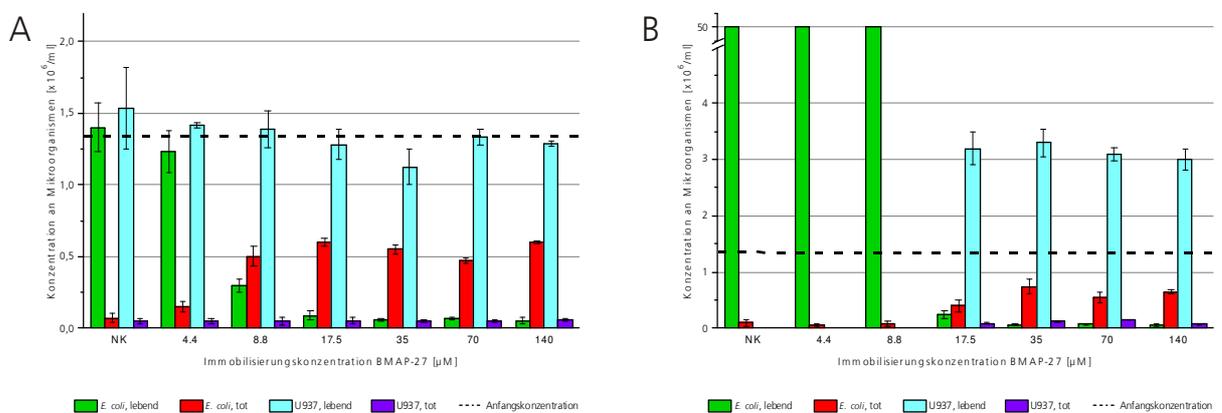


Abbildung 4.25: Immobilisierungskonzentrationsabhängige Membranpermeabilisierung von Mischkulturen aus *E. coli* und U-937 Zellen durch BMAP-27-basierte antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen. Dargestellt ist die Differenzierung unterschiedlicher Populationen von Mischkulturen bestehend aus *E. coli* und U-937 Zellen anhand von Fluoreszenzeigenschaften, welche mittels einer Lebend-Tot Färbung in Kombination mit durchflusszytometrischen Messungen ermittelt wurden ($n=4$). Ferner sind die Gesamtkonzentrationen angegeben, welche unter Verwendung eines Partikel-basierten internen Kalibrierungssystems errechnet wurden. **(A)** Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Permeabilisierung der bakteriellen Membran von *E. coli* und U-937 Zellen aufgrund der Interaktion mit BMAP-27-basierten Oberflächenbeschichtungen, denen NHS-modifizierte Oberflächen zugrunde lagen. Bei Immobilisierungskonzentrationen von mehr als $8,8 \mu\text{M}$ konnte eine Permeabilisierung bei nahezu sämtlichen Bakterien beobachtet werden, wohingegen die eukaryotischen Membranen keine Beschädigungen erkennen ließen. **(B)** Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Permeabilisierung der bakteriellen Membran von *E. coli* und U-937 Zellen nach einer verlängerten Inkubation von 72 h auf BMAP-27-basierten Oberflächenbeschichtungen, denen NHS-modifizierte Oberflächen zugrunde lagen. Ab einer Immobilisierungskonzentration von mehr als $17,5 \mu\text{M}$ waren die analysierten Bakterien durch signifikante bakterielle Membranschädigungen gekennzeichnet, wohingegen die Permeabilität der eukaryotischen Zellen nicht beeinträchtigt war. Darüber hinaus verzeichneten die eukaryotischen Zellen mit mehr als 3×10^6 Zellen/ml eine 3-fache Steigerung im Vergleich zur Anfangskonzentration, wohingegen die Bakterienkonzentration mit ca. $0,8 \times 10^6$ Bakterien/ml durch keine Erhöhung gekennzeichnet war. Bei Konzentrationen unterhalb von $17,5 \mu\text{M}$ konnte ein starker Anstieg der Bakterienkonzentration mit intakten Membranen detektiert werden, welcher eine hinreichend genaue Analyse der eukaryotischen Zellen verhinderte.

4.2.1.4 Kovalente Immobilisierung von BMAP-27 in PLL-basierten Netzwerken

Da vorangegangene Experimente gezeigt haben, dass das antimikrobielle Peptid BMAP-27 in Kombination mit einer NHS-basierten chemischen Ligation dazu geeignet ist kovalente antimikrobielle Oberflächenbeschichtung zu generieren, bei welchen lediglich geringe Immobilisierungskonzentrationen notwendig sind, wurden Versuche durchgeführt diese Peptid-basierte kovalente Modifikation mit den generierten adsorptiv angelagerten PLL-Netzwerken zu kombinieren. Hierfür wurden PLL-Netzwerke mit unterschiedlichen Komplexitäten auf planen Oberflächen generiert sowie carboxyliert und im Anschluss daran unter Verwendung einer NHS-basierten chemischen Ligation kovalent mit dem antimikrobiellen Peptid BMAP-27 modifiziert. Darauf folgend wurden die Oberflächen mittels mehrmaliger Waschschriffe über mehrere Tage hinweg von verbliebenen adsorptiv angelagerten Peptiden gesäubert und anschließend die Membran-permeabilisierenden Eigenschaften der antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen durch den direkten Kontakt mit *E. coli* analysiert. Hierbei konnte zunächst festgestellt werden, dass ein auf 4 Schichten basierendes PLL-Netzwerk ohne die kovalente Immobilisierung des Peptids keine permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber *E. coli* aufwies (Abbildung 4.26 A).

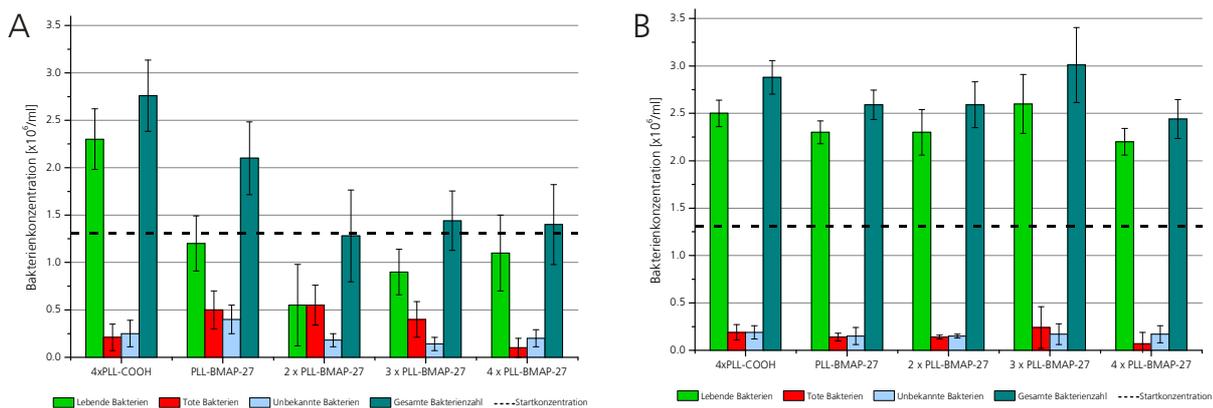


Abbildung 4.26: Membranpermeabilisierung von *E. coli* aufgrund der Interaktion mit PLL- und BMAP-27-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen. Dargestellt ist die Differenzierung unterschiedlicher Populationen von *E. coli* anhand von Fluoreszenzeigenschaften, welche mittels einer Lebend-Tot Färbung in Kombination mit durchflusszytometrischen Messungen ermittelt wurden (n=4). Ferner sind die Gesamtkonzentrationen angegeben, welche unter Verwendung eines Partikel-basierten internen Kalibrierungssystems errechnet wurden. **(A)** Dargestellt ist die Permeabilisierung der bakteriellen Membran von *E. coli* aufgrund der direkten Interaktion mit den generierten PLL-basierten Oberflächenbeschichtungen, welche mittels einer NHS-vermittelten chemischen Ligation kovalent mit dem antimikrobiellen Peptid BMAP-27 und einer Immobilisierungskonzentration von 140 μ M modifiziert wurden. Während die Verwendung einer einfachen PLL-Schicht zu Oberflächenmodifikationen mit geringen permeabilisierenden Eigenschaften führte, konnten diese Charakteristiken durch die Integration einer zweiten PLL-Schicht in das Netzwerk verstärkt werden. Im Vergleich dazu wiesen jedoch BMAP-27-modifizierte PLL-Netzwerke, bei welchen mehr als zwei PLL-Schichten verwendet wurden deutlich reduzierte permeabilisierende Eigenschaften auf. **(B)** Dargestellt ist die Permeabilisierung der bakteriellen Membran von *E. coli* aufgrund der Interaktion mit den Inkubationsüberständen der Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen. Bei der Analyse der Inkubationsüberstände konnten keine permeabilisierenden Eigenschaften festgestellt werden, wodurch lediglich Bakterien mit intakten Membranen detektiert wurden.

Durch die Verwendung einer einzelnen PLL-Schicht in Kombination mit immobilisiertem BMAP-27 konnten geringe permeabilisierende Eigenschaften beobachtet werden, wodurch die Konzentration der Bakterien mit intakten Membranen auf $1,2 \times 10^6$ Bakterien/ml und somit um ca. 50 % im Vergleich zur Negativkontrolle reduziert wurde. Mit zunehmender Komplexität der PLL-Netzwerke war eine Steigerung der antimikrobiellen Aktivität nachweisbar, was zu einer Reduktion der Bakterien mit intakten Membranen

auf $0,6 \times 10^6$ Bakterien/ml durch die Verwendung einer 2. PLL-Schicht führte. Im Gegensatz dazu resultierte die weitere Steigerung der Komplexität des PLL-Netzwerks durch die Integration einer 3. und 4. Schicht in der Reduktion der Membran-permeabilisierenden Eigenschaften. So ergab sich, dass die Konzentration der Bakterien mit intakten Membranen durch die Verwendung eines aus 4 Schichten bestehenden PLL-Netzwerks erneut auf $1,1 \times 10^6$ Bakterien/ml anstieg. Außerdem konnten dabei nahezu keine Bakterien mit permeabilisierten Membranen detektiert werden. Des Weiteren war jedoch zu beobachten, dass sämtliche bakteriellen Gesamtkonzentrationen, eine deutliche Reduktion im Vergleich zu den analysierten Negativkontrollen besaßen. Basierend auf dieser Beobachtung wurden die Oberflächen im Anschluss an die Versuche hinsichtlich adhäsiv gebundener Bakterien mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Es wurde ersichtlich, dass aufgrund der direkten Interaktion mit den PLL-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen eine signifikante Anlagerung der Bakterien stattfand (Abbildung 4.27). Während bei völlig unbehandelten bzw. mit PLL-Netzwerken modifizierten Oberflächen keine Adhäsion von Bakterien nachweisbar war (Abbildung 4.27 A-B), führten sämtliche Peptid-basierten Oberflächenbeschichtungen zu einer maßgeblichen Anlagerung von Bakterien (Abbildung 4.27 C-F). In diesem Zusammenhang konnte eine Korrelation zwischen der Bakterienmenge und der Komplexität der Oberflächennetzwerke identifiziert werden. So resultierte die kovalente Immobilisierung von BMAP-27 auf einfachen PLL-Schichten lediglich in einer leichten Anlagerung von Bakterien, bei welchen jedoch unter Verwendung einer Lebend-Tot Färbung keine Permeabilisierung der bakteriellen Membran festgestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu verfügten PLL-Netzwerke, welche aus 2 oder 3 Schichten bestanden über eine deutlich stärkere Anreicherung von Bakterien an der Oberfläche, bei welchen zugleich eine Permeabilisierung der bakteriellen Membran zu beobachten war. Während durch die Verwendung einer vierten Schicht die qualitative Anzahl der adsorbierten Bakterien identisch blieb, konnten jedoch neben Bakterien mit permeabilisierten auch Bakterien mit intakten Membranen detektiert werden.

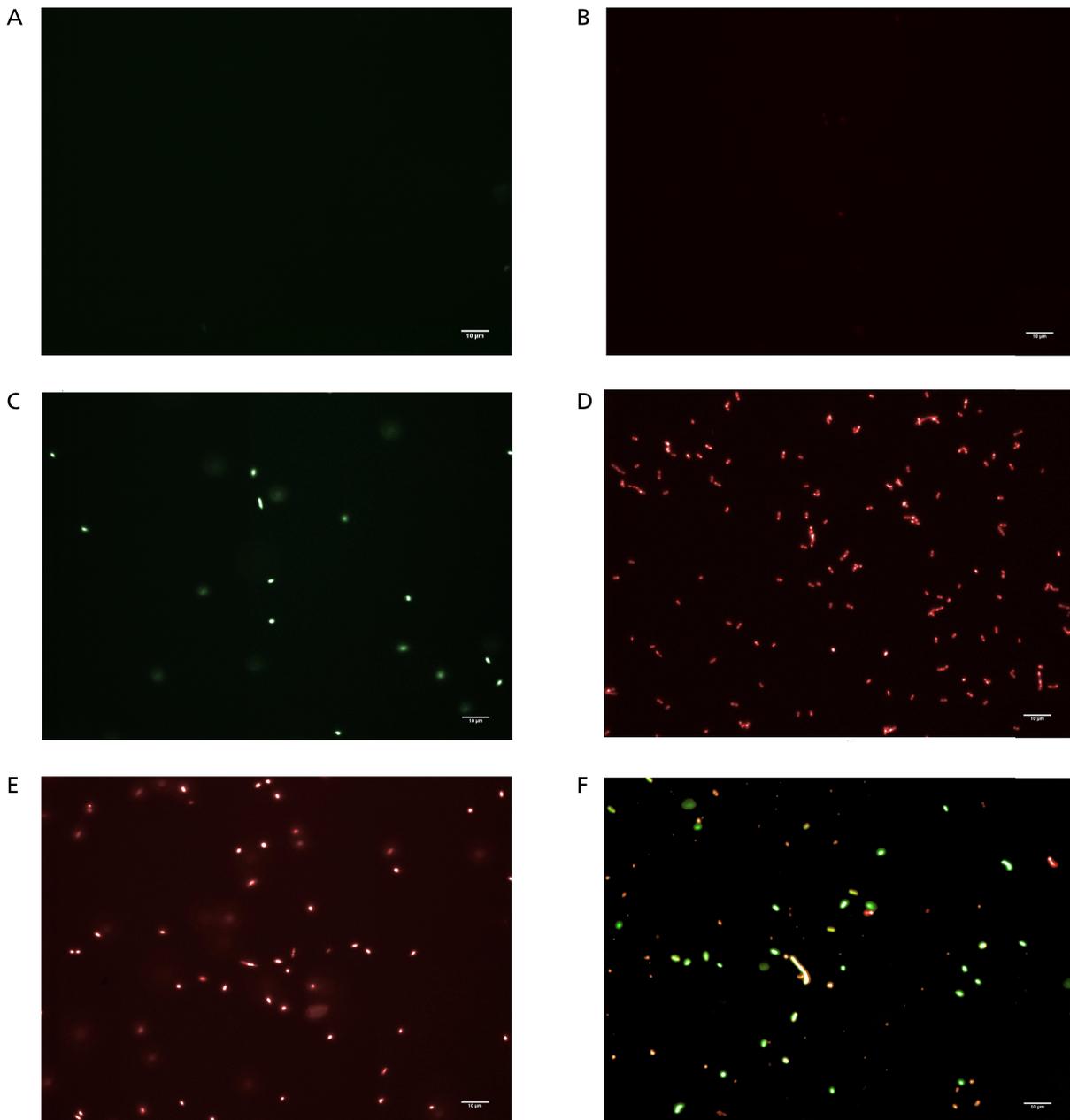


Abbildung 4.27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PLL- und BMAP-27-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen. Dargestellt sind die Überlagerungen der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der zu der Lebend-Tot Färbung korrespondierenden Fluoreszenzfilter. Die Bakterien sind entsprechend der verwendeten Fluoreszenzfilter als Bakterien mit intakten (grün) oder beschädigten Membranen (rot) dargestellt. **(A)** Dargestellt ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer unmodifizierten Oberfläche. Bei der Analyse konnten keine signifikanten Anlagerungen von Bakterien detektiert werden. **(B)** Dargestellt ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der bakteriellen Adhäsion, durch die Interaktion mit einem aus 4 Schichten bestehenden carboxylierten PLL-Netzwerk. Es konnte keine Anlagerung von Bakterien festgestellt werden. **(C-F)** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der bakteriellen Adhäsion, aufgrund der Interaktion mit einem aus (C) einer, (D) zwei, (E) drei oder (F) vier Schichten bestehenden PLL-Netzwerks, welches mit BMAP-27 unter Verwendung einer NHS-basierten chemischen Ligation und einer 140 µM Immobilisierungskonzentration modifiziert wurde. Bei der Analyse konnte mit zunehmender Komplexität der PLL-Netzwerke eine Zunahme der bakteriellen Adhäsion festgestellt werden. Darüber hinaus wiesen die adhäsiv gebundenen Bakterien, welche auf Oberflächen mit mehr als einer Schicht PLL adsorbiert wurden signifikante Membranschädigungen auf. Bei den antimikrobiellen Oberflächen, welche auf einer 4-fachen PLL-Schicht basierten konnten neben Bakterien mit permeabilisierten Membranen auch Bakterien mit intakten Membranen festgestellt werden.

4.2.2 Kontinuierliche Wirkstofffreisetzung

Peptid-basierte Oberflächenbeschichtungen, bei welchen die antimikrobielle Substanz über einen ausgedehnten Zeitraum kontinuierlich in das umgebende Medium abgegeben wird, stellen eine aussichtsreiche Alternative zu kovalenten antimikrobiellen Oberflächenmodifikationen dar. Insbesondere zeichnen sie sich dadurch aus, dass für die antimikrobielle Wirkung kein direkter Kontakt zwischen den Bakterien und den Oberflächenbeschichtung notwendig ist und somit die antimikrobielle Wirkung ebenfalls in das umgebende Medium transferiert wird. Des Weiteren bietet diese Methode die Möglichkeit antimikrobielle Peptide zu verwenden welche über ausgeprägte antimikrobielle Eigenschaften verfügen, diese jedoch aufgrund einer kovalenten Immobilisierung maßgeblich verringert oder vollständig inaktiv sind. Im Zuge der Entwicklung von Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen wurden PLL-basierte Netzwerke mit unterschiedlicher Komplexität generiert, welche aufgrund elektrostatischer Interaktionen in der Lage sind kationische antimikrobielle Peptide zu adsorbieren und im Anschluss daran sukzessiv an das umgebende Medium abzugeben.

4.2.2.1 PLL-basierte Oberflächenbeschichtungen

Die Komplexität der auf der Oberfläche generierten PLL-basierten Netzwerke, wurde zunächst indirekt durch die relative Quantifizierung von an der Oberfläche befindlichen Amininen charakterisiert. Ebenso wurde die relative Menge des elektrostatisch angelagerten antimikrobiellen Peptids Protamin analysiert, um somit Rückschlüsse auf die Elektronegativität und die Komplexität des Oberflächennetzwerks zu erhalten. Obendrein wurden die kationischen und anionischen Zwischenstufen des PLL-Netzwerks analysiert, welche während der sukzessiven Modifikation entstanden. Hierbei konnte eine signifikante Steigerung der relativen Fluoreszenzintensität durch die adsorptive Anlagerung der ersten PLL-Schicht im Vergleich zu den unbehandelten Oberflächen beobachtet werden (Abbildung 4.28 A). Aufgrund der Derivatisierung der in PLL enthaltenen Aminogruppen zu Carboxylen konnte eine Reduktion der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, welche nahezu den unbehandelten Oberflächen entsprach. Durch die erneute kovalente Anlagerung einer weiteren PLL-Schicht zeigte sich einer Erhöhung des relativen Fluoreszenzsignals auf 1,3 im Vergleich zu den Oberflächen, welche lediglich über eine PLL-Schicht verfügten. Durch einen weiteren Zyklus konnte erneut eine Reduktion des relativen Fluoreszenzsignals aufgrund der chemischen Derivatisierung sowie ein erneuter Anstieg durch die dritte PLL-Schicht detektiert werden. Es war zu beobachten, dass der Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität mit der Anzahl der chemischen Modifikationen einherging, wodurch nach drei Schichten PLL eine 1,6-fache, relative Beladung der Oberfläche mit PLL-internen Amininen im Vergleich zu Oberflächen mit lediglich einer PLL-Schicht zu beobachten war. Neben den Eigenschaften der PLL-basierten Oberflächenbeschichtungen waren zudem auch die auf elektrostatischen Interaktionen beruhenden adsorptiven Eigenschaften gegenüber dem kationischen antimikrobiellen Peptid Protamin von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund wurde dieses Peptid auf sämtlichen PLL-basierten Oberflächenmodifikationen deponiert und anschließend die relative Menge von freien Amininen

quantifiziert. An dieser Stelle wurde zunächst erkennbar, dass keine unspezifische Adsorption auf unbehandelten Oberflächen stattfand, da die relative Fluoreszenzintensität der korrespondierenden Negativkontrolle denen der unbehandelten Oberfläche entsprach (Abbildung 4.28 A). Außerdem konnte festgestellt werden, dass eine Adsorption des antimikrobiellen Peptids Protamin durch die carboxylierten und an der Oberfläche angelagerten PLL-Moleküle stattfand, wodurch bei einer einfachen Schicht von carboxyliertem PLL relative Fluoreszenzintensitäten von 0,8 im Vergleich zu einer einfachen PLL-Schicht nachgewiesen werden konnten. Basierend auf der sukzessiven Modifikation und Anreicherung der PLL-Moleküle auf der Oberfläche, erhöhte sich dieser Wert bei drei carboxylierten PLL-Schichten auf ca. 1,2. Im Vergleich dazu konnten keine signifikanten Anlagerungen des antimikrobiellen Peptids auf PLL-Schichten beobachtet werden, welche über eine finale Schicht kationischer Moleküle verfügten, da aufgrund der Oberflächenquantifizierung von freien Aminen unter Verwendung des Amin sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Epicocconone sowohl die PLL-internen Amine als auch die protamininternen Amine und Guanidine gleichermaßen zu den Signalintensitäten beitrugen. Die relativen Fluoreszenzintensität entsprachen den Intensitäten, wie sie auch bei den modifizierten, jedoch ohne Peptid beladenen Oberflächen detektiert wurden.

Als Alternative zu der elektrostatischen Adsorption des antimikrobiellen Peptids Protamin, wurden die carboxylierten, an der Oberfläche befindlichen PLL-Moleküle, dazu verwendet um mittels einer NHS-basierten chemischen Ligation kovalente BMAP-27-basierte Oberflächenbeschichtungen zu generieren. Im Zuge der Charakterisierung wurden im Anschluss daran ebenfalls die relativen Peptidmengen in Abhängigkeit der Komplexität der PLL-Netzwerke analysiert, wobei die Daten ebenfalls gegenüber einer einfach adsorptiv angelagerten Schicht PLL normalisiert wurden. Hierbei ergab sich, dass die kovalente Immobilisierung des antimikrobiellen Peptids BMAP-27 auf einer einfachen, carboxylierten Schicht PLL zu einer geringen Signalintensität von 0,15 im Vergleich zu einer einfachen, mit PLL beschichteten, jedoch unmodifizierten Oberfläche führte (Abbildung 4.28 B). Die sukzessive Modifikation der PLL-basierten Oberflächenbeschichtung resultierte in einer signifikanten Erhöhung der immobilisierbaren Peptidmenge. Die zusätzliche Modifikation der Oberfläche mit einer weiteren carboxylierten PLL-Schicht war durch eine Erhöhung der Signalintensität auf 1,4 gekennzeichnet, was eine maßgebliche Steigerung der immobilisierten Peptidmenge darstellte. Die weiteren Modifikationen der PLL-basierten Oberflächenmodifikationen mit der 3. bzw. 4. PLL-Schicht führten hingegen lediglich zu einer geringen Steigerung der relativen Fluoreszenzintensität, wodurch relative Werte von 1,8 bzw. 1,9 ermittelt wurden.

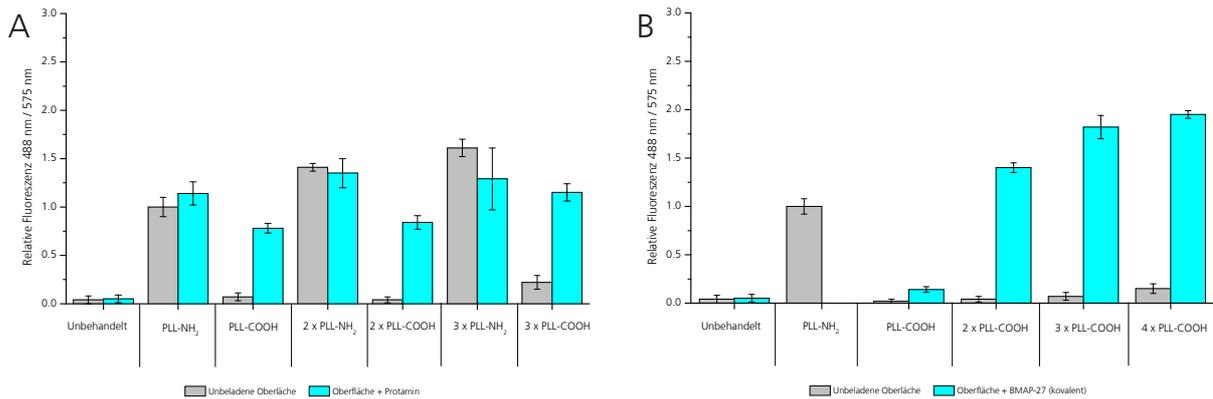


Abbildung 4.28: Relative Quantifizierung von Oberflächen-assoziierten Aminen einzelner PLL-Schichten und ihrer Derivate, sowie der antimikrobiellen Peptide Protamin und BMAP-27. Dargestellt sind die relativen Quantifizierungen von Oberflächen-assoziierten Aminen, welche mittels des Amin-reaktiven Fluoreszenzfarbstoffs Epicocconone quantifiziert wurden (n=4). **(A)** Dargestellt ist die Quantifizierung der relativen Aminmenge verschiedener adsorptiv an der Oberfläche angelagerter PLL-Netzwerke. Zudem sind die relativen Fluoreszenzintensitäten angegeben, welche auf der elektrostatischen Anlagerung des antimikrobiellen Peptids Protamin auf verschiedenen PLL-basierten Oberflächenmodifikationen beruhen. Bei der sukzessiven Modifikation der einzelnen PLL-Schichten konnte eine Steigerung der auf der Oberfläche befindlichen Amine detektiert werden, welche mit der Anzahl der PLL-Schichten einherging. Darüber hinaus zeigte sich stets eine signifikante Reduktion der Signalintensität aufgrund der Carboxylierung der einzelnen kationischen PLL-Schichten. Bei der elektrostatischen Anlagerung des antimikrobiellen Peptids Protamin konnte eine zunehmende Anlagerung mit steigender Komplexität der carboxylierten PLL-Netzwerke festgestellt werden. Bei den Netzwerken, deren finale Schicht aus einer kationischen PLL-Schicht bestand, konnte hingegen aufgrund der parallelen Detektion der PLL-internen Amine und der protamininternen Amine und Guanidine keine signifikante Anlagerung des Peptids festgestellt werden. **(B)** Dargestellt ist die Quantifizierung der relativen Aminmenge von kovalent immobilisiertem BMAP-27, welche gegenüber einer PLL-basierten Oberflächenbeschichtung normalisiert wurde. Die carboxylierten PLL-Netzwerke wurden hierbei unter Verwendung einer NHS-basierten chemischen Ligation und einer 140 µM Immobilisierungskonzentration mit dem Peptid modifiziert. Während auf den einfachen PLL-basierten und carboxylierten Oberflächenbeschichtungen eine relativ geringe Menge BMAP-27 detektiert werden konnte, stieg die immobilisierte Peptidmenge mit der Komplexität der PLL-Netzwerke an, wodurch relative Fluoreszenzintensitäten von 1,8 bzw. 1,9 bei Oberflächenbeschichtungen, welche auf 3 bzw. 4 PLL-Schichten basierten, nachgewiesen wurden.

Um die kontinuierliche Freisetzung des antimikrobiellen Peptids aus den PLL-basierten Oberflächennetzwerken zu untersuchen, wurden diese mit Kulturmedium inkubiert, welches nach einem definierten Zeitraum von den Oberflächen separiert und anschließend mit dem Bakterium *S. xylosus* versetzt wurde. Die wachstumsinhibierenden Eigenschaften des Inkubationsüberstandes wurden anschließend analysiert, um die in einem definierten Zeitraum freigesetzte Peptidmenge indirekt nachzuweisen. Diesbezüglich ergab sich, dass unbehandelte Oberflächen, welche über keine PLL-basierten Beschichtungen verfügten, keine Adsorption und Freisetzung des antimikrobiellen Peptids aufwiesen, wodurch bereits innerhalb der ersten Waschfraktion keine wachstumsinhibierenden Eigenschaften feststellbar waren (Abbildung 4.29 A). Mit zunehmender Komplexität der Oberflächen-assoziierten PLL-Netzwerke konnte eine länger anhaltende Prävention der bakteriellen Kontamination der Inkubationsüberstände festgestellt werden. So konnte unter Verwendung einer einzelnen PLL-Schicht das bakterielle Wachstum innerhalb der ersten Waschfraktion vollständig inhibiert werden. Die weitere Carboxylierung dieser Schicht führte obendrein dazu, dass dieser Zeitraum bis auf 2 Waschfraktionen ausgedehnt werden konnte. Die zusätzliche Modifikation der PLL-basierten Netzwerke mit einer zweiten Schicht von kationischem PLL resultierte in keiner Signifikanten Steigerung der zeitlich abhängigen antimikrobiellen Eigenschaften, wodurch ab der zweiten analysierten Waschfraktion das bakterielle Wachstum nicht mehr inhibiert wurde. Eine deutlich signifikantere Steigerung konnte aufgrund der Carboxylierung der zweiten PLL-Schicht verzeichnet werden. Demzufolge wurde die ausreichende Abgabe des antimikrobiellen Peptids bis zur 7. Waschfraktion ausgedehnt. Diese länger anhaltende Prävention der

bakteriellen Kontamination des Inkubationsüberstandes wurde durch das Hinzufügen einer dritten Schicht PLL, welche über kationische Seitenketten verfügte erneut reduziert, wodurch das Bakterienwachstum lediglich bis zur einschließlich 5. Waschfraktion inhibiert werden konnte. Die abschließende Carboxylierung der finalen dritten PLL-Schicht führte hingegen erneut zu einer Steigerung der antimikrobiellen Eigenschaften, wodurch die Abgabe des antimikrobiellen Peptids bis einschließlich zur 14. und letzten gemessenen Waschfraktion ausgedehnt wurde.

Im Anschluss an die Evaluierung der kontinuierlichen Freisetzung des antimikrobiellen Peptids Protamin durch Oberflächen-assoziierte PLL-Netzwerke und der damit verbundenen Inhibierung des bakteriellen Wachstums von *S. xylosus* innerhalb der jeweiligen Inkubationsüberstände, wurde die Wiederverwendbarkeit der PLL-basierten Oberflächenmodifikationen untersucht. Zu diesem Zweck wurden durch mehrmaliges Waschen über einen Zeitraum von mehreren Tagen, in Kombination mit einer kontinuierlichen Analyse des antimikrobiellen Charakters der Waschfraktionen, sämtliche Reste des Peptids Protamin von den Oberflächen entfernt. Im Anschluss daran wurden die Oberflächen erneut mit Protamin beladen und die kontinuierliche Abgabe erneut evaluiert. Es zeigte sich, in Analogie zu der ersten Protaminbeladung, eine Abhängigkeit der zeitlichen Protaminabgabe von der Komplexität der PLL-Netzwerke (Abbildung 4.29 A). Prinzipiell konnte, bis auf minimale Abweichungen welche sich jedoch innerhalb der gemessenen Varianz der Ergebnisse befanden, ein identisches Abgabeprofil bei der zweiten sowie der dritten Beladung festgestellt werden. Darüber hinaus wurde auch untersucht, welchen Einfluss die Oberflächen-assoziierten PLL-Netzwerke und die entsprechenden Protaminbeladungen auf den direkten Kontakt mit den Bakterien hatten. Hierfür wurden in Analogie zu den vorherigen Versuchen PLL-Netzwerke mittels sukzessiver Modifikation generiert, welche im Anschluss daran mit Protamin beladen und gewaschen wurden. Abschließend wurden die Oberflächen direkt mit *S. xylosus* inkubiert und die Oberflächen identifiziert, bei welchen das bakterielle Wachstum vollständig inhibiert wurde. Hierbei wurde, im Vergleich zu der Analyse der Inkubationsüberstände, ein ähnliches Verhalten sichtbar (Abbildung 4.29 B). Während die auf einer Schicht PLL basierenden Oberflächenbeschichtungen lediglich das bakterielle Wachstum bis hin zur 1. bzw. 3. Waschfraktion, je nach Modifikation der Seitenketten, inhibierten, konnte durch das Hinzufügen einer 2. und 3. PLL-Schicht der Zeitraum der bakteriellen Wachstumsinhibierung ausgedehnt werden. Somit konnte bei einem carboxylierten PLL-Netzwerk, welches aus drei Schichten bestand, ebenfalls eine Inhibierung des bakteriellen Wachstums bis zur einschließlich 14. Waschfraktion durch den direkten Kontakt mit modifizierten und peptidbeladenen Oberflächen nachgewiesen werden. Prinzipiell war bei der Analyse der peptidbeladenen PLL-basierten Oberflächenbeschichtungen eine länger anhaltende antimikrobielle Aktivität der carboxylierten Netzwerke im Vergleich zu den aminierten Netzwerken feststellbar. Diese Unterschiede nahmen mit der Komplexität der Netzwerke zu, wodurch bei Netzwerken mit wenigen individuellen PLL-Schichten lediglich geringe Abweichungen detektiert werden konnten, wohingegen Modifikationen, welche aus drei Schichten bestanden, durch Unterschiede von mehreren Waschfraktionen gekennzeichnet waren.

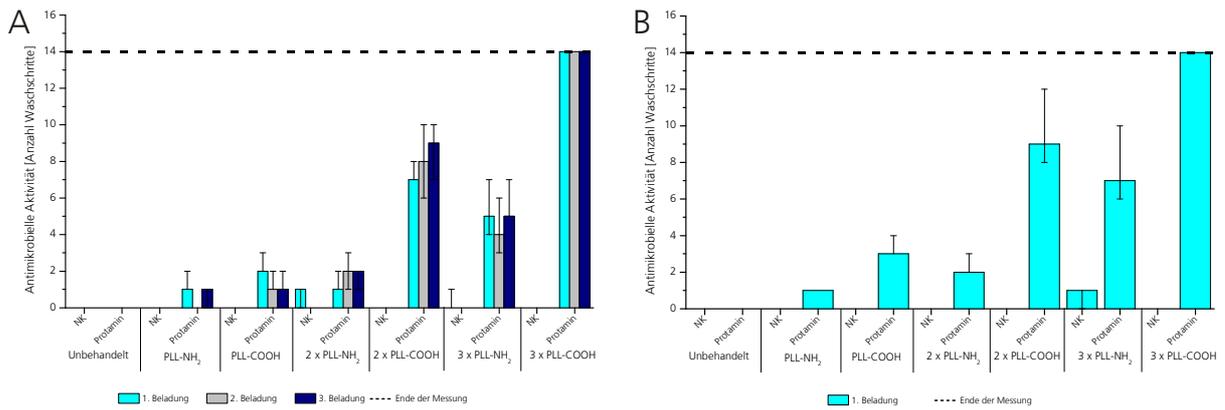


Abbildung 4.29: Freisetzung von Protamin durch PLL-basierte Oberflächennetzwerke. Dargestellt sind die wachstumsinhibierenden Eigenschaften des antimikrobiellen Peptids Protamin, welches nach verschiedenen Waschfraktionen von Oberflächen-assoziierten PLL-Netzwerken freigesetzt wurde (n=4). Angegeben ist der Median der letzten Waschfraktion, bei welcher das bakterielle Wachstum vollständig inhibiert wurde, wohingegen die Fehlerindikatoren den Bereich angeben in welchem sich die einzelnen Ergebnisse befanden. **(A)** Dargestellt sind die Analysen der Inkubationsüberstände der Oberflächen-assoziierten PLL-Netzwerke. Aufgrund der kontinuierlichen Steigerung der Komplexität der PLL-basierten Netzwerke konnte eine Steigerung der zeitlichen Abgabe des Peptids Protamin realisiert werden. Während Oberflächen, welche lediglich über eine PLL-Schicht verfügten bereits nach einer bzw. zwei Waschfraktionen keine ausreichende Menge Protamin mehr eluierten, um das bakterielle Wachstum vollständig zu inhibieren, konnte dieser Zeitraum durch die Modifikation der Oberflächen mit drei PLL-Schichten in Kombination mit einer Carboxylierung auf über 14 Waschfraktionen ausgedehnt werden. **(B)** Dargestellt sind die wachstumsinhibierenden Eigenschaften unterschiedlicher, mit Protamin beladener, PLL-basierter Oberflächennetzwerke aufgrund des direkten Kontakts mit *S. xylosus*. In Analogie zu den Analysen der Inkubationsüberstände konnte eine Steigerung der zeitlich abhängigen antimikrobiellen Eigenschaften mit einer Steigerung der Komplexität der PLL-Netzwerke festgestellt werden.

In einem weiteren Versuch wurden die zuvor generierten PLL-basierten Oberflächennetzwerke ebenfalls dazu verwendet, um auf Kollagenfasern beruhende Wundauflagen zu modifizieren und somit in Kombination mit einer elektrostatischen Adsorption und anschließenden kontinuierlichen Freisetzung des antimikrobiellen Peptids Protamin, extrazelluläre Matrizen mit antimikrobiellen Eigenschaften für die klinische Wundversorgung zu generieren. Deshalb wurden die in den Kollagenfasern enthaltenen funktionellen Seitenketten der Lysine, Asparagin-, sowie Glutaminsäuren dazu verwendet um PLL-basierte Netzwerke kovalent auf den Wundauflagen zu immobilisieren. Im Anschluss daran wurde, wie in vorherigen Versuchen bereits beschrieben, das antimikrobielle Peptid auf den Oberflächen adsorbiert und im Anschluss daran die zeitliche Abgabe analysiert. Dabei wurden ähnliche Ergebnisse wie bei den zuvor auf planen Oberflächen generierten PLL-Netzwerken ersichtlich. Ohne eine zusätzliche Modifikation der einzelnen Kollagenfasern ließ sich eine Inhibierung des bakteriellen Wachstums von *S. xylosus* bis einschließlich zur 2. Waschfraktion nachweisen (Abbildung 4.30 A). Die chemische Modifikation der Kollagenfasern mit PLL-Netzwerken unterschiedlicher Komplexität, resultierte in länger anhaltenden antimikrobiellen Eigenschaften. Demzufolge ging der Anstieg der durchführbaren Waschschriffe, welche über eine ausreichende Menge Protamin verfügten um das bakterielle Wachstum vollständig zu inhibieren, mit der steigenden Komplexität der PLL-Netzwerke einher. Während eine Kollagenmatrix in Kombination mit einer einfachen PLL-Schicht ab der 3. bzw. 4. Waschfraktion nicht mehr genügend Protamin eluierte, um das bakterielle Wachstum vollständig zu inhibieren, führte die Modifikation der Kollagenfasern mit drei PLL-Schichten in Kombination mit einer chemischen Carboxylierung zu einer Steigerung der durchführbaren Waschschriffe auf 10, bei welchen eine vollständige Wachstumsinhibierung stattfand. In Analogie zu der Modifikation von planen Oberflächen mit PLL-Netzwerken und der anschließenden direkten Interaktion mit den Bakterien, ließen die modifizierten

Kollagenfasern eine ähnliche Tendenz erkennen. Hierbei konnte ebenfalls eine Verlängerung der antimikrobiellen Eigenschaften mit zunehmender Komplexität der PLL-basierten Oberflächennetzwerke detektiert werden (Abbildung 4.30 B). Während nicht modifizierte Kollagenfasern ausreichend Protamin freisetzen, um das bakterielle Wachstum bis einschließlich zur 4. Waschfraktion vollständig zu inhibieren, resultierte eine Modifikation mit drei individuellen PLL-Schichten in einer Ausdehnung der antimikrobiellen Aktivitäten bis mindestens zur 14. und letzten analysierten Waschfraktion. Prinzipiell konnten bei dem direkten Kontakt der Bakterien mit den PLL- und Protamin-modifizierten Kollagenfasern keine signifikanten Unterschiede zwischen den aminierten und den carboxylierten PLL-Netzwerken festgestellt werden.

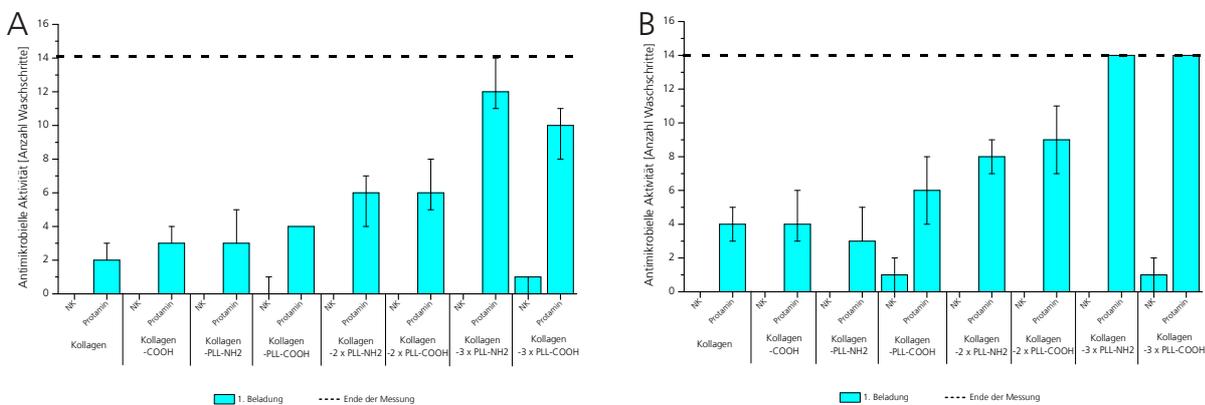


Abbildung 4.30: Freisetzung von Protamin durch PLL-modifizierte Wundauflagen. Dargestellt sind die wachstumsinhibierenden Eigenschaften des antimikrobiellen Peptids Protamin, welches nach verschiedenen Waschfraktionen von PLL-Netzwerken freigesetzt wurde, welche kovalent auf Kollagen-basierten Wundauflagen immobilisiert wurden ($n=4$). Angegeben ist der Median der letzten Waschfraktion, bei welcher das bakterielle Wachstum vollständig inhibiert wurde, wohingegen die Fehlerindikatoren den Bereich angeben, in welchem sich die einzelnen Ergebnisse befanden. **(A)** Dargestellt sind die Analysen der Inkubationsüberstände verschiedener modifizierter Wundauflagen. Aufgrund der kontinuierlichen Steigerung der Komplexität der PLL-basierten Netzwerke konnte eine Steigerung der zeitlichen Abgabe des antimikrobiellen Peptids Protamin nachgewiesen werden. Während Kollagen-basierte Wundauflagen ohne weitere Modifikationen bereits nach zwei Waschfraktionen keine antimikrobiellen Eigenschaften mehr besaßen, konnte durch die Immobilisierung und sukzessive Modifikation von PLL-basierten Oberflächennetzwerken eine Ausdehnung des Elutionszeitraums auf bis zu 12 Waschfraktionen festgestellt werden. **(B)** Dargestellt sind die wachstumsinhibierenden Eigenschaften aufgrund des direkten Kontakts von *S. xylosus* mit unterschiedlichen, Protamin-beladenen PLL-basierten Netzwerken, welche kovalent auf Wundauflagen immobilisiert wurden. In Analogie zu den Analysen der Inkubationsüberstände, konnte eine Steigerung der zeitlich abhängigen antimikrobiellen Eigenschaften mit einer Steigerung der Komplexität der PLL-basierten Netzwerke festgestellt werden.

5 Diskussion

5.1 Artificielle antimikrobielle Peptide

Der intensive Einsatz von Antibiotika hat in den vergangenen Jahren zu einer drastischen Entwicklung von einer Vielzahl antibiotikaresistenter Bakterien geführt, zu welchen unter anderem MRSA und ESBL produzierende *Enterobacteriaceae* gehören. Dies hat sich zu einem großen Problem bei der Prävention und Therapie von bakteriellen Infektionen entwickelt und stellt heutzutage eine erhebliche Herausforderung für das menschliche Gesundheitswesen dar [105]. Aus diesen Gründen stieg der Bedarf an alternativen und effektiven, therapeutisch einsetzbaren Agenzien, weshalb in den vergangenen Jahren die Erforschung und Entwicklung solcher Substanzen intensiviert wurde [106]. Aufgrund der Tatsache, dass viele alternativ einsetzbare antimikrobiell wirkende Substanzen biologische Inkompatibilitäten aufgrund von zytotoxischen Eigenschaften aufweisen, sind biologisch kompatible Charakteristiken bei der Entwicklung von neuen wirksamen antimikrobiellen Agenzien erstrebenswert. Diesbezüglich wurden in den vergangenen Jahren antimikrobielle Peptide als aussichtsreiche Kandidaten für die Entwicklung als neue therapeutisch einsetzbare Biomoleküle diskutiert [107-109], welche sich maßgeblich durch ihr breites Wirkspektrum [5] und in vielen Fällen durch ihre biologische Kompatibilität auszeichnen. Da jedoch natürlich vorkommende antimikrobielle Peptide Limitierungen hinsichtlich ihrer industriellen und therapeutischen Verwendung besitzen, welche auf den schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften [153, 154] und eventuellen auftretenden zytotoxischen Eigenschaften beruhen [70-72], wurde insbesondere die Entwicklung von artifiziellen antimikrobiellen Peptiden intensiviert [146, 147, 158]. Da diese keine Homologien zu denen aus dem angeborenen Immunsystem stammenden Peptiden besitzen, besteht somit auch nicht die Möglichkeit, dass bei einer industriellen oder therapeutischen Applikation eventuelle auftretende bakterielle Resistenzen sich nachteilig auf die Peptid-basierten angeborenen Immunmechanismen ausüben könnten. Diesen Anforderungen zugrundeliegend wurde ein rationales Design von antimikrobiellen Peptiden durchgeführt, um artificielle Peptide mit einem breiten Wirkspektrum in Kombination mit biologisch kompatiblen Eigenschaften zu generieren.

5.1.1 Referenzpeptide

Zur besseren Charakterisierung der antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften wurden deshalb zunächst fünf natürlich vorkommende antimikrobielle Peptide, ein artifizielles optimiertes α -helikales Peptid, sowie zwei bereits charakterisierte artifizielle Peptide hinsichtlich ihrer biophysikalischen, antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften analysiert. Hierbei konnte vorrangig eine starke antimikrobielle Aktivität sämtlicher analysierter Peptide nachgewiesen werden. Insbesondere zeigten die Ergebnisse, dass die Peptide BMAP-27, Melittin und KL-Helix ausgeprägte wachstumshemmende Eigenschaften gegenüber beiden analysierten Mikroorganismen besaßen (Tabelle 4.1). Zudem wurde erkennbar, dass diese Peptide über Membran-permeabilisierende Eigenschaften verfügten, was sowohl zu

einer Beschädigung der grampositiven als auch gramnegativen Membran führte (Tabelle 4.2). Die genauere Analyse der äußeren und inneren Membranpermeabilisierung offenbarte außerdem, dass eine Interaktion mit diesen Peptiden in einer Beschädigung innerhalb weniger Minuten resultierte. Hinsichtlich ihrer biophysikalischen und strukturellen Eigenschaften waren sie sowohl durch ausgeprägte Hydrophobizitäten, als auch erhöhte Hydrophobizitätsmomente in Kombination mit einer starken positiven Nettoladung gekennzeichnet. Basierend auf den errechneten Konformationen wurde zudem ersichtlich, dass diese Peptide über ausgeprägte α -helikale Strukturen verfügten, was durch frühere Studien bestätigt wird [263, 264]. Ferner korrelieren diese Ergebnisse mit früheren Untersuchungen, bei welchen die amphipathischen, helikalen Strukturen solcher Peptide mit den antimikrobiellen Wirkmechanismen in Verbindung gebracht wurden [62, 192]. Weiterhin konnten bei der Charakterisierung dieser Peptide auch starke zytotoxische Eigenschaften festgestellt werden (Tabelle 4.1), welche diese Peptide unbrauchbar für eine therapeutische Applikation machen, wie es bereits bei vielen amphipathischen helikalen Peptiden beobachtet werden konnte [70-72]. Bei der Analyse der einzelnen C- und N-terminalen Regionen der Peptide Melittin und BMAP-27 wurde ersichtlich, dass sich deren antimikrobielle Eigenschaften maßgeblich von den korrespondierenden Volllängenpeptiden unterschieden. Während sowohl die C- als auch N-terminale Region des antimikrobiellen Peptids Melittin weder wachstumsinhibierende noch Membran-permeabilisierende Eigenschaften verzeichnete, konnten antimikrobielle Eigenschaften des N-terminalen Fragments von BMAP-27 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ließ jedoch das C-terminale Fragment keinerlei Aktivitäten erkennen. In diesem Zusammenhang zeigten die Ergebnisse mehrere Auffälligkeiten durch die Separierung der terminalen Regionen dieser Peptide. Hinsichtlich der strukturellen Konformation wurde ersichtlich, dass nur der N-terminale Bereich von BMAP-27 und der C-terminale Bereich von Melittin helikale Strukturen umfasste. Außerdem wurde anhand der Ergebnisse ebenfalls deutlich, dass durch die Separation die biophysikalischen Eigenschaften der Fragmente im Vergleich zu den Volllängenpeptiden grundlegend verändert wurden. So wurde ersichtlich, dass das N-terminale Fragment von BMAP-27 zwar eine reduzierte Hydrophobizität im Vergleich zum Volllängenpeptid besaß, dessen Nettoladung nur leicht verringert wurde und dessen Hydrophobizitätsmoment sogar stark erhöht wurde. Im Vergleich dazu verfügte das C-terminale Fragment über ein reduziertes Hydrophobizitätsmoment und eine reduzierte Nettoladung, besaß jedoch eine erhöhte Hydrophobizität. Anhand dieser beiden Fragmente wurde ersichtlich dass vorrangig das Hydrophobizitätsmoment und die Nettoladung von helikalen Peptiden für die antimikrobiellen Eigenschaften verantwortlich sind. Dies korreliert mit vielen Untersuchungen von helikalen Peptiden hinsichtlich dieser Parameter [46, 62, 182, 192]. Ebenso konnte anhand des C- und N-terminalen Fragments von Melittin beobachtet werden, dass durch die Separierung dieser beiden Peptide eine Separierung der biophysikalischen Eigenschaften stattfand. Während das N-terminale Fragment eine ausgeprägte Hydrophobizität und Hydrophobizitätsmoment besaß, welches sogar oberhalb des Volllängenpeptids lag, war die Nettoladung stark reduziert. Im Vergleich dazu wies das C-terminale Fragment zwar eine starke positive Nettoladung auf, besaß jedoch ein stark reduziertes Hydrophobizitätsmoment und eine geringere Gesamthydrophobizität. Als Folge dessen konnten bei der Analyse beider Fragmente keine antimikrobiellen Eigenschaften identifiziert werden. Hierbei wird

ersichtlich, dass neben der Hydrophobizität und dem Hydrophobizitätsmoment auch die Nettoladung eines antimikrobiellen Peptids von entscheidender Bedeutung ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der prinzipielle Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide auf einer Rezeptor-unabhängigen Interaktion der Peptide mit den bakteriellen Membranen beruht [39, 40], wobei die elektrostatischen Interaktionen zwischen den anionischen bakteriellen Membranen [42, 43] und den kationischen antimikrobiellen Peptiden für die erste Interaktion von essenzieller Bedeutung sind [38]. Eine alternative Ursache für die Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften durch die Separation des C- und N-terminalen Fragments von Melittin könnte auch auf die Aufhebung der charakteristischen dreidimensionalen Struktur zurückzuführen sein. Frühere Untersuchungen haben dargelegt, dass Melittin aus zwei helikalen amphipathischen Bereichen besteht, welche über eine charakteristische und für die antimikrobielle Funktion essenzielle Gelenkregion in der Mitte des Peptids verbunden sind [263]. Die Substitution der sekundären Aminosäure Prolin, welche in vielen Fällen für eine Krümmung von Peptiden verantwortlich ist [265] und oftmals mit den charakteristischen Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide in Verbindung gebracht wird [266], resultierte hierbei in einer signifikanten Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften [263]. Basierend auf diesen Untersuchungen könnte dies ebenfalls die Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften durch die Separation der C- und N-terminalen Fragmente erklären. Zudem konnte diese charakteristische Gelenkregion und die damit verbundene Anordnung beider helikaler Bereiche bei den hier durchgeführten Kalkulationen belegt werden und somit den angewendeten mathematischen Algorithmus, welcher für die Berechnungen verwendet wurde, verifizieren.

Hinsichtlich der Analyse der drei artifizialen Referenzpeptide Bac2a, P7 und Tet127 ließ sich feststellen, dass Tet127 starke Analogien zu den analysierten amphipathischen helikalen Peptiden erkennen ließ. So besaß es vergleichbare biophysikalische Eigenschaften und seine Konformation umfasste ebenfalls helikale Strukturen, welche jedoch aufgrund der kalkulierten Ganghöhe und der Ausrichtung der Aminosäureseitenketten nicht als α -helikal klassifiziert werden konnte (Tabelle 4.1, Abbildung 4.5). Im Vergleich dazu waren die Peptide Bac2a und P7 durch deutlich weniger ausgeprägte biophysikalische Eigenschaften gekennzeichnet. Jedoch konnte bei der Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften festgestellt werden, dass Bac2a sowohl wachstumsinhibierende als auch leichte Membran-permeabilisierende Eigenschaften besaß, wohingegen P7 keinerlei Aktivität zeigte. Dies bestätigt frühere Experimente, bei welchen im Zuge der Analyse von Peptidbibliotheken signifikante Unterschiede durch den Einbau der sekundären Aminosäure Prolin in P7 im Vergleich zu Bac2a detektiert wurden [267, 268]. Ferner bestätigt der zuvor gemessenen MIC-Wert von 12 μM den hier gemessenen Wert von 8 μM und verifiziert, dass die hier ermittelten Daten vergleichbare Resultate repräsentieren, obwohl ein direkter Vergleich nur eingeschränkte Gültigkeit besitzt, da der C-Terminus in den hier durchgeführten Untersuchungen als freie Carboxygruppe vorlag, wohingegen in vergleichbaren Untersuchungen die amidierte Version des Peptids verwendet wurde [267, 268].

Bei dem Vergleich zwischen Bac2a und Tet127 wurde ersichtlich, dass sich die charakteristischen antimikrobiellen Eigenschaften maßgeblich voneinander unterschieden (Tabelle 4.1). Während beide MIC-Werte gegenüber *E. coli* in der gleichen Größenordnung verzeichneten, konnten durch die Interaktion von Bac2a mit den bakteriellen Membranen nur schwache und zeitlich verzögerte

permeabilisierende Eigenschaften identifiziert werden, wohingegen Tet127 zu einer deutlich schnelleren Permeabilisierung der bakteriellen Membranen bei geringeren Konzentrationen führte, wie es auch bei Melittin, BMAP-27 und KL-Helix beobachtet werden konnte (Tabelle 4.2). Im Vergleich zu diesen helikalen antimikrobiellen Peptiden verfügten Indolicidin und Protamin über deutlich andere biophysikalische als auch antimikrobielle Eigenschaften. Die errechnete Struktur von Indolicidin umfasste eine flexible Konformation ohne charakteristische α -Helices oder β -Faltblätter in Kombination mit einer stark erhöhten Hydrophobizität und einem geringen Hydrophobizitätsmoment (Abbildung 4.5), was mit früheren NMR Strukturaufklärungsstudien korreliert [36]. Auffällig ist, dass dieses Peptid starke wachstumsinhibierende Eigenschaften gegenüber *E. coli* zeigte, welche jedoch nicht mit Membran-permeabilisierenden Eigenschaften assoziiert waren (Tabelle 4.1, Tabelle 4.2). Im Gegensatz dazu besaß Protamin ein hohes Maß an α -helikalen Regionen, eine geringe Hydrophobizität und ein stark reduziertes Hydrophobizitätsmoment. Ferner konnten bei der Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften von Protamin ebenfalls keine Membran-permeabilisierenden Eigenschaften festgestellt werden. Diese Ergebnisse verifizieren, dass die Ausprägung von helikalen Strukturen ohne die amphipathischen Eigenschaften nicht ausreichend ist, um eine Permeabilisierung der bakteriellen Membran zu induzieren. Vielmehr korrelieren diese Ergebnisse mit Studien, bei welchen wachstumsinhibierende Eigenschaften durch Prolin- und Arginin-reiche antimikrobielle Peptide aufgrund der Inhibierung des Metabolismus beschrieben wurden [36, 269]. Insbesondere konnte bereits demonstriert werden, dass die antimikrobiellen Eigenschaften des Peptids Indolicidin auf der Inhibierung zellinterner Prozesse, wie der Transkription und Translation beruhen [66] und somit, ähnlich wie bei Protamin, als bakteriostatisch klassifiziert werden können. Ferner geht dieser Wirkmechanismus mit der Fähigkeit von Arginin-reichen Peptiden einher, welche oftmals eine passive Translokation über die bakterielle Membran aufweisen [14, 39, 270]. Somit unterscheiden sich diese Peptide hinsichtlich der Wirkweise maßgeblich von den α -helikalen Peptiden, bei welchen bereits gezeigt wurde, dass die wachstumsinhibierenden Eigenschaften mit den Membran-permeabilisierenden Eigenschaften einhergehen und die amphipathischen dreidimensionalen Strukturen essenziell für deren Aktivität [46, 47, 189, 192] und charakteristischen Wirkmechanismus sind [182]. Jedoch war Protamin durch die selektive Permeabilisierung der äußeren bakteriellen Membran von *E. coli* ML-35p durch eine einzigartige Wirkung innerhalb der hier analysierten antimikrobiellen Peptide gekennzeichnet (Tabelle 4.2). In diesem Kontext konnte ebenfalls ermittelt werden, dass die Interaktion der gramnegativen Bakterien mit Protamin zu einer starken Aggregation einzelner Bakterien führte, was anhand von durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Analysen verifiziert werden konnte (Abbildung 4.4). Aufgrund der Interaktion des antimikrobiellen Peptids mit den bakteriellen Membranen könnte eine Reorganisation der Lipiddoppelschichten induziert worden sein, wobei mehrere Schichten unterschiedlicher Bakterien miteinander fusionieren und zellübergreifende Aggregate bilden, wie es bereits für andere antimikrobielle Peptide [271] oder aber durch das Eosinophile kationische Protein [272] dokumentiert werden konnte. Diese Interaktion korreliert mit dem durch das „carpet model“ beschriebenen Wirkmechanismus, bei welchem von einer signifikanten Neuordnung der bakteriellen Membran ohne spezifische Porenbildung ausgegangen wird [49]. Aufgrund der Tatsache, dass zum heutigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt ist, ob die hypothetischen Wirkmechanismen

individuell voneinander ablaufende Ereignisse sind, welche auf unterschiedlichen Eigenschaften und Interaktionen der antimikrobiellen Peptide mit den Membranen beruhen oder vielmehr einen graduellen Ablauf darstellen [62], kann ebenfalls nicht eindeutig geklärt werden, ob die Aggregation der Bakterien durch die Interaktion mit dem antimikrobiellen Peptid Protamin für die wachstumsinhibierenden Eigenschaften verantwortlich ist. Stattdessen könnten die antimikrobiellen Eigenschaften auch auf einer Kombination von mehreren Interaktionen und Wirkweisen beruhen, wie es bereits für einige Peptide beschrieben wurde [124, 273, 274]. Hinsichtlich des antimikrobiellen Wirkmechanismus von Protamin wurden bereits Untersuchungen durchgeführt, welche nahelegten, dass die antimikrobielle Wirkung von Protamin gegenüber *Salmonella typhimurium* auf der Unterbrechung der bakteriellen Energiegenerierung und Energieübertragung beruht [275]. Andererseits konnten bereits die permeabilisierenden Eigenschaften von Protamin gegenüber *Listeria monocytogenes* und *E. coli* aufgrund des Austretens von zellinternem ATP bewiesen werden [276]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf die hier demonstrierte selektive Permeabilisierung der äußeren bakteriellen Membran des gramnegativen Bakteriums *E. coli* zurückzuführen sein. Wiederum könnten sie auch darauf beruhen, dass antimikrobielle Peptide je nach Zielorganismus, Konformationsdynamik und Umweltbedingungen unterschiedliche antimikrobielle Wirkmechanismen aufweisen können [40]. Darüber hinaus ließ das Peptid Protamin neben den antimikrobiellen auch wachstumsinhibierende Eigenschaften gegenüber den eukaryotischen Zellen erkennen (Tabelle 4.1), was höchst wahrscheinlich auf die überproportional hohe Anzahl von peptidinternen Argininen zurückzuführen ist, welche oftmals mit zytotoxischen Eigenschaften in Verbindung gebracht werden [277]. Dementsprechend sind die errechneten therapeutischen Kennzahlen des antimikrobiellen Peptids nur unter Vorbehalt gültig, da die zytostatischen Eigenschaften hierbei nicht berücksichtigt werden.

5.1.2 Artificielles Peptid-design

Bei den Analysen des antimikrobiellen Peptids M1a konnten sowohl wachstumsinhibierende Eigenschaften gegenüber dem gramnegativen und grampositiven Bakterium, als auch Membran-permeabilisierende Eigenschaften nachgewiesen werden (Tabelle 4.3, Tabelle 4.4). Dieses Peptid bestand aus einer zentralen Region mit 5 hydrophilen Aminosäuren, welche jeweils von 3 kationischen Aminosäuren flankiert wurde. Ähnliche Ergebnisse verzeichnete das Peptid M1b, welches im Vergleich zu M1a nicht die Aminosäure Isoleucin und Leucin, sondern die Aminosäuren Phenylalanin und Isoleucin enthielt, ansonsten aber über eine analoge Primärsequenz verfügte. Anhand der analysierten Peptidbibliotheken wurde ersichtlich, dass die vollständige Substitution einer dieser drei charakteristischen Regionen in einem vollständigen Verlust der antimikrobiellen Eigenschaften resultierte. Insbesondere wurde in diesem Kontext ersichtlich, dass die Reduktion der antimikrobiellen Aktivitäten nicht mit der Reduktion von charakteristischen biophysikalischen Eigenschaften, wie der Gesamthydrophobizität, des Hydrophobizitätsmoments oder der Nettoladung einherging. Dies wurde in erster Linie dadurch deutlich, dass sowohl die Peptide M2 und M3 mit einer erhöhten Gesamthydrophobizität, als auch das Peptid M7,

welches identische biophysikalische Eigenschaften im Vergleich zu den Peptiden M1a und M1b besaß, weder wachstumshemmende noch Membran-permeabilisierende Eigenschaften demonstrierte. Ebenso wurde ersichtlich, dass die Hydrophobizitätsmomente aufgrund der Modifikation der Peptide durch keine signifikanten Veränderungen gekennzeichnet waren, wie es beispielsweise bei α -helikalen antimikrobiellen Peptiden beobachtet werden kann [62, 192]. Vielmehr wurde erkennbar, dass die Substitution einzelner Peptidregionen in einer Variation der dreidimensionalen Konformation des Peptids resultierte und diese eine Korrelation zu der Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften erkennen ließ (Abbildung 4.6). So besaßen sowohl das Peptid M1a, als auch M1b ein ausgedehntes β -Strang-Motiv, wohingegen die Substitution einzelner Regionen in Peptiden mit deutlich kürzeren Konformationsmotiven resultierte oder aber deren Sekundärstruktur durch das Auftreten vollständig flexibler Peptidregionen charakterisiert war. Dies wurde durch die Ergebnisse der N- und C-terminalen Truncation-Bibliothek verifiziert. Es konnte bestätigt werden, dass die Reduktion der Sequenzlänge und damit eine Reduktion kationischer Aminosäuren von beiden Termini, zu einer Reduktion des β -Strang-Motivs führte (Abbildung 4.9). Darüber hinaus wurde ebenso ersichtlich, dass die Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften nicht mit der Variation der biophysikalischen Eigenschaften assoziiert war (Tabelle 4.5). Dies konnte besonders gut bei der Analyse der Peptide N3 und N4, sowie C3 und C4 beobachtet werden, welche die ausgeprägtesten Hydrophobizitäten und Hydrophobizitätsmomente innerhalb der analysierten Bibliotheken besaßen, deren antimikrobielle Aktivität im Vergleich zu M1a oder M1b jedoch drastisch reduziert waren. Da die antimikrobiellen Eigenschaften von α -helikalen Peptiden insbesondere mit gesteigerten Hydrophobizitätsmomenten einhergehen [182], welche eine quantitative Maßeinheit der amphipathischen Eigenschaften repräsentieren [190, 191], und dies bei den analysierten Peptiden nicht beobachtet werden konnte, kann angenommen werden, dass die hier analysierten wirksamen antimikrobiellen Peptide über einen anderen, mit der dreidimensionalen Struktur assoziierten Wirkmechanismus verfügen. Dies wird insbesondere auch bei der Analyse der Aminosäureanordnung ersichtlich. Hierbei war eine sukzessive Verschiebung der hydrophoben zentralen Region des Peptids A1 zu den Termini durch eine signifikante Variation des Sekundärstrukturmotivs gekennzeichnet (Abbildung 4.12). Während A1, ebenso wie z. B. M1a, N1 oder C1 ein ausgedehntes β -Strang-Motiv besaß, veränderte sich diese Struktur durch die Verschiebung der Aminosäuren bis hin zu einer flexiblen Konformation in A5. Hinsichtlich des Sekundärstrukturmotivs ließ sich beobachten, dass A2 leichte helikale Eigenschaften verzeichnete, welche jedoch hinsichtlich biophysikalischer, antimikrobieller und zytotoxischer Eigenschaften nicht mit denen anderer α -helikaler Peptide vergleichbar sind. Dies konnte auch anhand der entsprechenden Helixrad-Projektion verifiziert werden, welche keine amphipathischen Eigenschaften des Peptids erkennen ließ (Abbildung 4.10). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass A4 ein stark ausgeprägtes antiparalleles β -Faltblatt ausbildete. Diese Strukturänderung wurde durch die in verschiedenen Peptidabschnitten lokalisierten hydrophoben Bereiche induziert, welche in einer hydrophilen Umgebung aggregieren und somit zunächst an der Ausprägung einer gebogenen Peptidstruktur beteiligt sind, welche mit zunehmender Verschiebung der Aminosäuren stärker stabilisiert wurde. Obwohl bereits antimikrobielle Eigenschaften durch artificielle β -Faltblatt ausbildende Peptide beschrieben wurden [197-199], unterscheiden sich diese Sequenzen und Strukturen maßgeblich von

denen des hier analysierten Peptids A4. Bei Peptiden mit β -Faltblatt Strukturen beruhen die antimikrobiellen Eigenschaften, ebenso wie bei α -helikalen Peptiden, auf den amphipathischen Eigenschaften, welche durch die alternierende Anordnung von kationischen und hydrophoben Aminosäuren hervorgerufen werden. Generell wird deren Wirkmechanismus mit dem „carpet model“ erklärt, bei welchem eine Anlagerung des kationischen antimikrobiellen Peptids an die anionische bakterielle Membran aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen begünstigt wird, woraufhin die Peptide nach der Überschreitung einer Schwellenkonzentration mittels Selbstorganisation zu Domänen mit hohen Peptidkonzentrationen aggregieren [39, 199]. Anschließend werden die Peptide in die bakteriellen Membran integriert, wobei die kationischen Aminosäuren einen hydrophilen Kanal ausbilden und die hydrophoben Seitenketten mit den hydrophoben Bereichen der Membran interagieren [50, 51]. Alternativ dazu können aufgrund der Abschirmung gegenüber der hydrophilen Umgebung ganze Membranfragmente in einem Detergenz-ähnlichen Mechanismus aus der Membran herausgelöst werden. Da die Seitenketten von angrenzenden Aminosäuren auf unterschiedlichen Ebenen des Peptids lokalisiert sind [278], erklärt dies, warum das alternierende Motiv aus kationischen und hydrophoben Aminosäuren von entscheidender Bedeutung ist. Aufgrund der Tatsache, dass das Hydrophobizitätsmoment lediglich eine quantitative Einheit zur Beschreibung der amphipathischen Eigenschaften von α -helikalen Peptiden ist [190, 191], können die amphipathischen Eigenschaften von β -Faltblatt bildenden Peptiden nicht durch dessen Analyse identifiziert werden. Vielmehr ist hierfür die Analyse der Primärsequenz notwendig, bei welcher charakteristische repetitive alternierende Motive von Bedeutung sind, wie sie bei früheren Untersuchungen bereits beschrieben wurde [188, 194, 197-199, 279]. Da bei der Analyse des Peptids A4 solche Strukturen nicht identifiziert werden konnten erklärt dies die lediglich sehr schwach ausgeprägten antimikrobiellen Eigenschaften. Da jedoch die amphipathischen Eigenschaften im Allgemeinen sowohl bei den α -helikalen [44] als auch β -Faltblatt [279] bildenden Peptiden von maßgeblicher Bedeutung für die Rezeptor-unabhängige Interaktion und Permeabilisierung der bakteriellen Membran sind [39-41], kann davon ausgegangen werden, dass die Separierung der kationischen und hydrophoben Aminosäuren innerhalb der analysierten β -Strang bildenden Peptide ebenfalls eine fundamentale Bedeutung für deren Wirkmechanismus darstellt. Jedoch ergaben die Untersuchungen der artifiziellen β -Strang bildenden Peptide, dass die Anordnung ihrer drei charakteristischen Regionen für die antimikrobielle Wirkung erhalten bleiben muss, wohingegen bei den α -helikalen und β -Faltblatt bildenden antimikrobiellen Peptiden die Primärsequenzen und Anordnungen der Aminosäuren stark variieren können, solange die amphipathischen Eigenschaften erhalten bleiben [46, 192]. Dies wurde insbesondere bei der Analyse der Peptide M7 und A5 ersichtlich, welche identische biophysikalische Eigenschaften im Vergleich zu M1a und A1 aufwiesen, jedoch über keine antimikrobiellen Eigenschaften gegenüber beiden Bakterien verfügten (Tabelle 4.1, Tabelle 4.7). Zudem konnten bei den Analysen der zeitlich abhängigen Permeabilisierung der äußeren und inneren bakteriellen Membran von *E. coli* ML-35p ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen α -helikalen und β -Strang formenden Peptiden detektiert werden, was ebenfalls auf eine andere Art der Interaktion hindeutet. Während sämtliche analysierten α -helikalen antimikrobiellen Peptide Permeabilisierungszeiten gegenüber beiden Membranen von wenigen Minuten verzeichneten, waren die Permeabilisierungszeiten der β -Strang bildenden Peptide deutlich verzögert. Dies ließ sich insbesondere

bei dem Vergleich zwischen Melittin und M1a beobachten, welche beide über einen identischen MIC-Wert von 8 μM gegenüber *E. coli* verfügten (Tabelle 4.1, Tabelle 4.3). Während Melittin die äußere bakterielle Membran bei dieser Konzentration innerhalb von 9 min und die innere Membran innerhalb von 12 min permeabilisierte, waren die Permeabilisierungszeiten von M1a mit 17 und >90 min deutlich verzögert (Tabelle 4.2, Tabelle 4.4). Darüber hinaus waren sämtliche β -Strang bildenden Peptide durch weitere signifikante Unterschiede zu den Referenzpeptiden charakterisiert. Sämtliche amphipathischen α -helikalen Peptide besaßen zytotoxische und antimikrobielle Eigenschaften innerhalb der gleichen Größenordnung, was in therapeutischen Kennzahlen von weniger als 2 resultierte (Tabelle 4.1) und bereits bei anderen Studien bezüglich amphipathischer α -helikaler Peptide beobachtet werden konnte [70-72]. Im Vergleich dazu waren die analysierten β -Strang bildenden Peptide durch keine signifikanten zytotoxischen Eigenschaften in dem analysierten Konzentrationsbereich charakterisiert. Lediglich die Peptide N1, C1 und N4 ließen schwache zytotoxische Eigenschaften erkennen, welche jedoch ausschließlich bei dem Peptid N1 zu einer vollständigen Inhibierung des eukaryotischen Wachstums führten (Tabelle 4.5). Demzufolge waren die analysierten artifizierten Peptide durch deutlich höhere therapeutische Kennzahlen charakterisiert. Dies stimmt mit früheren Studien überein, bei welchen α -helikale und β -Faltblatt bildende antimikrobielle Peptide mit identischen Peptidkompositionen und antimikrobiellen Charakteristiken hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften analysiert wurden [201]. Hierbei konnte eine bessere biologische Kompatibilität der β -Faltblatt bildenden antimikrobiellen Peptide bewiesen werden. Obwohl die hier analysierten antimikrobiellen Peptide keine charakteristischen amphipathischen β -Faltblätter bildeten, sondern vielmehr einzelne separate β -Strang-Motive erkennen ließen, ist es sehr wahrscheinlich, dass die biologisch kompatiblen Eigenschaften ebenfalls darauf beruhen, dass sich ihr Wirkmechanismus maßgeblich von dem der amphipathischen α -helikalen Peptide unterscheidet.

Neben der Analyse der Sequenzlänge und Anordnung einzelner Sequenzbereiche innerhalb des Peptids wurde auch die Gesamtkomposition der β -Strang formenden antimikrobiellen Peptide analysiert. Diesbezüglich ergaben sich eindeutige Tendenzen. Während die Arginin-enthaltenden Peptide S1, S3 und S7 durch zytostatische Eigenschaften gegenüber den eukaryotischen Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen gekennzeichnet waren, zeigte die Applikation der Lysin-enthaltenden Peptide keine zytotoxischen oder wachstumshemmenden Eigenschaften (Tabelle 4.11). Dies korreliert mit den zuvor ermittelten zytostatischen Eigenschaften des antimikrobiellen Peptids Protamin, sowie mit früheren Studien, bei welchen wachstumshemmende Eigenschaften durch Prolin- und Arginin-reiche antimikrobielle Peptide, aufgrund der Inhibierung des Metabolismus, nachweisbar waren [36, 269]. Ebenfalls konnte übereinstimmend festgestellt werden, dass die wachstumshemmenden Eigenschaften sowohl von Protamin als auch von S1, S3 und S7 nicht mit einer direkten Permeabilisierung der eukaryotischen Membran einhergingen (Tabelle 4.12), was höchst Wahrscheinlich auf der bereits beschriebenen passiven Translokation von Arginin-reichen Peptiden durch die bakterielle Membran beruht [14, 39, 270]. Darüber hinaus wurden in früheren Studien weitere Unterschiede bei dem Einfluss von Lysinen und Argininen auf die Krümmung der Membran identifiziert [280, 281]. So konnte demonstriert werden, dass die Guanidingruppe mittels mehrfach verzahnter Wasserstoffbrückenbindungen mit den Komponenten der

bakteriellen Membran interagiert, was in einer umfangreichen Aggregation der polaren Kopfgruppen resultiert und als Folge dessen eine, zur senkrechten Ebene positive, Membrankrümmung induziert wird, woraus eine Sattel-Spreiz Krümmung entsteht [282-284]. Im Vergleich dazu konnte anhand von Untersuchungen festgestellt werden, dass die Aminogruppe von Lysin lediglich mit einer Kopfgruppe interagieren kann, wodurch eine negative Membrankrümmung induziert wurde [284], was somit für die unterschiedlichen Eigenschaften der Arginin und Lysin-enthaltenen Peptide verantwortlich sein könnte.

Die ausgeprägtesten antimikrobiellen Eigenschaften konnten durch die hydrophobe Aminosäure Isoleucin, im Vergleich zu Valin, Phenylalanin und Leucin nachgewiesen werden. Dies geht mit der individuellen Hydrophobizität einzelner Aminosäuren, entsprechend ihrer biophysikalischen Eigenschaften in kleinen Peptiden, einher [285, 286]. Da bei den Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide hydrophobe Wechselwirkungen von entscheidender Bedeutung sind [267], kann davon ausgegangen werden, dass die hydrophoben Eigenschaften der zentralen Region der entwickelten β -Strang formenden Peptide ebenfalls essenziell für deren antimikrobiellen Wirkmechanismen sind, was auch mit den analysierten Truncation- und Substitutionsbibliotheken dieser Region korreliert (Tabelle 4.7). Dementsprechend erklärt diese Reduktion der Peptidhydrophobizität in den Peptiden S5 und S6, welche durch die Substitution mit der hydrophoben Aminosäure Valin hervorgerufen wurde, auch deren stark reduzierte antimikrobielle Aktivitäten. Während Phenylalanin die hydrophobste der analysierten Aminosäuren darstellt, resultiert deren Kombination mit der kationischen Aminosäure Lysin in Peptid S8 in einer reduzierten antimikrobiellen Aktivität im Vergleich zu den anderen Peptiden. In diesem Kontext konnte bereits belegt werden, dass die aromatischen Seitenketten mehrerer Phenylalaninen in natürlich vorkommenden Proteinen an stabilisierende Interaktionen beteiligt sind [287, 288]. Es wurden bereits mehrere Interaktionsmechanismen vorgeschlagen, zu welchen unter anderem gestapelte π -Systeme, T-förmige Stapelung und Parallelverschiebungen gehören. Solche Interaktionen könnten die Konformation des ausgedehnten β -Strang-Motivs, sowie die damit verbundenen antimikrobiellen Eigenschaften maßgeblich beeinträchtigen, wie es auch ansatzweise bei den errechneten dreidimensionalen Strukturen ersichtlich wurde (Abbildung 4.14). Hierbei besaßen die Phenylalanin-enthaltenden Peptide S7 und S8 kleine flexible Regionen innerhalb des zentralen hydrophoben Bereichs, welche den β -Strang unterbrachen. Da die kationischen Eigenschaften der terminalen Regionen aufgrund der elektrostatischen Abstoßung für die horizontale Streckung der Peptide verantwortlich sind, könnte die größere Dissoziationskonstante von Arginin im Vergleich zu Lysin [289] die stabilisierenden Interaktionen der aromatischen Seitenketten kompensieren. Somit würde dies die stärkeren antimikrobiellen Aktivitäten des Peptids S7 im Vergleich zu S8 erklären, da das charakteristische gestreckte β -Strang-Motiv erhalten bleiben würde.

5.1.3 Optimierte Peptidsequenz und Behandlung von kontaminierten Zellkulturen

Basierend auf den Ergebnissen der analysierten Peptidbibliotheken wurde das optimierte antimikrobielle Peptid O1 abgeleitet, welches 6 zentrale Isoleucine aufwies, die von jeweils 3 Lysin flankiert wurden. Für die Optimierung wurden mehrere Parameter, wie die Peptidlänge, antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften, sowie die Permeabilisierungszeiten berücksichtigt. Die Anzahl der kationischen flankierenden Aminosäuren beruhte darauf, dass zusätzliche Aminosäuren nicht mit einer Steigerung der antimikrobiellen Eigenschaften einhergingen, wie es beispielsweise bei den Peptiden N1, A1 und D5 im Vergleich zu S2 beobachtet werden konnte, wohingegen sich eine Reduktion der Aminosäuren nachteilig auswirkte (Tabelle 4.5). Ebenso konnte keine Steigerung der antimikrobiellen Eigenschaften durch mehr als 5 zentrale hydrophobe Aminosäuren beobachtet werden, wie es bei den Peptiden A1 und H1 zu beobachten war, wohingegen deren weitere Reduktion ebenfalls einen nachteiligen Effekt auf die antimikrobiellen Eigenschaften hatte (Tabelle 4.7). Jedoch resultierte eine Erhöhung der hydrophoben Aminosäuren in einer Reduktion der Permeabilisierungszeiten, wie es anhand der Peptide A1 und H1 im Vergleich zu S2 oder M1a ersichtlich wurde. Da sowohl kurze Peptidsequenzen, als auch schnell wirkende antimikrobielle Peptide vorteilhaft sind, wurde, um diesen Anforderungen zu entsprechen, für das optimierte Peptid O1 ein hydrophober Bereich bestehend aus 6 Aminosäuren gewählt. Darüber hinaus konnte anhand der Substitutionsbibliotheken gezeigt werden, dass die Peptidkomposition den einflussreichsten Parameter bei der Optimierung von β -Strang bildenden antimikrobiellen Peptiden repräsentiert. Um zytostatische Aktivitäten zu vermeiden wurden für die kationischen Bereiche Lysine verwendet, welche aufgrund der gesteigerten antimikrobiellen Wirkung mit Isoleucinen kombiniert wurden. Bei den Analysen war feststellbar, dass O1 MIC-Werte von 8 und 0,5 μM in Kombination mit nicht nachweisbaren zytotoxischen Eigenschaften besaß, woraus sich therapeutische Kennzahlen von mehr als 8 und 128 ergaben, was somit zu den höchsten therapeutischen Kennzahlen aller analysierten, aus proteinogenen Aminosäuren bestehenden, Peptide führte (Tabelle 4.13). Ebenso wie bei anderen Peptiden konnte bei der strukturellen Analyse ein ausgedehntes β -Strang-Motiv identifiziert werden, welches nahezu die gesamte Sequenz abdeckte und keine Abhängigkeit von dem verwendeten mathematischen Algorithmus oder der Berechnung zugrunde liegenden Umgebung verzeichnete (Abbildung 4.15). Somit stellt auch dieses Peptid eine einzigartige Kombination aus dreidimensionaler Struktur und biophysikalischen Eigenschaften dar, welche ebenfalls keine Übereinstimmungen mit α -helikalen [46, 91, 189, 192] oder β -Faltblatt [197-199] bildenden antimikrobiellen Peptiden zeigte. Aufgrund der Tatsache, dass die dreidimensionale Struktur lediglich in einer hydrophilen oder hydrophoben Umgebung berechnet wurde, kann jedoch keine zwangsläufige Korrelation zwischen der Struktur und dem Wirkmechanismus gefolgert werden. Dies basiert darauf, dass in vielen Fällen die Interaktion der antimikrobiellen Peptide mit den amphiphilen bakteriellen Membranen aufgrund eines Induced-Fit-ähnlichen Mechanismus in einer signifikanten Variation der Sekundärstruktur resultiert [290]. Dies konnte bereits gut anhand der Interaktion von α -helikalen [45-47] und β -Faltblatt bildenden [197-199] Peptiden mit amphiphilen Modellmembranen belegt werden. Aus diesen Gründen korreliert das

identifizierte β -Strang-Motiv eventuell nicht direkt mit der aktiven antimikrobiellen Peptidkonformation, stellt jedoch trotzdem eine hohe Relevanz für die *in silico* Entwicklung von artifiziellen antimikrobiellen Peptiden dar.

Aufgrund der Tatsache, dass das optimierte Peptid O1 sowohl über antimikrobielle als auch biologisch kompatible Eigenschaften verfügte, wurden seine selektiven Membran-permeabilisierenden Eigenschaften unter Verwendung von Mischkultur untersucht. Dabei konnte, in Analogie zu vorherigen Versuchen, eine selektive Permeabilisierung der bakteriellen Membran detektiert werden (Abbildung 4.19). Ferner wiesen sämtliche eukaryotischen Zellen keine Einschränkungen hinsichtlich des Wachstums oder Veränderungen der Morphologie auf (Abbildung 4.18, Abbildung 4.17). Aufgrund der Tatsache, dass das analysierte Peptid O1 aus proteinogenen Aminosäuren besteht, ist dieses allerdings anfällig gegenüber einer proteolytischen Spaltung durch pro- oder eukaryotische Peptidasen [132]. Aus diesem Grund sind für eine therapeutische Anwendung neben den antimikrobiellen und biologisch kompatiblen Eigenschaften auch die Stabilität und Halbwertszeit von maßgeblicher Bedeutung [127]. Kürzliche Studien haben belegt, dass die Stabilität antimikrobieller Peptide durch die Verwendung von Enantiomeren [128] oder Diastereomeren [129, 130] modifiziert werden kann, ohne die antimikrobiellen oder biophysikalischen Eigenschaften zu beeinflussen. Darüber hinaus können auch andere unnatürliche Modifikationen in die Primärsequenz der Peptide integriert werden. So konnte festgestellt werden, dass die Stabilität durch die Integration von Carbamatverbindungen, welche die biophysikalischen Eigenschaften des Peptids lediglich geringfügig beeinflussen, gesteigert werden konnte [131]. Alternativ dazu konnten vergleichbare Tendenzen bei der Verwendung von Peptidanaloga beobachtet werden, welche je nach Modifikation jedoch einen deutlich stärkeren Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften der Peptide haben und somit zu einer Veränderung des antimikrobiellen Wirkspektrums führen könnten [132]. Eine weitere oft verwendete unnatürliche Modifikation von Peptiden, um deren proteolytische Stabilität zu erhöhen, wird durch die C-terminale Amidierung repräsentiert. Diese unnatürliche Modifikation resultiert lediglich in einer geringfügigen Erhöhung der positiven Nettoladung, was bei durchgeführten Untersuchungen neben der Erhöhung der proteolytischen Stabilität auch in einer Steigerung der antimikrobiellen Eigenschaften resultierte [127, 291].

Basierend auf den analysierten Peptidbibliotheken und den korrespondierenden errechneten dreidimensionalen Strukturen konnte bei der Analyse der β -Strang formenden Peptide dargelegt werden, dass eine partielle negative Ladung innerhalb des kationischen C-terminalen Bereichs zu einer Krümmung des Peptids und somit zu einer Aufhebung des β -Strang-Motivs führte (Abbildung 4.13), was mit einer signifikanten Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften einherging (Tabelle 4.9). Dies ist auf die elektrostatischen Interaktionen der am C-Terminus lokalisierten anionischen Aminosäuren mit den N-terminalen kationischen Aminosäuren zurückzuführen. Die aus der strukturellen Variation der Konformation resultierende Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften korrelierte mit der generellen Tendenz der β -Strang bildenden antimikrobiellen Peptide, bei welchen ausgeprägte und stabilisierte Motive mit starken antimikrobiellen Eigenschaften einhergingen. Ebenso verifizieren diese Ergebnisse, dass die elektrostatischen Abstoßungskräfte beider kationischen Regionen essenziell für die horizontale Streckung der Peptide und somit für die stabile Ausbildung eines β -Strangs sind. Aufgrund der

biochemischen Struktur von proteinogenen Aminosäuren und den daraus resultierenden Peptiden, existiert jedoch stets mindestens eine negative Ladung innerhalb der Peptidsequenz, welche durch die freie Carboxygruppe des C-Terminus repräsentiert wird. Somit entstehen zwangsläufig intermolekulare, elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem C-Terminus und den enthaltenen kationischen Aminosäuren, was zu einer Schwächung der ausgedehnten β -Strang Struktur führt. Diese Tendenz ließ sich auch anhand der berechneten dreidimensionalen Peptidstrukturen verifizieren. So umfassten viele Peptide, welche ausschließlich kationische Aminosäuren innerhalb ihrer terminalen Bereiche besaßen, wie z. B. M1a, N1, C1 oder O1, eine kleine flexible C-terminale Region, welche höchst wahrscheinlich durch diese Interaktionen hervorgerufen wurde. Aus diesem Grund und der erstrebenswerten Erhöhung der Peptidstabilität wurde das Optimierte Peptid O2 generiert, welches das C-terminal amidierete Derivat des Peptids O1 darstellt. Somit wurde bei diesem Peptid eine unnatürliche Modifikation eingeführt, welche prinzipiell zu einer Steigerung der proteolytischen Stabilität beiträgt [127] und ebenfalls intermolekulare elektrostatische Interaktionen verhindert. Diese Modifikation resultierte in einer Steigerung der antimikrobiellen Aktivität, ohne dabei die biologisch kompatiblen Eigenschaften zu beeinflussen (Tabelle 4.13). Basierend auf diesen Eigenschaften stellen sowohl O1 als auch O2 vielversprechende Peptide für industrielle und therapeutische Applikationen dar und repräsentieren zudem antimikrobielle Peptide mit einer stark ausgeprägten neuartigen β -Strang Struktur, welche als Grundlage für die Entwicklung neuer Peptide und bei der Erforschung antimikrobieller Wirkmechanismen von maßgeblicher Bedeutung sein könnte.

5.2 Antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen

5.2.1 Vergleich zwischen löslichen und immobilisierten Peptiden

In Analogie zu den vorangegangenen Ergebnissen konnten bei sämtlichen analysierten Peptiden im löslichen Zustand antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen werden, wodurch das bakterielle Wachstum vollständig inhibiert wurde. Jedoch verzeichneten die analysierten Peptide unterschiedliche Membran-permeabilisierende Eigenschaften. Während LL-37, BMAP-27, und Melittin eher dem Wirkmechanismus des Antibiotikums Polymyxin B entsprachen, blieben die bakteriellen Membranen durch die Interaktion mit Buforin II und Protamin intakt, wie es auch bei dem Antibiotikum Ampicillin zu beobachten war (Tabelle 4.15). Durch die kovalente Immobilisierung dieser Peptide und Antibiotika konnte festgestellt werden, dass lediglich die Peptide mit starken Membran-permeabilisierenden Eigenschaften ihre wachstumsinhibierenden Aktivitäten behielten, wohingegen bei den im löslichen Zustand eher bakteriostatisch wirkenden antimikrobiellen Peptiden keinerlei Aktivität im immobilisierten Zustand nachweisbar war (Tabelle 4.16). Hieran wurde ersichtlich, dass für die Generierung einer Peptid-basierten kovalenten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtung vorrangig deren Wirkmechanismus von fundamentaler Bedeutung ist. Obendrein war erkennbar, dass die relativen antimikrobiellen Aktivitäten der immobilisierten Peptide im Vergleich zueinander nahezu identisch blieben. So besaßen BMAP-27 und LL-37 deutlich stärkere Aktivitäten als Melittin. Diese Ergebnisse korrelieren mit anderen

Untersuchungen bei welchen ebenfalls dieser Zusammenhang zwischen dem antimikrobiellen Wirkmechanismus und der Aktivität immobilisierter Peptide identifiziert wurde [236, 292]. Diese Unterschiede sind auf die theoretischen Interaktionsmodelle der antimikrobiellen Peptide zurückzuführen. Während die bakterizide antimikrobielle Wirkung durch die Ausprägung einer Peptid-basierten transmembranen Pore charakterisiert ist, beruht die bakteriostatische Wirkung auf einer Inhibierung von essenziellen zellulären Prozessen [39]. Bei letzterem stellt die selbst geförderte Translokation der antimikrobiellen Peptide über die bakterielle Zellmembran einen notwendigen Prozess dar [16, 63], was den Verlust der antimikrobiellen Aktivität der bakteriostatisch wirkenden Peptide im immobilisierten Zustand erklärt. In diesem Zusammenhang erwies sich die verwendete Lebend-Tot Färbung in Kombination mit durchflusszytometrischen Messungen als eine effiziente Methode für die schnelle und einfache Charakterisierung der Membran-permeabilisierenden Eigenschaften und somit für die Identifikation von aussichtsreichen Sequenzen für die Generierung von Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenmodifikationen. Dies wurde insbesondere anhand der Ergebnisse bezüglich des antimikrobiellen Peptids Protamin ersichtlich, bei welchem eine selektive Permeabilisierung der äußeren bakteriellen Membran in Kombination mit einer Bakterienaggregation detektiert werden konnte (Tabelle 4.2, Abbildung 4.4). Bei den durchflusszytometrischen Messungen konnten, im Vergleich zur Analyse von *E. coli* ML-35p, keine permeabilisierenden Charakteristiken identifiziert werden. Da die Protamin-basierten Oberflächenbeschichtungen keine antimikrobiellen, adsorbierenden oder aggregierenden Eigenschaften gegenüber den analysierten Bakterien besaßen, erwiesen sich die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen als aussagekräftiger für die Identifikation von potentiell einsetzbaren antimikrobiellen Peptiden, welche für den Einsatz zur Generierung von funktionalen kovalenten Oberflächenbeschichtungen geeignet sind.

5.2.2 Orientierung der Peptide im immobilisierten Zustand

Sämtliche verwendeten chemischen Ligationen beruhten auf einer Reaktion mit peptidinternen primären Aminen bei einem pH-Wert zwischen 7 und 9 [258], wodurch die antimikrobiellen Peptide über den N-Terminus oder über die in den Lysinseitenketten enthaltenen Amine immobilisiert wurden. Basierend darauf resultierte die Immobilisierung in nicht näher definierbaren zufälligen Orientierungen der Peptide auf den Oberflächen. Aufgrund einer Vielzahl peptidinterner Amine resultierte dies wahrscheinlich auch in mehrfachen Quervernetzungen zwischen dem Peptid und der Oberfläche. Trotz dessen konnten antimikrobielle Aktivitäten durch die bakterizid wirkenden antimikrobiellen Peptide im immobilisierten Zustand detektiert werden (Tabelle 4.15). Dies korreliert mit früheren Untersuchungen hinsichtlich der Aktivität von immobilisierten antimikrobiellen Peptiden. Hierbei konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die chemische Ligation das Aktivitätsspektrum kurzer bakterizid wirkender amphipathischer α -helikaler antimikrobieller Peptide nicht verändert, und dass die Aktivität im immobilisierten Zustand primär von den strukturellen Eigenschaften der Oberfläche, wie z. B. dem Abstand zwischen Peptid und Oberfläche oder der Peptidkonzentration, abhängig war [292]. Ferner konnte geschlussfolgert werden, dass die

Orientierung des Peptids einen deutlich geringeren Einfluss auf die antimikrobiellen Aktivitäten besaß. Andere Ergebnisse hingegen belegen, dass die Orientierung der Peptide von essenzieller Bedeutung ist. So konnte bewiesen werden, dass die Immobilisierung über den N-Terminus von Melittin in einer Reduktion der antimikrobiellen Aktivität, im Vergleich zur C-terminalen Immobilisierung, resultierte [236]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine N-terminale Immobilisierung zu einer Inaktivierung der in Melittin vorkommenden N-terminalen GIG Region führt [293], welche für die Einlagerung des Peptids in die hydrophoben Bereiche der bakteriellen Membran verantwortlich ist, wohingegen der C-terminale kationische Bereich primär mit den anionischen Bereichen der Membran interagiert [44, 294, 295]. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Aktivitäten der hier generierten Melittin-basierten Oberflächenbeschichtungen, bei welchen trotz einer zufälligen Orientierung auf der Oberfläche antimikrobielle Eigenschaften festgestellt werden konnten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass keine selektive Blockierung des N-Terminus stattfand. Andere Studien konnten außerdem nachweisen, dass die amphipathischen Eigenschaften von Peptid-basierten Oberflächenbeschichtungen maßgeblich für deren antimikrobielle Aktivität verantwortlich waren. So konnte verdeutlicht werden, dass die antimikrobielle Aktivität von Peptid-basierten Oberflächenbeschichtungen abhängig von der Anordnung der hydrophoben und kationischen Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz war [296]. Die Peptide verfügten über die ausgeprägtesten antimikrobiellen Aktivitäten, deren kationische Aminosäuren vorzugsweise nahe an der Oberfläche lokalisiert waren und deren hydrophobe Aminosäuren sich in einiger Entfernung von der Oberfläche befanden. Diese Ergebnisse verifizieren die hier erkennbare Tendenz bakterizid wirkender antimikrobieller Peptide, welche in einer zufälligen Orientierung immobilisiert wurden. Da es sich bei den Peptiden LL-37 [32], Melittin [263] und BMAP-27 [264] um α -helikale Peptide mit stark ausgeprägten amphipathischen Eigenschaften handelt, resultierte eine Immobilisierung über die Seitenketten der peptidinternen Lysine wahrscheinlich darin, dass die kationischen Aminosäuren nahe der Oberfläche lokalisiert waren und sich dementsprechend die hydrophoben Aminosäuren der amphipathischen Helix auf der gegenüberliegenden Helixebene und somit weiter von der Oberfläche entfernt befanden. Aktuell kann die Konformation der unspezifisch immobilisierten antimikrobiellen Peptide nicht eindeutig verifiziert werden, da viele dieser Peptide ihre charakteristischen Sekundärstrukturen erst aufgrund der Interaktion mit amphiphilen bakteriellen Membranen ausbilden [40, 45, 46] und bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Studien durchgeführt wurden, um die Konformation immobilisierter Peptide zu untersuchen.

5.2.3 Peptidquantifizierung

Die Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen wiesen nicht nur eine starke Abhängigkeit von den verwendeten Peptiden auf, sondern besaßen auch unterschiedliche Aktivitäten bei unterschiedlichen Immobilisierungskonzentrationen. So besaßen auf BMAP-27 beruhende Oberflächenbeschichtungen, denen eine NHS-basierte Reaktionschemie zu Grunde lag eine signifikante Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften ab einer Immobilisierungskonzentration von 8,8 μM , wohingegen größere Konzentration zu Oberflächenbeschichtungen mit ausgeprägten antimikrobiellen Eigenschaften führten (Abbildung 4.23, Tabelle 4.17). Bei dem Vergleich dieser antimikrobiellen Aktivität mit der immobilisierten Peptidmenge konnte beobachtet werden, dass bei einer 8,8 μM Konzentration eine 81 %ige Absättigung der Oberfläche stattfand, welche durch eine Konzentration von 17,5 μM auf 92 % erhöht wurde. Im Gegensatz dazu führte eine Konzentration von 4,4 μM zu einer Oberflächensättigung von 70 %, was in einer völlig inaktiven Oberflächenbeschichtung resultierte. Dies legt nahe, dass die Aktivitäten von Peptid-basierten Oberflächenmodifikationen nicht linear mit der Peptidmenge skalieren, sondern vielmehr ein Schwellenwert der Oberflächenabsättigung erreicht werden muss, um die antimikrobielle Aktivität zu gewährleisten. Diese Tendenz wurde auch bei den Ergebnissen bezüglich der BMAP-27-modifizierten PLL-Netzwerke ersichtlich, bei welchen unterschiedliche Komplexitäten untersucht wurden. So konnte festgestellt werden, dass bei einer konstanten Immobilisierungskonzentration von 140 μM bei wenig komplexen Netzwerken zunächst geringe antimikrobielle Aktivitäten detektiert wurden, welche anfänglich mit der Komplexität anstiegen und ab Netzwerken mit 3 bzw. 4 individuellen PLL-Schichten erneut verringert wurden (Abbildung 4.26). Ferner zeigte sich auch, dass die absolute Menge der in den PLL-Netzwerken immobilisierten Peptide kontinuierlich mit der Komplexität zunahm (Abbildung 4.28 B). Basierend auf diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass bei geringen Komplexitäten keine vollständige Abdeckung der Oberfläche mit reaktiven Modifikationen und somit mit antimikrobiellen Peptiden stattfand, woraus die reduzierten antimikrobiellen Aktivitäten resultierten. Mit zunehmender sukzessiver Modifikation der Oberflächen nahm auch die Dichte der reaktiven Modifikationen auf der Oberfläche zu, wodurch eine ausreichende Oberflächensättigung erreicht werden konnte. Bei einer weiteren Steigerung der Komplexität nahm die Anzahl der reaktiven Gruppen auf der Oberfläche erneut zu, wobei jedoch die konstante Immobilisierungskonzentration nicht ausreichend war, um eine hinreichende Absättigung der Oberfläche zu gewährleisten, wodurch die notwendige Schwellenkonzentration nicht erreicht werden konnte und somit nur stark reduzierte antimikrobielle Eigenschaften zu beobachten waren. Diese Ergebnisse korrelieren mit früheren Studien, bei welchen ebenfalls eine Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von der immobilisierten Peptidmenge beschrieben wurde. So ergaben diese Untersuchungen, dass eine ausreichende Dichte an funktionalen Modifikationen auf den verwendeten Nanopartikeln vorhanden sein musste, um antimikrobielle Aktivitäten durch das immobilisierte Peptid LL-37 nachweisen zu können [297]. Ebenso konnte Anhand von Untersuchungen geschlussfolgert werden, dass zwei Azid-basierte Immobilisierungsstrategien zu unterschiedlichen Konzentrationen des antimikrobiellen Peptids Melimin auf der Oberfläche führten [232]. Zudem wurde festgestellt, dass mit steigender Peptidkonzentration eine

Steigerung der antimikrobiellen Eigenschaften einherging. Diese Tendenz wurde auch bei Studien beobachtet, bei welchen unterschiedliche Peptidmengen mittels einer Biotin-Streptavidin Interaktion immobilisiert wurden. Hierbei ergab sich ein sigmoidaler Verlauf der antimikrobiellen Aktivität in Abhängigkeit der Peptidkonzentration [296]. Solch ein Verlauf könnte auch der immobilisierungskonzentrationsabhängigen Membranpermeabilisierung von BMAP-27-basierten Oberflächenbeschichtungen zugrunde liegen, was jedoch zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund der eingeschränkten Anzahl der Messdaten nicht eindeutig verifiziert werden kann.

5.2.4 Bakterienkonzentration und Adhäsion

Neben den antimikrobiellen Eigenschaften und der daraus resultierenden Inhibierung des bakteriellen Wachstums, wiesen die BMAP-27-basierten Oberflächenbeschichtungen, denen eine NHS-modifizierte Oberfläche zu Grunde lag auch eine Reduktion der nachweisbaren Bakterien auf (Abbildung 4.23 A). Während bei der Interaktion des löslichen antimikrobiellen Peptids mit den Bakterien lediglich eine Permeabilisierung der bakteriellen Membran ersichtlich wurde, wobei jedoch die Gesamtzahl der Bakterien erhalten blieb (Abbildung 4.24 A), führte die Interaktion mit Oberflächenbeschichtungen, denen eine Immobilisierungskonzentration oberhalb von $8,8 \mu\text{M}$ zu Grunde lag, zu einer signifikanten Reduktion der Bakterienkonzentration. Dies könnte auf einen lytischen Mechanismus der antimikrobiellen Peptide zurückzuführen sein, welcher durch die hohe lokale Konzentration der Peptide an der Oberfläche bedingt ist. Da die vollständige Lyse von Bakterien zu einer Freisetzung von Biomolekülen, insbesondere Phosphoglyceriden führen würde, könnte dies in Kombination mit einer passiven Adsorption und einer damit verbundene Abschirmung der antimikrobiellen Peptide von der Umgebung zu einer Inaktivierung der antimikrobiellen Oberflächenbeschichtung führen [298]. Dennoch waren die BMAP-27-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen durch eine Aktivität gekennzeichnet, welche zu einer Reduktion der lebensfähigen Bakterien von mehr als 3 Zehnerpotenzen führte. Dies deutet darauf hin, dass eine schnelle Inaktivierung der Oberflächenmodifikation durch bereits früh im Prozess freigesetzte Biomoleküle nicht stattfand. Jedoch können zum jetzigen Zeitpunkt keine Angaben zur Langlebigkeit und Wiederverwendbarkeit der generierten BMAP-27-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen gemacht werden. Die Reduktion der Bakterienkonzentration könnte auch auf eine Adsorption der negativ geladenen Bakterien durch die kationischen Oberflächenbeschichtungen zurückzuführen sein. Solche Interaktionen konnten bereits in früheren Studien bei der Entwicklung von Biosensoren und Selektionsverfahren dokumentiert werden. In diesem Zusammenhang wurden antimikrobielle Peptide dazu verwendet um Bakterien an festen Oberflächen zu immobilisieren und gleichzeitig eine Anreicherung durchzuführen [141, 142, 299]. Jedoch konnte bei den hier durchgeführten Analysen solch eine Adsorption an den BMAP-27-modifizierten Oberflächen, welchen eine NHS-basierte Immobilisierungsstrategie zugrunde lag, nicht beobachtet werden. Im Vergleich dazu führte jedoch die Interaktion der Bakterien mit BMAP-27-modifizierten und PLL-basierten kovalenten Oberflächenbeschichtungen zu einer starken Adsorption (Abbildung 4.27). Diese Tendenz unterschied sich

von den vorherigen Untersuchungen und ist wahrscheinlich auf die stark veränderten Oberflächeneigenschaften der PLL-basierten Beschichtungen zurückzuführen. Darüber hinaus wird anhand dieser Ergebnisse deutlich, dass mit steigender Komplexität des Netzwerks die Adsorptionsfähigkeit zunimmt, wobei die angelagerten Bakterien zunächst stark permeabilisierte Membranen verzeichneten. Erst bei einem aus 4 individuellen Schichten bestehenden Netzwerk konnte keine Permeabilisierung der Membranen mehr beobachtet werden. Dies korreliert mit den antimikrobiellen Eigenschaften dieser Oberflächenbeschichtungen, bei welchen eine Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften mit stark steigender Komplexität der Netzwerke festgestellt werden konnte (Abbildung 4.26). Die bereits zuvor geschlussfolgerte Unterschreitung einer charakteristischen Schwellenkonzentration scheint ebenfalls dafür verantwortlich zu sein, dass bei einem aus 4 individuellen Schichten bestehenden Netzwerk keine permeabilisierenden Eigenschaften gegenüber den angelagerten Bakterien detektiert werden konnten, wohingegen jedoch die adsorbierenden Eigenschaften erhalten blieben. Obwohl die Adsorption der Bakterien auf eine schrittweise Blockierung der antimikrobiellen Oberflächenbeschichtung und somit einer Inaktivierung hindeutet, können zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussagen über die Langlebigkeit und Wiederverwendbarkeit getroffen werden, da keine Erkenntnisse über die Stärke der adsorptiven Anlagerung existieren. So besteht auch die Möglichkeit, dass es sich bei den angelagerten Bakterien um eine zeitlich begrenzte schwache Interaktion handelt, welche eventuell mittels Elution aufgehoben werden kann.

5.2.5 Immobilisierungsstrategie

Die Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen waren nicht nur durch eine starke Abhängigkeit von den verwendeten Peptiden gekennzeichnet, sondern zeigten auch unterschiedliche Aktivitäten und Eigenschaften aufgrund verschiedener Immobilisierungsstrategien. Diesbezüglich verzeichneten die immobilisierten Peptidmengen deutliche Unterschiede. So konnte verifiziert werden, dass die relative immobilisierte Peptidmenge von BMAP-27 auf Epoxy- oder PDITC-modifizierten Oberflächen in etwa dem 2,3- bzw. 2,7-fachen von der immobilisierten Menge auf NHS-basierten Oberflächen entsprach (Abbildung 4.21). Dies korreliert mit Untersuchungen bei welchen eine 2,7-fache bzw. 2,1-fache Menge von Oligonukleotiden auf PDITC-modifizierte Oberflächen im Vergleich zu NHS- und Aldehyd-modifizierten Oberflächen beschrieben wurde [300]. Obwohl die relative immobilisierte Peptidmenge auf PDITC- oder Epoxy-modifizierten Oberflächen im Vergleich zu NHS oder Aldehyd-basierten Oberflächen stark erhöht war, verzeichneten sie deutlich verringerte antimikrobielle Eigenschaften (Tabelle 4.16). Diese Unterschiede wurden insbesondere anhand der immobilisierungskonzentrationsabhängigen Membranpermeabilisierung von BMAP-27-basierten Oberflächenbeschichtungen ersichtlich, denen entweder eine PDITC- oder eine NHS-modifizierte reaktive Oberfläche zu Grunde lag. Während die NHS-basierte chemische Ligation bereits bei geringen Peptidkonzentrationen in einer funktionellen antimikrobiellen Oberflächenbeschichtung resultierte, führte sogar eine 140 μM Peptidkonzentration in Kombination mit einer PDITC-basierten

Immobilisierungsstrategie lediglich zu Oberflächen mit geringer antimikrobieller Aktivität (Abbildung 4.23, Tabelle 4.17). Hierbei unterschieden sich diese beiden Oberflächenbeschichtungen auch hinsichtlich ihrer relativen immobilisierten Peptidmengen, der daraus resultierenden Oberflächensättigung und den finalen antimikrobiellen Eigenschaften. In diesem Kontext führte eine NHS-basierte chemische Ligation bereits ab Immobilisierungskonzentrationen von $8,8 \mu\text{M}$ zu einer 81 %igen Absättigung in Kombination mit antimikrobiellen Eigenschaften, wohingegen bei den PDITC-basierten Oberflächenbeschichtungen nur geringe antimikrobielle Aktivitäten festgestellt werden konnten, obwohl bei einer $140 \mu\text{M}$ Immobilisierungskonzentration eine nahezu vollständige Absättigung der Oberfläche realisiert wurde. Ferner entsprach die relative Peptidmenge dem 2,7-fachen einer äquivalenten NHS-basierten Oberflächenbeschichtung. In Analogie dazu wiesen ebenfalls die Peptide Melittin, LL-37 und BMAP-27, welche entweder mittels einer PDITC oder einer Epoxy-basierten Reaktionschemie immobilisiert wurden, nur geringe wachstumsinhibierende und Membran-permeabilisierende Aktivitäten im Vergleich zu den NHS- und Aldehyd-basierten äquivalenten Oberflächenbeschichtungen auf (Tabelle 4.16). Lediglich durch die Verwendung des Peptids BMAP-27 ließen sich geringe Aktivitäten nachweisen, welche wahrscheinlich auf die generellen stärkeren antimikrobiellen Aktivitäten des Peptids im Vergleich zu Melittin und LL-37 zurückzuführen sind (Tabelle 4.15). Basierend auf diesen Ergebnissen können die verschiedenen Aktivitäten der antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen nicht ausschließlich auf die unterschiedlichen relativen Peptidmengen oder Oberflächensättigungen zurückgeführt werden. Obwohl sämtliche verwendeten chemischen Ligationen auf einer unspezifischen Reaktion mit peptidinternen primären Aminen beruhen, unterscheiden sie sich jedoch hinsichtlich ihrer Reaktivitäten und Stabilitäten [258], was die unterschiedlichen Aktivitäten rechtfertigen könnte. So resultiert die Kondensationsreaktion zwischen Aldehyden und peptidinternen Aminen in der Ausprägung einer instabilen Schiff'schen Base, welche aufgrund einer hydrolytischen Spaltung das immobilisierte Peptid in die Umgebung abgeben könnte und somit die generelle gesteigerte Aktivität von Aldehyd-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen erklären würde [301]. Gleichmaßen könnten NHS-Modifikationen vor der chemischen Ligation hydrolysieren, wodurch Oberflächen mit anionischen Carboxygruppen entstehen würden. Diese könnten im Anschluss daran eine elektrostatische Interaktion und eine damit verbundene nicht kovalente Anlagerung von kationischen antimikrobiellen Peptiden begünstigen, welche im Anschluss daran in nicht vorhersehbarer Weise von der Oberfläche freigesetzt werden könnten, wodurch die starken antimikrobiellen Eigenschaften von NHS-basierten Oberflächenbeschichtungen entstehen könnten. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die Ausbildung einer Peptidbindung aufgrund der Reaktion des aktivierten NHS-Esters mit den peptidinternen Aminen innerhalb kürzester Zeit geschieht, wohingegen die Halbwertszeit der Hydrolyse bei pH 7,0 mit 4 – 5 h die Reaktionszeit um ein vielfaches überschreitet [302]. Um dennoch eine ungewollte Freisetzung der antimikrobiellen Peptide während der durchgeführten Versuche ausschließen zu können wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei welchen die Inkubationsüberstände der kovalenten Oberflächenbeschichtungen hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivitäten analysiert wurden. Es konnten jedoch in sämtlichen Überständen keine Aktivitäten identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass die antimikrobiellen Peptide während der durchgeführten Versuche nicht von der Oberfläche freigesetzt wurden (Abbildung

4.22 B, Abbildung 4.26 B). Dies wird auch dadurch verifiziert, dass im Vergleich zu den bakterizid wirkenden antimikrobiellen Peptiden die immobilisierten bakteriostatisch wirkenden Peptide keine Inhibierung des bakteriellen Wachstums verursachten, wie es bei den entsprechenden, in Lösung befindlichen Peptiden zu beobachten war (Tabelle 4.15, Tabelle 4.16). Darüber hinaus konnten auch keine zytotoxischen Eigenschaften der BMAP-27-basierten Oberflächenbeschichtungen festgestellt werden, wie es bei einer ungewollten Freisetzung des Peptids zu beobachten gewesen wäre. Somit können die gesteigerten antimikrobiellen Aktivitäten der NHS- und Aldehyd-basierten Oberflächenbeschichtungen auch nicht auf die Hydrolyse instabiler chemischer Verbindungen oder die elektrostatische Anlagerung von Peptiden zurückgeführt werden. Daraus ergibt sich, dass diese Varianz der Aktivitäten direkt auf den unterschiedlichen chemischen Ligationen beruhen könnte. Primär basieren sämtliche reaktiven Oberflächenmodifikationen auf einer Kondensation der funktionellen Hydroxylgruppen der Oberfläche mit den hydrolysierbaren Alkoxygruppen der verwendeten Organosilane, wodurch eine kurzkettenartige hydrophobe Oberflächenmodifikation entsteht [303]. Durch weitere Derivatisierungen wird diese mit den individuellen Gruppen für die chemischen Ligationen versehen, wobei sich die verschiedenen Modifikationen hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften geringfügig voneinander unterscheiden [258]. Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch in der ausgebildeten chemischen Verbindung zwischen dem antimikrobiellen Peptid und der Oberfläche. Bei der NHS-basierten Immobilisierungsstrategie resultiert die chemische Ligation in der Ausbildung einer Peptidbindung, welche über eine Alkankette mit den Organosilanen verbunden ist [304]. Im Gegensatz dazu resultiert eine PDITC-basierte chemische Ligation in der Ausbildung einer Thioharnstoffverbindung [300]. Jedoch existiert hierbei, basierend auf der chemischen Aktivierung der Oberfläche mit PDITC, ein stark hydrophober Phenylring, welcher im Vergleich zu einer NHS-basierten chemischen Ligation, eine signifikante Veränderung der Oberflächeneigenschaften darstellt [304]. Versuche mit immobilisierten und einheitlich orientierten Peptiden legten nahe, dass die Aktivität einer Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtung mit der Anordnung hydrophober und kationischer Aminosäuren relativ zu der Oberfläche korreliert. Dabei wurde ersichtlich, dass eine Lokalisation der hydrophoben Aminosäuren entfernt von der Oberfläche zu aktiveren antimikrobiellen Beschichtungen führte [296]. Da neben den hydrophoben auch die kationischen Eigenschaften der Peptide von entscheidender Bedeutung waren, ergab sich daraus, dass sich diese für eine Steigerung der antimikrobiellen Aktivität nahe an der Oberfläche befinden mussten. Dies könnte erklären, warum die Verwendung einer PDITC-basierten Immobilisierungsstrategie zu einer signifikanten Reduktion der antimikrobiellen Eigenschaften der kovalenten Oberflächenbeschichtung, im Vergleich zu einer NHS-basierten chemischen Ligation, führte. Bei NHS-modifizierten Oberflächen findet eine Reaktion mit den kationischen, peptidinternen Lysinen statt, wodurch die kationischen Aminosäuren nahe der Oberfläche lokalisiert sind. Aufgrund der Tatsache, dass BMAP-27 eine starke amphipathische α -helikale Struktur ausbildet [264], resultiert dies darin, dass die hydrophoben Aminosäuren entfernt von der Oberfläche lokalisiert sind. Bei einer PDITC-basierten chemischen Reaktion ist davon auszugehen, dass die Ligation und die damit verbundene Konformation des Peptids auf der Oberfläche analog zu der NHS-basierten Immobilisierung ist. Hierbei existiert jedoch zwischen dem Peptid und der Oberfläche ein stark hydrophober Phenylring. Somit befinden sich die kationischen Aminosäuren des Peptids zwischen

dem hydrophoben Phenylring und den hydrophoben Aminosäuren, wodurch die amphipathischen Eigenschaften des Peptids reduziert und somit die antimikrobiellen Aktivitäten verringert werden könnten. Aufgrund dieser Ergebnisse wird ersichtlich, dass die Selektion der chemischen Immobilisierungsstrategie einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der antimikrobiellen Oberflächenbeschichtung besitzt. Ferner ergibt sich daraus jedoch auch, dass durch die Kombination der passenden Reaktionschemie mit dem entsprechenden Peptid eine Optimierung der antimikrobiellen Oberflächeneigenschaften durchgeführt werden kann, um einerseits die Aktivität zu maximieren und andererseits die notwendige Peptidmenge zu minimieren.

5.2.6 Zytotoxizität

Während die antimikrobiellen Eigenschaften von kovalenten Peptid-basierten Oberflächenbeschichtungen einen der maßgeblichsten Parameter darstellen, existieren vor allem hinsichtlich der potentiellen Anwendung weitere Anforderungen. Eines der wichtigsten Merkmale wird durch die biologisch kompatiblen Eigenschaften repräsentiert, insbesondere wenn ein antimikrobielles Peptid mit ausgeprägten zytotoxischen Eigenschaften, wie z. B. BMAP-27 [305] verwendet wird. Bei den Ergebnissen zeigte sich, dass BMAP-27 in Lösung Membran-permeabilisierende Eigenschaften gegenüber der bakteriellen und eukaryotischen Membran ab Konzentrationen von 2 und 4 μM besaß (Abbildung 4.24). Im Vergleich dazu konnte gezeigt werden, dass die BMAP-27-basierten antimikrobiellen Beschichtungen, welchen NHS-modifizierte Oberflächen zugrunde lagen, deutlich andere Aktivitäten verzeichneten. So konnten antimikrobiellen Eigenschaften ab einer Immobilisierungskonzentrationen von mehr als 8,8 μM detektiert werden, wohingegen selbst bei einer 140 μM Immobilisierungskonzentration keine zytotoxischen Eigenschaften auftraten. Dies korreliert auch mit den Ergebnissen der Mischkulturen aus *E. coli* und U-937 Zellen, bei welchen eine selektive Permeabilisierung der bakteriellen Membran bei Konzentrationen oberhalb 8,8 μM beobachtet werden konnte (Abbildung 4.25). Zudem ließ die verlängerte Inkubation erkennen, dass das bakterielle Wachstum erheblich inhibiert wurde, wohingegen die eukaryotischen Zellen keine Einschränkungen aufwiesen. Dies stimmt mit früheren Untersuchungen überein, bei welchen bereits Peptid-basierte kovalente antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften gegenüber eukaryotischen Zelllinien untersucht wurden [235]. Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass Peptid-basierte Oberflächenbeschichtungen keinen Einfluss auf das eukaryotische Wachstum besaßen. Aufgrund der Tatsache, dass immobilisierte antimikrobielle Peptide hinsichtlich ihrer Mobilität limitiert sind und basierend auf ihrer Peptidlänge nicht in der Lage sind die bakterielle oder eukaryotische Membran vollständig zu durchspannen, wurde in früheren Studien ein auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhendes Interaktionsmodell postuliert [296]. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass die antimikrobiellen Eigenschaften auf der Verschiebung der elektrostatischen Eigenschaften innerhalb der bakteriellen Membran beruhen, was zu einem elektrostatischen Ungleichgewicht und einer Destabilisierung der bakteriellen Membran führt, wodurch ein autolytischer oder vergleichbarer, zum Zelltod führender, Mechanismus induziert wird. Da jedoch Bakterien [306, 307],

sowie U-937 Zellen [308] über starke, negativ geladene Zelloberflächen verfügen und deren Membranen bei geringen BMAP-27 Konzentrationen in Lösung gleichermaßen permeabilisiert wurden, kann die beobachtete selektive Permeabilisierung der bakteriellen Membran durch die Interaktion mit BMAP-27-basierten kovalenten Oberflächenbeschichtungen nicht ausschließlich auf den elektrostatischen Wechselwirkungen und der Destabilisierung beruhen. Sattdessen ist es wahrscheinlich, dass ebenfalls die unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften von Pro- und Eukaryoten Auswirkungen auf die selektive Permeabilisierung besitzen. Einerseits entsprechen die U-937 Zellen in etwa der 10-fachen Größe einer durchschnittlichen *E. coli* Zelle, wodurch lediglich eine reduzierte relative Interaktionsfläche zwischen den planen antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen und den runden eukaryotischen Zellen zustande kommt. Andererseits besitzen die Eukaryoten eine deutlich breitere Zellmembran, wodurch die Interaktionen zwischen den immobilisierten antimikrobiellen Peptiden und den Zielmolekülen innerhalb der eukaryotischen Membran aufgrund der reduzierten Mobilität verhindert wird.

5.2.7 Kontinuierliche Wirkstofffreisetzung

Als Alternative zu den kovalenten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen wurden PLL-basierte Polymernetzwerke auf der Oberfläche generiert, um die elektrostatische Anlagerung von antimikrobiellen Peptiden zu ermöglichen. Durch eine darauf folgende kontinuierliche Freisetzung des antimikrobiellen Peptids ist es somit möglich bakterielle Kontaminationen bereits in oberflächennahen Regionen zu verhindern, ohne dass ein direkter Kontakt zwischen dem Bakterium und der Oberfläche stattfinden muss. Um eine langanhaltende Prävention vor bakteriellen Kontaminationen durch das von der Oberfläche freigesetzte antimikrobielle Peptid zu gewährleisten, müssen sowohl die auf der Oberfläche deponierte Peptidmenge, sowie dessen zeitliche Abgabe optimiert werden. Zu diesem Zweck wurden mittels sukzessiver chemischer Derivatisierung PLL-basierte Oberflächennetzwerke mit unterschiedlichen Komplexitäten generiert und deren Fähigkeit zur Adsorption und kontinuierlichen Freisetzung des antimikrobiellen Peptids untersucht. Bei der Quantifizierung der an der Oberfläche befindlichen Amine zeichnete sich ab, dass selbst bei unterschiedlichen Komplexitäten die Signalintensitäten nahezu konstant blieben (Abbildung 4.28). Dies ist darauf zurückzuführen, dass während der Modifikation die bereits vorhandenen PLL-Schichten carboxyliert wurden und diese, aufgrund der verwendeten Nachweismethode, nicht detektiert wurden und somit nicht zur Signalintensität beitrugen [260]. Somit entsprachen die detektierten Signale lediglich der finalen PLL-Schicht, deren Menge unabhängig von der Komplexität der Netzwerke war. Dies korreliert mit Untersuchungen von LBL-Verfahren, bei welchen aufgrund elektrostatischer Abstoßungen lediglich eine gewisse Menge eines Polyelektrolyts an die bereits bestehende Oberfläche angelagert werden konnte, wodurch ein lineares Wachstum der Polyelektrolytschichten beobachtet wurde [239, 309, 310]. Die Komplexität der hier generierten PLL-basierten Netzwerke wird außerdem durch die Menge des elektrostatisch angelagerten Peptids Protamin reflektiert. So konnte demonstriert werden, dass mit zunehmender Komplexität der Netzwerke mehr antimikrobielles Peptid an die carboxylierten Oberflächen angelagert wurde, wobei jedoch die

Peptidmenge durch ein aus 2 oder 3 Schichten bestehendes Netzwerk im Vergleich zu einer einfachen PLL-Schicht kaum gesteigert werden konnte (Abbildung 4.28). Dies könnte auf mehrere Faktoren zurückzuführen sein, zu welchen unter anderem die Peptidmenge während der elektrostatischen Anlagerung, die begrenzte Zugänglichkeit des anionischen Oberflächennetzwerks oder die elektrostatischen Abstoßungsreaktionen der bereits angelagerten kationischen Peptide gehören. Neben den vollständig carboxylierten PLL-Netzwerken wurden auch Netzwerke verwendet, deren finale PLL-Modifikation über kationische Amine verfügte. Hierbei konnten bei der Analyse des elektrostatisch angelagerten Protamins keine signifikanten Unterschiede zu den unbeladenen kationischen Oberflächen herausgefunden werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das antimikrobielle kationische Peptid Protamin aufgrund der elektrostatischen Abstoßungskräfte nicht in ausreichender Menge an der Oberfläche angelagert werden konnte. Andererseits könnte auch die parallele Detektion der Oberflächen-assoziierten Amine und der Protamin internen Amine oder Guanidine eine hinreichende Quantifizierung der adsorbierten Peptidmenge verhindern.

Hinsichtlich der Inhibierung des bakteriellen Wachstums durch freigesetztes Protamin konnte geschlussfolgert werden, dass mit zunehmender Vielschichtigkeit der Oberflächennetzwerke eine zeitliche Steigerung der Prävention vor bakteriellen Kontaminationen stattfand (Abbildung 4.29 A). Es wurde auch erkennbar, dass Oberflächennetzwerke mit einer finalen kationischen Schicht ebenfalls Protamin eluieren, was zu einer Inhibierung des bakteriellen Wachstums führte. Im Vergleich zu äquivalenten, jedoch carboxylierten Netzwerken, war die zeitliche Inhibierung des bakteriellen Wachstums jedoch verringert. Dies könnte unter anderem auf eine deutlich reduzierte adsorbierte Peptidmenge zurückzuführen sein, wie es bereits bei der Quantifizierung der Oberflächen-assoziierten Amine ersichtlich wurde. In diesem Zusammenhang haben Untersuchungen gezeigt, dass die Freisetzung von kleinen Molekülen aus komplexen Netzwerken von vielerlei Faktoren, wie der Porosität des Materials, der elektrostatischen Interaktionen zwischen den Molekülen und dem Netzwerken, als auch den Diffusionseigenschaften, abhängig ist [242]. Basierend darauf könnte die reduzierte Abgabe des kationischen Peptids durch PLL-basierte Netzwerke auch darauf zurückzuführen sein, dass durch die finale kationische Schicht die Diffusionseigenschaften maßgeblich verändert wurden. In diesem Zusammenhang haben Untersuchungen bei LBL-Verfahren bewiesen, dass die Ladung der finalen Schicht signifikante Auswirkung auf die Diffusionseigenschaften von Peptiden innerhalb des polymeren Netzwerks und seiner Freisetzung in das umgebende Medium besaß [239]. Es konnte belegt werden, dass die finale kationische Schicht eine elektrostatische Barriere darstellt, welche dazu führte, dass die zeitliche Abgabe eines kationischen Peptids ausgedehnt wurde. Im Vergleich zu den hier verwendeten PLL-basierten Netzwerken werden die kationischen Peptide bei LBL-Verfahren jedoch bereits während der repetitiven Anlagerung von kationischen und anionischen Polyelektrolyten auf den Oberflächen deponiert [239]. Dadurch befinden sie sich unterhalb der finalen kationischen Barriere, wohingegen sie bei den hier verwendeten PLL-basierten Netzwerken diese für eine Anlagerung zunächst überwinden müssen, was jedoch aufgrund von elektrostatischen Abstoßungsreaktionen beträchtlich erschwert ist. Dies erklärt die deutlich reduzierten antimikrobiellen Eigenschaften der nicht carboxylierten Oberflächennetzwerke. Die carboxylierten Oberflächennetzwerke waren hingegen durch eine signifikante Steigerung der zeitlichen Abgabe des

antimikrobiellen Peptids Protamin gekennzeichnet. So konnte durch die Verwendung von einem aus 3 individuellen Schichten bestehenden PLL-basierten Netzwerk das bakterielle Wachstum bis mindestens zur 14. Waschfraktion inhibiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass bei der Quantifizierung der Oberflächen-assoziierten Amine keine signifikante Steigerung der angelagerten Protaminmenge detektiert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass durch die steigende Vielschichtigkeit und Elektronegativität der Oberflächennetzwerke die Abgabe des antimikrobiellen Peptids beeinflusst wurde. Anhand der zeitlichen Abgabe von kationischen Peptiden aus LBL-Netzwerken konnte bereits demonstriert werden, dass die Komposition und die damit verbundene Elektronegativität der Netzwerke einen signifikanten Einfluss auf das Elutionsprofil eines kationischen Peptids besaß [241]. Hierbei führte der zunächst hohen Konzentrationsgradienten zu einer Freisetzung von mehr als 60 % des angelagerten Peptids in weniger als 24 h. Durch die entsprechende Modifikation der Polyelektrolyte innerhalb der LBL-Schichten konnte diese Abgabe verringert werden, wodurch sich das Elutionsprofil von einem asymptotischen zu einem linearen Anstieg veränderte. In Analogie dazu kann somit davon ausgegangen werden, dass durch die Erhöhung der Komplexität der PLL-basierten Netzwerke und der damit verbundenen Steigerung der Elektronegativität eine Abgabe des Peptids verzögert wurde, wodurch länger anhaltende antimikrobielle Eigenschaften detektiert werden konnten, ohne dass eine Steigerung der elektrostatisch angelagerte Peptidmenge nötig war. Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass die generierten Netzwerke erneut mit Protamin beladen werden konnten, wobei keine Einschränkung hinsichtlich der zeitlichen Peptidabgabe existierte. Dies stellt einen signifikanten Unterschied zu LBL-basierten Oberflächennetzwerken dar, bei welchen das kationische Peptid bereits während der Generierung innerhalb der einzelnen Schichten deponiert wird, wodurch eine erneute Beladung ausgeschlossen ist [240]. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, dass während der Elution des antimikrobiellen Peptids die PLL-basierten und kovalent miteinander verbundenen Schichten erhalten blieben. Dies basiert darauf, dass durch die chemische Ligation einzelner individueller Schichten die Masse der an der Oberfläche angelagerten initialen Schicht drastisch erhöht wurde. Darüber hinaus führt die Quervernetzung der einzelnen Schichten zu einer weiteren Steigerung der Stabilität. Dies stellt ebenfalls einen signifikanten Unterschied zu LBL-basierten Verfahren dar, bei welchen ein kontinuierlicher Abbau einzelner Schichten beobachtet wurde, was ebenfalls darin resultierte, dass diese Schichten nicht erneut für die elektrostatische Anlagerung von kationischen Peptiden verwendet werden konnten [241]. Da die hier verwendeten PLL-basierten Oberflächennetzwerke deutlich stabilere Eigenschaften als LBL-Netzwerke verzeichneten, stellt dies einen weiteren Vorteil dar, da keine ungewollten Interaktionen zwischen den Netzwerkkomponenten und den in der Umgebung befindlichen biologischen Systemen stattfinden. Somit können, speziell im Fall einer medizinischen Anwendung, ungewollte Kreuzreaktivitäten verhindert werden.

Neben der Freisetzung des antimikrobiellen Peptids wurden auch die direkten antimikrobiellen Eigenschaften durch den Kontakt der Bakterien mit den PLL-basierten Oberflächennetzwerken untersucht. Somit konnte gezeigt werden, dass die unbeladenen PLL-basierten Oberflächenbeschichtungen keine antimikrobiellen Eigenschaften besaßen und dass sich die antimikrobiellen Eigenschaften der Protamin beladenen Oberflächen nicht signifikant von den Ergebnissen bezüglich der sukzessiven Freisetzung des

Peptids unterschieden (Abbildung 4.29 B). Hieraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Aktivitäten lediglich durch das abgegebene Peptid vermittelt wurden. Als Alternative zu den planaren PLL-basierten Oberflächenbeschichtungen wurden ebenfalls Kollagen-basierte Wundauflagen mit verschiedenen PLL-Netzwerken modifiziert. Im Vergleich zu den vorherigen Versuchen, konnten bereits bei unmodifizierten Oberflächen antimikrobielle Eigenschaften festgestellt werden, welche in einer Inhibierung des bakteriellen Wachstums bis hin zur 2. Waschfraktion resultierten (Abbildung 4.30 A). Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei den verwendeten Wundauflagen um komplexe dreidimensionale Material handelte, welche aufgrund ihrer Porosität in der Lage waren eine ausreichende Menge Protamin zu adsorbieren und im Anschluss daran kontinuierlich in das umgebende Medium abzugeben. Dies korreliert mit früheren Studien, bei welchen eine Verzögerung der Abgabegeschwindigkeit von antimikrobiellen Peptiden aufgrund der Tortuosität der Diffusionsstrecke [242], der Schichtdicke [311] und der Peptid-Polymer Interaktionen [243] beschrieben wurde. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die verwendeten PLL-basierten Oberflächenmodifikationen eine gute Alternative zu kovalenten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen darstellen, welche sich vor allem durch ihre kontinuierliche und lang anhaltende Abgabe des Peptids, sowie ihrer Wiederverwendbarkeit auszeichnen. Jedoch lassen die Ergebnisse auch erkennen, dass eine hinreichende Komplexität der Oberflächennetze notwendig ist um eine ausreichende elektrostatische Interaktion mit dem kationischen antimikrobiellen Peptid realisieren zu können.

6 Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren haben sich, aufgrund des intensiven Einsatzes von Antibiotika, eine Vielzahl von resistenten Bakterien entwickelt, zu welchen unter anderem MRSA, als auch ESBL exprimierende *Enterobacteriaceae* gehören. Aus diesem Grund wurde die Entwicklung von alternativen antimikrobiell wirksamen Stoffen intensiviert, wobei jedoch nur wenige neue Agenzien entwickelt werden konnten. Eine der aussichtsreichsten Alternativen für die Entwicklung neuer Substanzen, stellen antimikrobielle Peptide dar, welche jedoch je nach Sequenz auch zytotoxische Eigenschaften aufweisen können und somit für eine therapeutische Applikation nur begrenzt einsetzbar sind. Weiterhin verfügen sie oftmals über schlechte pharmakokinetische Eigenschaften, wodurch ihre potentielle Anwendung limitiert ist. Aufgrund dieser Aspekte ist es erstrebenswert neuartige Peptide mit optimierten Eigenschaften, wie z. B. antimikrobieller Aktivität, biologischer Kompatibilität oder proteolytischer Stabilität, zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurde hier ein rationales Design von neuartigen antimikrobiellen Peptiden mit einzigartigen Primär- und Sekundärstrukturen durchgeführt. Unter Verwendung verschiedener Peptidbibliotheken wurde diese Sequenz hinsichtlich ihrer antimikrobiellen, zytotoxischen und Membran-permeabilisierenden Eigenschaften analysiert und mit bereits bekannten und gut untersuchten antimikrobiellen Peptiden verglichen. Weiterhin wurden mittels mehrerer Peptidbibliotheken Optimierungen der artifiziellen Peptide bezüglich ihrer essenziellen Regionen, minimalen Sequenzlänge und Peptidkomposition durchgeführt. Hieraus konnte eine optimierte Sequenz abgeleitet werden, welche sich durch starke antimikrobielle und biologisch kompatible Eigenschaften auszeichnete. Während den Analysen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die antimikrobiellen Aktivitäten dieser Peptide im Allgemeinen mit den charakteristischen dreidimensionalen Peptidkonformationen einhergingen. Hierbei wurde verifiziert, dass diese Peptide über ein β -Strang-Motiv verfügten, welches keine Übereinstimmungen mit früheren identifizierten antimikrobiell wirksamen Konformationen besaß und somit ein neuartiges Motiv repräsentierte. Für die Optimierung der strukturellen Eigenschaften wurde ebenfalls eine C-terminale Amidierung durchgeführt. Hierdurch konnte eine elektrostatische, peptidinterne Interaktion zwischen den kationischen Aminosäuren und dem C-Terminus verhindert werden, was in einer Stabilisierung der Peptidkonformation und somit in einer Steigerung der antimikrobiellen Eigenschaften resultierte. Außerdem konnte somit eine unnatürliche Modifikation in die Peptidsequenz integriert werden, welche die proteolytische Stabilität von Peptiden maßgeblich erhöht. Demzufolge konnten durch den Optimierungsprozess zwei artifizielle Peptide entwickelt werden, welche über starke antimikrobielle Eigenschaften, biologische Kompatibilitäten und eine einzigartige charakteristische Sekundärstruktur verfügen und somit vielversprechende Wirkstoffe für eine therapeutische oder industrielle Applikation darstellen. Außerdem zeigen diese Ergebnisse den Einfluss der dreidimensionalen Struktur auf die antimikrobielle Aktivität, wobei es sich bei dem identifizierten Sekundärstrukturmotiv um eine neuartige biologisch aktive Konformation handelt. Diese Struktur stellt eine hohe Relevanz für die *in silico* Generierung von antimikrobiellen artifiziellen Peptiden dar und eignet sich deshalb als Leitsequenz für weitere Entwicklungen. Außerdem ergänzt das identifizierte β -Strang-Motiv die bereits bestehenden

aktiven Peptidkonformationen antimikrobieller Peptide, wodurch es in weiterführenden Grundlagenforschungen bezüglich des Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide von fundamentaler Bedeutung sein könnte. Obendrein zeichnen sich diese Peptide durch kurze Sequenzlängen und einfache Aminosäureabfolgen aus, welche sich positiv auf die Produktionskosten auswirken.

Neben der direkten Therapie ist für das humane Gesundheitswesen insbesondere die Verbreitungskontrolle und Prävention vor bakteriellen Infektionen und Kontaminationen von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der Tatsache, dass Bakterien in der Lage sind feste Oberflächen langfristig besiedeln zu können stellen kontaminierte Oberflächen ein beträchtliches Reservoir für die Entwicklung von Biofilmen und die weitere Verbreitung von Bakterien dar. Um einen präventiven Schutz vor bakteriellen Oberflächenkontaminationen zu gewährleisten, wurden zwei verschiedene Peptid-basierte antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen generiert. Die Analyse der mittels kovalenter Immobilisierung der Peptide generierten Modifikationen ergab, dass das verwendete Peptid und sein charakteristischer Wirkmechanismus einen der bedeutendsten Parameter bei der Entwicklung von kovalenten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen darstellen. Die Untersuchungen ließen auch erkennen, dass verschiedene chemische Ligationen zu unterschiedlichen Aktivitäten der antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen führten. Basierend auf diesen Parametern konnten optimierte kovalente Oberflächenmodifikationen generiert werden, welche sich durch maximierte antimikrobielle Aktivitäten, minimierte Peptidmengen und biologisch kompatible Eigenschaften auszeichneten, was ein breites Einsatzgebiet im industriellen oder klinischen Sektor ermöglicht. Als Alternative dazu wurden Oberflächenmodifikationen konstruiert, welche eine elektrostatische Anlagerung von kationischen antimikrobiellen Peptiden in Kombination mit einer sukzessiven Freisetzung ermöglichten. Hierbei wurde ersichtlich, dass die Abgabedauer des antimikrobiellen Peptids abhängig von der Komplexität und der Elektronegativität der Oberflächenmodifikation war, weshalb mittels einer optimierten Beschichtung langanhaltende antimikrobielle Aktivitäten gewährleistet werden konnten. Diese entwickelten Beschichtungen wurden ebenfalls dafür verwendet, um Kollagen-basierte Wundauflagen mit einem präventiven Schutz vor bakteriellen Kontaminationen bei der Wundversorgung zu versehen. Folglich konnten zwei verschiedene Strategien für die Generierung von Peptid-basierten antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen entwickelt werden. Während sich die kovalente Modifikation von Oberflächen mit antimikrobiellen Peptiden durch einen langanhaltenden Schutz auszeichnet, für welchen jedoch eine direkte Interaktion zwischen den Bakterien und der Oberfläche gewährleistet sein muss, ist die sukzessive Freisetzung eines antimikrobiellen Peptids gut dafür geeignet, um das bakterielle Wachstum bereits in oberflächennahen Regionen inhibieren zu können. Zudem eignet sich die kontinuierliche Abgabe eines antimikrobiell wirkenden Stoffes besonders gut für poröse Oberflächen, bei welchen eine direkte Interaktion mit den Bakterien nicht immer gewährleistet ist. Somit konnte gezeigt werden, dass je nach Anforderung an die Oberfläche verschiedene Modifikationen durchgeführt werden können, um eine auf antimikrobiellen Peptiden basierende Prävention vor bakteriellen Kontaminationen zu gewährleisten.

7 Abstract

The intensive use of antibiotics has led to the development of a large variety of drug resistant bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) or ESBL-expressing *Enterobacteriaceae*. Therefore, the research on new antimicrobial agents for the treatment of bacterial infections has been intensified. However, in recent years only a few new types of antibiotics have been developed. Alternatively, antimicrobial peptides, a promising class of biomolecules, have gained significant ground in research over the last years. They are a diverse class of biomolecules and differ strongly regarding their sequence. Although, in most cases they possess antimicrobial and biocompatible properties, some may also feature cytotoxic properties. This renders them inappropriate for industrial or clinical applications. Furthermore, naturally occurring AMPs may possess limitations due to their manufacturing cost and poor pharmacokinetic properties. Due to these facts it is worthwhile to develop novel antimicrobial peptides with optimized characteristics such as antimicrobial activity, biological compatibility or proteolytic stability. For this purpose, a rational design of artificial peptides with unique primary and secondary structures was conducted. Using different peptide libraries the rational designed peptides were characterized regarding their antimicrobial, cytotoxic and membrane permeabilization properties. Additionally, these features were compared to well-characterized and commonly used AMPs. Based on the results of the different peptide libraries, an optimization of the artificial sequence was carried out and a sequence with extensive antimicrobial as well as biocompatible properties was concluded. This sequence was also characterized by a minimal sequence length and an optimized peptide composition. Additionally, the research revealed a dependency between peptide sequence, computed structural motif and antimicrobial activity. It could be demonstrated that these peptides form putative β -strand motifs and thereby unique structures, which do not correlate with previously identified α -helix or β -sheet forming peptides. In order to further optimize the artificial peptide a C-terminal amidation was realized. Thus, an electrostatic interaction between the cationic amino acids and the C-terminus was prevented, resulting in an increased stability of the motif. Consequently, an artificial peptide with further increased antimicrobial properties could be developed. Hence, an unnatural modification was introduced into the primary peptide sequence, which prevents proteolytic digestion. Consequently, two optimized artificial antimicrobial peptides could be engineered, which were characterized by improved antimicrobial and biocompatible properties as well as unique secondary structures. These properties render them appropriate for clinical and industrial applications. Furthermore, those results highlight the correlation between this novel β -strand structure and the antimicrobial properties of bioactive peptides. This structure indicates a high relevance for the *in silico* design of novel antimicrobial peptides and may be used as lead compound for future drug development. Additionally, the identified antimicrobial acting β -strand conformation complements the existing α -helix and β -sheet forming peptides, why it may be useful for the still ongoing fundamental research on the mode of action of antimicrobial peptides. Due to the short and simple amino acid sequence of the optimized peptide, it possesses reduced production cost and is therefore applicable for a variety of industrial and clinical uses.

Beside the direct therapy of bacteria associated diseases the control of bacterial populations and the protection against bacterial infections are of great interest in today's society. Because bacteria are able to accumulate on solid material, contaminated surfaces represent a significant reservoir of bacteria. Once bacteria adhere to solid material, they may start to build up colonies resulting in biofilm formation, why preventive methods, which protect against surface-mediated contamination prior to biofilm formation, are beneficial. Thus, two different peptide-based antimicrobial surface coatings were engineered. The covalent surface coatings revealed the antimicrobial mode of action as the decisive parameter for the development of a covalent antimicrobial surface coating since only peptides with pronounced membrane disruption abilities displayed meaningful activity in an immobilized state. In addition, the investigations indicated that various chemical ligations resulted in different activities of the immobilized peptides. Consequently, an optimized covalent peptide-based antimicrobial surface coating was concluded, which was characterized by an improved antimicrobial activity and a reduced peptide amount. The surface coating was also biocompatible, enabling a wide range of applications in an industrial or clinical environment. Alternatively, surface modifications were engineered, which facilitate a continuous release of antimicrobial peptide from the surface. For this purpose the electrostatic deposition of the cationic antimicrobial peptides on negatively charged surface coatings was used. The results revealed the relation between the time dependent release of the peptide and the complexity and electro negativity of the surface coating. Hence, an optimized coating was concluded, which was characterized by long-lasting antimicrobial properties. Additionally, these surface coatings were transferred to collagen-based wound dressings in order to ensure a preventive protection against bacterial infections during wound care. Consequently, two different peptide based antimicrobial surface coating could be engineered. While the covalent coating is characterized by a long-lasting local protection, which requires a direct interaction between the bacteria and the surface, the continuous release of an antimicrobial peptide is well suited to inhibit the bacterial growth already near the surface. Moreover, the latter is particularly suitable for porous surfaces, which may prevent a direct interaction between the bacteria and the antimicrobial coating. Thus, it has been demonstrated that depending on the requirements, various surface modifications could be designed, in order to realize a preventive peptide-based protection against bacterial contamination.

Literaturverzeichnis

1. **Hancock, R. E., and H. G. Sahl.** 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24:1551-7.
2. **Brogden, K. A., M. Ackermann, P. B. McCray, Jr., and B. F. Tack.** 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22:465-478.
3. **Diamond, G.** 2001. Natures antibiotics: the potential of antimicrobial peptides as new drugs. *Biologist (London)* 48:209-212.
4. **Lehrer, R. I., and T. Ganz.** 2002. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* 14:96-102.
5. **Zasloff, M.** 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-95.
6. **Giangaspero, A., L. Sandri, and A. Tossi.** 2001. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *Eur. J. Biochem.* 268:5589-600.
7. **Chan, D. I., E. J. Prenner, and H. J. Vogel.** 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1758:1184-202.
8. **De Lucca, A. J., and T. J. Walsh.** 1999. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1-11.
9. **Theis, T., and U. Stahl.** 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:437-55.
10. **Torrent, M., D. Pulido, L. Rivas, and D. Andreu.** 2012. Antimicrobial peptide action on parasites. *Curr. Drug Targets* 13:1138-47.
11. **Albiol Matanic, V. C., and V. Castilla.** 2004. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23:382-9.
12. **Robinson, W. E., Jr., B. McDougall, D. Tran, and M. E. Selsted.** 1998. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 63:94-100.
13. **Papo, N., and Y. Shai.** 2005. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:784-90.
14. **Wieczorek, M., H. Janssen, J. Kindrachuk, W. R. Scott, M. Elliott, K. Hilpert, J. T. Cheng, R. E. Hancock, and S. K. Straus.** 2010. Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity. *Chem. Biol.* 17:970-980.
15. **Kessler, N., H. Schuhmann, S. Morneweg, U. Linne, and M. A. Marahiel.** 2004. The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *J. Biol. Chem.* 279:7413-9.
16. **Hancock, R. E., and D. S. Chapple.** 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1317-23.
17. **Tennessen, J. A.** 2005. Molecular evolution of animal antimicrobial peptides: widespread moderate positive selection. *J. Evol. Biol.* 18:1387-94.
18. **Tennessen, J. A.** 2005. Enhanced synonymous site divergence in positively selected vertebrate antimicrobial peptide genes. *J. Mol. Evol.* 61:445-55.
19. **van 't Hof, W., E. C. Veerman, E. J. Helmerhorst, and A. V. Amerongen.** 2001. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol. Chem.* 382:597-619.
20. **Fleming, A.** 1922. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 93:306-317.
21. **Dubos, R. J.** 1939. Studies on a Bactericidal Agent Extracted from a Soil Bacillus : li. Protective Effect of the Bactericidal Agent against Experimental Pneumococcus Infections in Mice. *J. Exp. Med.* 70:11-7.
22. **Dubos, R. J.** 1939. Studies on a Bactericidal Agent Extracted from a Soil Bacillus : I. Preparation of the Agent. Its Activity in Vitro. *J. Exp. Med.* 70:1-10.
23. **Boman, H. G., and H. Steiner.** 1981. Humoral immunity in *Cecropia* pupae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 94-95:75-91.

24. **Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, and H. G. Boman.** 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292:246-8.
25. **Wang, G.** 2010. *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies.* CABI.
26. **Wang, G., X. Li, and Z. Wang.** 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* 37:D933-7.
27. **Zanetti, M., R. Gennaro, and D. Romeo.** 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 374:1-5.
28. **Ganz, T., M. E. Selsted, D. Szklarek, S. S. Harwig, K. Daher, D. F. Bainton, and R. I. Lehrer.** 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76:1427-35.
29. **Epand, R. M., and H. J. Vogel.** 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:11-28.
30. **Hancock, R. E., and R. Lehrer.** 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16:82-8.
31. **Holak, T. A., A. Engstrom, P. J. Kraulis, G. Lindeberg, H. Bennich, T. A. Jones, A. M. Gronenborn, and G. M. Clore.** 1988. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* 27:7620-9.
32. **Wang, G.** 2008. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J. Biol. Chem.* 283:32637-43.
33. **Laederach, A., A. H. Andreotti, and D. B. Fulton.** 2002. Solution and micelle-bound structures of tachyplesin I and its active aromatic linear derivatives. *Biochemistry* 41:12359-68.
34. **Sawai, M. V., H. P. Jia, L. Liu, V. Aseyev, J. M. Wiencek, P. B. McCray, Jr., T. Ganz, W. R. Kearney, and B. F. Tack.** 2001. The NMR structure of human beta-defensin-2 reveals a novel alpha-helical segment. *Biochemistry* 40:3810-6.
35. **Bauer, F., K. Schweimer, E. Kluver, J. R. Conejo-Garcia, W. G. Forssmann, P. Rosch, K. Adermann, and H. Sticht.** 2001. Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci.* 10:2470-9.
36. **Rozeck, A., C. L. Friedrich, and R. E. Hancock.** 2000. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* 39:15765-15774.
37. **Skarnes, R. C., and D. W. Watson.** 1957. Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriol. Rev.* 21:273-94.
38. **Matsuzaki, K., O. Murase, and K. Miyajima.** 1995. Kinetics of pore formation by an antimicrobial peptide, magainin 2, in phospholipid bilayers. *Biochemistry* 34:12553-9.
39. **Brogden, K. A.** 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3:238-250.
40. **Yeaman, M. R., and N. Y. Yount.** 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55:27-55.
41. **Prenner, E. J., R. N. Lewis, and R. N. McElhaney.** 1999. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:201-21.
42. **Wu, M., E. Maier, R. Benz, and R. E. Hancock.** 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38:7235-7242.
43. **Chatterjee, S. N., and K. Chaudhuri.** 2012. *Gram-Negative Bacteria: The cell Membranes*, p. 15-34, *Outer Membrane Vesicles of Bacteria.* Springer Berlin Heidelberg.
44. **Yang, L., T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding, and H. W. Huang.** 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* 81:1475-1485.
45. **Zelezetsky, I., U. Pag, H. G. Sahl, and A. Tossi.** 2005. Tuning the biological properties of amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides: rational use of minimal amino acid substitutions. *Peptides* 26:2368-2376.
46. **Wiradharma, N., M. Y. S. Sng, M. Khan, Z. Y. Ong, and Y. Y. Yang.** 2013. Rationally designed alpha-helical broad-spectrum antimicrobial peptides with idealized facial amphiphilicity. *Macromol. Rapid Commun.* 34:74-80.
47. **Lee, S. H., S. J. Kim, Y. S. Lee, M. D. Song, I. H. Kim, and H. S. Won.** 2010. De novo generation of short antimicrobial peptides with simple amino acid composition. *Regul. Pept.* 166:36-41.

48. **Cantor, R. S.** 2002. Size distribution of barrel-stave aggregates of membrane peptides: influence of the bilayer lateral pressure profile. *Biophys. J.* 82:2520-5.
49. **Ladokhin, A. S., and S. H. White.** 2001. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys. Acta* 1514:253-60.
50. **Shai, Y.** 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:55-70.
51. **Pouny, Y., D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, and Y. Shai.** 1992. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31:12416-23.
52. **Matsuzaki, K., K. Sugishita, M. Harada, N. Fujii, and K. Miyajima.** 1997. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1327:119-30.
53. **Dathe, M., J. Meyer, M. Beyermann, B. Maul, C. Hoischen, and M. Bienert.** 2002. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim Biophys Acta* 1558:171-86.
54. **Duclohier, H.** 1994. Anion pores from magainins and related defensive peptides. *Toxicology* 87:175-88.
55. **Noll, K. S., P. J. Sinko, and M. L. Chikindas.** 2011. Elucidation of the Molecular Mechanisms of Action of the Natural Antimicrobial Peptide Subtilosin Against the Bacterial Vaginosis-associated Pathogen *Gardnerella vaginalis*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 3:41-47.
56. **Orlov, D. S., T. Nguyen, and R. I. Lehrer.** 2002. Potassium release, a useful tool for studying antimicrobial peptides. *J. Microbiol. Methods* 49:325-8.
57. **Benincasa, M., S. Pacor, R. Gennaro, and M. Scocchi.** 2009. Rapid and reliable detection of antimicrobial peptide penetration into gram-negative bacteria based on fluorescence quenching. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3501-4.
58. **Yang, L., T. M. Weiss, R. I. Lehrer, and H. W. Huang.** 2000. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys. J.* 79:2002-9.
59. **Malmsten, M., M. Davoudi, B. Walse, V. Rydengard, M. Pasupuleti, M. Morgelin, and A. Schmidtchen.** 2007. Antimicrobial peptides derived from growth factors. *Growth Factors* 25:60-70.
60. **Benincasa, M., M. Scocchi, S. Pacor, A. Tossi, D. Nobili, G. Basaglia, M. Buseti, and R. Gennaro.** 2006. Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:950-9.
61. **Benech, R. O., E. E. Kheadr, C. Lacroix, and I. Fliss.** 2002. Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5607-19.
62. **Dathe, M., and T. Wieprecht.** 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:71-87.
63. **Hancock, R. E. W.** 1997. Peptide antibiotics. *The Lancet* 349:418-422.
64. **Park, C. B., K. S. Yi, K. Matsuzaki, M. S. Kim, and S. C. Kim.** 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:8245-50.
65. **Otvos, L., Jr., I. O. M. E. Rogers, P. J. Consolvo, B. A. Condie, S. Lovas, P. Bulet, and M. Blaszczyk-Thurin.** 2000. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* 39:14150-9.
66. **Subbalakshmi, C., and N. Sitaram.** 1998. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* 160:91-96.
67. **Patrzykat, A., C. L. Friedrich, L. Zhang, V. Mendoza, and R. E. Hancock.** 2002. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:605-14.
68. **Brotz, H., G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds, and H. G. Sahl.** 1998. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:154-60.
69. **Park, C. B., H. S. Kim, and S. C. Kim.** 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:253-7.
70. **Conlon, J. M., A. Sonnevend, M. Patel, V. Camasamudram, N. Nowotny, E. Zilahi, S. Iwamuro, P. F. Nielsen, and T. Pál.** 2003. A melittin-related peptide from the skin of the Japanese frog, *Rana tagoi*, with antimicrobial and cytolytic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306:496-500.

71. **Ahmad, A., S. Azmi, R. M. Srivastava, S. Srivastava, B. K. Pandey, R. Saxena, V. K. Bajpai, and J. K. Ghosh.** 2009. Design of nontoxic analogues of cathelicidin-derived bovine antimicrobial peptide BMAP-27: the role of leucine as well as phenylalanine zipper sequences in determining its toxicity. *Biochemistry* 48:10905-10917.
72. **Ginsburg, I., and E. Koren.** 2008. Are cationic antimicrobial peptides also 'double-edged swords'? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6:453-462.
73. **Wiesner, J., and A. Vilcinskas.** 2010. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1:440-64.
74. **Tsai, H., and L. A. Bobek.** 1998. Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9:480-97.
75. **Yang, D., A. Biragyn, L. W. Kwak, and J. J. Oppenheim.** 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 23:291-6.
76. **Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, and R. A. B. Ezekowitz.** 1999. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* 284:1313-1318.
77. **Frohm, M., B. Agerberth, G. Ahangari, M. Stähle-Bäckdahl, S. Lidén, H. Wigzell, and G. H. Gudmundsson.** 1997. The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes during Inflammatory Disorders. *J. Biol. Chem.* 272:15258-15263.
78. **Ommori, R., N. Ouji, F. Mizuno, E. Kita, Y. Ikada, and H. Asada.** 2012. Selective induction of antimicrobial peptides from keratinocytes by staphylococcal bacteria. *Microb. Pathog.* 56:35-9.
79. **Destoumieux, D., M. Munoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps, and E. Bachere.** 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.* 113:461-469.
80. **Matsuzaki, K., K. Sugishita, N. Fujii, and K. Miyajima.** 1995. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry* 34:3423-3429.
81. **Clejan, S., T. A. Krulwich, K. R. Mondrus, and D. Seto-Young.** 1986. Membrane lipid composition of obligately and facultatively alkalophilic strains of *Bacillus* spp. *J. Bacteriol.* 168:334-40.
82. **Ingram, L. O.** 1977. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1233-6.
83. **Casu, A., V. Pala, R. Monacelli, M. Ferro, and G. Nanni.** 1968. Structure of membranes. I. Lipid composition of the erythrocyte membrane. *Ital. J. Biochem.* 17:77-89.
84. **Gabriel, G. J., A. Som, A. E. Madkour, T. Eren, and G. N. Tew.** 2007. Infectious Disease: Connecting Innate Immunity to Biocidal Polymers. *Mater Sci Eng R Rep* 57:28-64.
85. **Matsuzaki, K.** 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:1-10.
86. **Verkleij, A. J., R. F. Zwaal, B. Roelofsen, P. Comfurius, D. Kastelijn, and L. L. van Deenen.** 1973. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 323:178-93.
87. **Brender, J. R., A. J. McHenry, and A. Ramamoorthy.** 2012. Does cholesterol play a role in the bacterial selectivity of antimicrobial peptides? *Front. Immunol.* 3.
88. **McHenry, A. J., M. F. M. Sciacca, J. R. Brender, and A. Ramamoorthy.** 2012. Does cholesterol suppress the antimicrobial peptide induced disruption of lipid raft containing membranes? *Biochim. Biophys. Acta* 1818:3019-3024.
89. **Allende, D., S. A. Simon, and T. J. McIntosh.** 2005. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. *Biophys. J.* 88:1828-1837.
90. **Lundquist, A., P. Wessman, A. R. Rennie, and K. Edwards.** 2008. Melittin-Lipid interaction: A comparative study using liposomes, micelles and bilayerdisks. *Biochim. Biophys. Acta* 1778:2210-2216.
91. **Wiradharma, N., M. Khan, L. K. Yong, C. A. Hauser, S. V. Seow, S. Zhang, and Y. Y. Yang.** 2011. The effect of thiol functional group incorporation into cationic helical peptides on antimicrobial activities and spectra. *Biomaterials* 32:9100-9108.
92. **Yount, N. Y., and M. R. Yeaman.** 2005. Immunocontinuum: perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance. *Protein Pept. Lett.* 12:49-67.

93. **Peschel, A., M. Otto, R. W. Jack, H. Kalbacher, G. Jung, and F. Gotz.** 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 274:8405-10.
94. **Kristian, S. A., M. Durr, J. A. Van Strijp, B. Neumeister, and A. Peschel.** 2003. MprF-mediated lysinylation of phospholipids in *Staphylococcus aureus* leads to protection against oxygen-independent neutrophil killing. *Infect. Immun.* 71:546-9.
95. **Peschel, A., R. W. Jack, M. Otto, L. V. Collins, P. Staubitz, G. Nicholson, H. Kalbacher, W. F. Nieuwenhuizen, G. Jung, A. Tarkowski, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp.** 2001. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J. Exp. Med.* 193:1067-76.
96. **Gunn, J. S., K. B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* 27:1171-82.
97. **Peschel, A.** 2002. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology* 10:179-186.
98. **Yeaman, M. R., A. S. Bayer, S. P. Koo, W. Foss, and P. M. Sullam.** 1998. Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. *J. Clin. Invest.* 101:178-87.
99. **Friedrich, C., M. G. Scott, N. Karunaratne, H. Yan, and R. E. Hancock.** 1999. Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1542-8.
100. **Guina, T., E. C. Yi, H. Wang, M. Hackett, and S. I. Miller.** 2000. A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* 182:4077-86.
101. **Sugimura, K., and N. Higashi.** 1988. A novel outer-membrane-associated protease in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:3650-4.
102. **Resnick, N. M., W. L. Maloy, H. R. Guy, and M. Zasloff.** 1991. A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognizes alpha-helical secondary structure. *Cell* 66:541-54.
103. **Bengochea, J. A., and M. Skurnik.** 2000. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* 37:67-80.
104. **Parra-Lopez, C., M. T. Baer, and E. A. Groisman.** 1993. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* 12:4053-62.
105. **Walsh, C.** 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. American Society for Microbiology (ASM).
106. **Bonomo, R. A.** 2000. Multiple antibiotic-resistant bacteria in long-term-care facilities: An emerging problem in the practice of infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* 31:1414-22.
107. **Marr, A. K., W. J. Gooderham, and R. E. W. Hancock.** 2006. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6:468-472.
108. **Boman, H. G.** 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* 254:197-215.
109. **Gordon, Y. J., E. G. Romanowski, and A. M. McDermott.** 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res.* 30:505-515.
110. **Mania, D., K. Hilpert, S. Ruden, R. Fischer, and N. Takeshita.** 2010. Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7102-8.
111. **Stevens, K. A., B. W. Sheldon, N. A. Klapes, and T. R. Klaenhammer.** 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3613-5.
112. **Europäischen Union (EU).** 16. Dezember 2008. Verordnung (EG) Nr. 1333/2008.
113. **Kaletta, C., and K. D. Entian.** 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* 171:1597-601.
114. **Siegers, K., S. Heinzmann, and K. D. Entian.** 1996. Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. *J. Biol. Chem.* 271:12294-301.
115. **Buchman, G. W., S. Banerjee, and J. N. Hansen.** 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* 263:16260-6.
116. **Gross, E., and J. L. Morell.** 1971. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* 93:4634-5.

117. **Zhang, L., J. Parente, S. M. Harris, D. E. Woods, R. E. Hancock, and T. J. Falla.** 2005. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:2921-7.
118. **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* 84:5449-5453.
119. **Ge, Y., D. L. MacDonald, K. J. Holroyd, C. Thornsberry, H. Wexler, and M. Zasloff.** 1999. In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:782-8.
120. **Lipsky, B. A., K. J. Holroyd, and M. Zasloff.** 2008. Topical versus Systemic Antimicrobial Therapy for Treating Mildly Infected Diabetic Foot Ulcers: A Randomized, Controlled, Double-Blinded, Multicenter Trial of Pexiganan Cream. *Clin. Infect. Dis.* 47:1537-1545.
121. **Sader, H. S., K. A. Fedler, R. P. Rennie, S. Stevens, and R. N. Jones.** 2004. Omiganan pentahydrochloride (MBI 226), a topical 12-amino-acid cationic peptide: spectrum of antimicrobial activity and measurements of bactericidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3112-8.
122. **Fritsche, T. R., P. R. Rhomberg, H. S. Sader, and R. N. Jones.** 2008. In vitro activity of omiganan pentahydrochloride tested against vancomycin-tolerant, -intermediate, and -resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60:399-403.
123. **Fritsche, T. R., P. R. Rhomberg, H. S. Sader, and R. N. Jones.** 2008. Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride tested against contemporary bacterial pathogens commonly responsible for catheter-associated infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:1092-8.
124. **Jenssen, H., P. Hamill, and R. E. Hancock.** 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:491-511.
125. **Morris, C. J., K. Beck, M. A. Fox, D. Ulaeto, G. C. Clark, and M. Gumbleton.** 2012. Pegylation of antimicrobial peptides maintains the active peptide conformation, model membrane interactions, and antimicrobial activity while improving lung tissue biocompatibility following airway delivery. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:3298-308.
126. **Saravanan, R., X. Li, K. Lim, H. Mohanram, L. Peng, B. Mishra, A. Basu, J. M. Lee, S. Bhattacharjya, and S. S. Leong.** 2014. Design of short membrane selective antimicrobial peptides containing tryptophan and arginine residues for improved activity, salt-resistance, and biocompatibility. *Biotechnol. Bioeng.* 111:37-49.
127. **Nguyen, L. T., J. K. Chau, N. A. Perry, L. de Boer, S. A. Zaat, and H. J. Vogel.** 2010. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. *PLoS One* 5.
128. **Chen, Y., A. I. Vasil, L. Rehaume, C. T. Mant, J. L. Burns, M. L. Vasil, R. E. Hancock, and R. S. Hodges.** 2006. Comparison of biophysical and biologic properties of alpha-helical enantiomeric antimicrobial peptides. *Chem. Biol. Drug Des.* 67:162-173.
129. **Braunstein, A., N. Papo, and Y. Shai.** 2004. In vitro activity and potency of an intravenously injected antimicrobial peptide and its DL amino acid analog in mice infected with bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3127-3129.
130. **Papo, N., Z. Oren, U. Pag, H. G. Sahl, and Y. Shai.** 2002. The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *J. Biol. Chem.* 277:33913-33921.
131. **Lee, K.-H., and J.-E. Oh.** 2000. Design and synthesis of novel antimicrobial pseudopeptides with selective membrane-perturbation activity. *Bioorg. Med. Chem.* 8:833-839.
132. **Knappe, D., P. Henklein, R. Hoffmann, and K. Hilpert.** 2010. Easy strategy to protect antimicrobial peptides from fast degradation in serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4003-4005.
133. **Cassone, M., and L. Otvos Jr.** 2010. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8:703-716.
134. **Naghmouchi, K., C. Le Lay, J. Baah, and D. Drider.** 2012. Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. *Res. Microbiol.* 163:101-108.
135. **Park, S. C., Y. Park, and K. S. Hahm.** 2011. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *Int. J. Mol. Sci.* 12:5971-92.
136. **Hudecz, F., Z. Banoczi, and G. Csik.** 2005. Medium-sized peptides as built in carriers for biologically active compounds. *Med. Res. Rev.* 25:679-736.
137. **Rajaroo, G. K., N. Nekhotiaeva, and L. Good.** 2002. Peptide-mediated delivery of green fluorescent protein into yeasts and bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 215:267-72.
138. **Bai, H., Y. You, H. Yan, J. Meng, X. Xue, Z. Hou, Y. Zhou, X. Ma, G. Sang, and X. Luo.** 2012. Antisense inhibition of gene expression and growth in gram-negative bacteria by cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to rpoD gene. *Biomaterials* 33:659-67.

139. **Hatamoto, M., K. Nakai, A. Ohashi, and H. Imachi.** 2009. Sequence-specific bacterial growth inhibition by peptide nucleic acid targeted to the mRNA binding site of 16S rRNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:1161-8.
140. **Arcidiacono, S., P. Pivarnik, C. M. Mello, and A. Senecal.** 2008. Cy5 labeled antimicrobial peptides for enhanced detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens. Bioelectron.* 23:1721-7.
141. **Gregory, K., and C. M. Mello.** 2005. Immobilization of *Escherichia coli* cells by use of the antimicrobial peptide cecropin P1. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1130-4.
142. **Kulagina, N. V., K. M. Shaffer, G. P. Anderson, F. S. Ligler, and C. R. Taitt.** 2006. Antimicrobial peptide-based array for *Escherichia coli* and *Salmonella* screening. *Anal. Chim. Acta* 575:9-15.
143. **Mannoor, M. S., S. Zhang, A. J. Link, and M. C. McAlpine.** 2010. Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:19207-12.
144. **Patil, A., A. L. Hughes, and G. Zhang.** 2004. Rapid evolution and diversification of mammalian alpha-defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol. Genomics* 20:1-11.
145. **Vallender, E. J., and B. T. Lahn.** 2004. Positive selection on the human genome. *Hum. Mol. Genet.* 13 Spec No 2:R245-54.
146. **Peters, B. M., M. E. Shirtliff, and M. A. Jabra-Rizk.** 2010. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 6:e1001067.
147. **Oyston, P. C., M. A. Fox, S. J. Richards, and G. C. Clark.** 2009. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J. Med. Microbiol.* 58:977-987.
148. **Peschel, A., and H. G. Sahl.** 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:529-36.
149. **Jones, J. C., E. W. Settles, C. R. Brandt, and S. Schultz-Cherry.** 2011. Identification of the minimal active sequence of an anti-influenza virus peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:1810-3.
150. **Lin, M. C., C. F. Hui, J. Y. Chen, and J. L. Wu.** 2013. Truncated antimicrobial peptides from marine organisms retain anticancer activity and antibacterial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Peptides* 44:139-48.
151. **Nagant, C., B. Pitts, K. Nazmi, M. Vandenbranden, J. G. Bolscher, P. S. Stewart, and J. P. Dehaye.** 2012. Identification of peptides derived from the human antimicrobial peptide LL-37 active against biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* using a library of truncated fragments. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:5698-708.
152. **Sikorska, E., K. Greber, S. Rodziewicz-Motowidlo, L. Szultka, J. Lukasiak, and W. Kamysz.** 2009. Synthesis and antimicrobial activity of truncated fragments and analogs of citropin 1.1: The solution structure of the SDS micelle-bound citropin-like peptides. *J. Struct. Biol.* 168:250-8.
153. **Zaiou, M.** 2007. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J. Mol. Med.* 85:317-329.
154. **Giuliani, A., G. Pirri, and S. Nicoletto.** 2007. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent. Eur. J. Biol.* 2:1-33.
155. **Blondelle, S. E., and K. Lohner.** 2000. Combinatorial libraries: a tool to design antimicrobial and antifungal peptide analogues having lytic specificities for structure-activity relationship studies. *Biopolymers* 55:74-87.
156. **Blondelle, S. E., E. Takahashi, P. A. Weber, and R. A. Houghten.** 1994. Identification of antimicrobial peptides by using combinatorial libraries made up of unnatural amino acids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2280-6.
157. **Hilpert, K., C. D. Fjell, and A. Cherkasov.** 2008. Short linear cationic antimicrobial peptides: screening, optimizing, and prediction. *Methods Mol. Biol.* 494:127-159.
158. **Bell, G., and P. H. Gouyon.** 2003. Arming the enemy: the evolution of resistance to self-proteins. *Microbiology* 149:1367-1375.
159. **Castro, M. S., E. M. Cilli, and W. Fontes.** 2006. Combinatorial synthesis and directed evolution applied to the production of alpha-helix forming antimicrobial peptides analogues. *Curr. Protein Pept. Sci.* 7:473-8.
160. **Paschke, M.** 2006. Phage display systems and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70:2-11.
161. **Westerlund-Wikstrom, B.** 2000. Peptide display on bacterial flagella: principles and applications. *Int. J. Med. Microbiol.* 290:223-30.
162. **Yan, X., and Z. Xu.** 2006. Ribosome-display technology: applications for directed evolution of functional proteins. *Drug Discov. Today* 11:911-6.

163. **McPhee, J. B., M. G. Scott, and R. E. Hancock.** 2005. Design of host defence peptides for antimicrobial and immunity enhancing activities. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:257-72.
164. **Pini, A., A. Giuliani, C. Falciani, Y. Runci, C. Ricci, B. Lelli, M. Malossi, P. Neri, G. M. Rossolini, and L. Bracci.** 2005. Antimicrobial activity of novel dendrimeric peptides obtained by phage display selection and rational modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:2665-72.
165. **Xie, Q., S. Matsunaga, Z. Wen, S. Niimi, M. Kumano, Y. Sakakibara, and S. Machida.** 2006. In vitro system for high-throughput screening of random peptide libraries for antimicrobial peptides that recognize bacterial membranes. *J. Pept. Sci.* 12:643-52.
166. **Irwin, J. J.** 2006. How good is your screening library? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10:352-6.
167. **Hilpert, K., R. Volkmer-Engert, T. Walter, and R. E. Hancock.** 2005. High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nat. Biotechnol.* 23:1008-1012.
168. **Tan, D. S.** 2005. Diversity-oriented synthesis: exploring the intersections between chemistry and biology. *Nat. Chem. Biol.* 1:74-84.
169. **Webb, T. R.** 2005. Current directions in the evolution of compound libraries. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 8:303-8.
170. **Konno, K., M. Hisada, R. Fontana, C. C. Lorenzi, H. Naoki, Y. Itagaki, A. Miwa, N. Kawai, Y. Nakata, T. Yasuhara, J. Ruggiero Neto, W. F. de Azevedo, Jr., M. S. Palma, and T. Nakajima.** 2001. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1550:70-80.
171. **Blondelle, S. E., and R. A. Houghten.** 1996. Novel antimicrobial compounds identified using synthetic combinatorial library technology. *Trends Biotechnol.* 14:60-5.
172. **Lamb, H. M., and L. R. Wiseman.** 1998. Pexiganan acetate. *Drugs* 56:1047-52; discussion 1053-4.
173. **Gottler, L. M., and A. Ramamoorthy.** 2009. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan--a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochim. Biophys. Acta* 1788:1680-6.
174. **Reynolds, N. L., M. De Cecco, K. Taylor, C. Stanton, F. Kilanowski, J. Kalapothakis, E. Seo, D. Uhrin, D. Campopiano, J. Govan, D. Macmillan, P. Barran, and J. R. Dorin.** Peptide fragments of a beta-defensin derivative with potent bactericidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1922-9.
175. **Zelezetsky, I., A. Pontillo, L. Puzzi, N. Antcheva, L. Segat, S. Pacor, S. Crovella, and A. Tossi.** 2006. Evolution of the primate cathelicidin. Correlation between structural variations and antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* 281:19861-71.
176. **Zelezetsky, I., and A. Tossi.** 2006. Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1758:1436-49.
177. **Tossi, A., C. Tarantino, and D. Romeo.** 1997. Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. *Eur. J. Biochem.* 250:549-558.
178. **Antcheva, N., F. Morgera, L. Creatti, L. Vaccari, U. Pag, S. Pacor, Y. Shai, H. G. Sahl, and A. Tossi.** 2009. Artificial beta-defensin based on a minimal defensin template. *Biochem. J.* 421:435-47.
179. **Mak, P., K. Wojcik, J. Silberring, and A. Dubin.** 2000. Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: hemocidins. *Antonie van Leeuwenhoek* 77:197-207.
180. **Almaas, H., H. Holm, T. Langsrud, R. Flengsrud, and G. E. Vegarud.** 2006. In vitro studies of the digestion of caprine whey proteins by human gastric and duodenal juice and the effects on selected microorganisms. *Br. J. Nutr.* 96:562-9.
181. **Almaas, H., E. Eriksen, C. Sekse, I. Comi, R. Flengsrud, H. Holm, E. Jensen, M. Jacobsen, T. Langsrud, and G. E. Vegarud.** 2011. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. *Br. J. Nutr.* 106:896-905.
182. **Tossi, A., L. Sandri, and A. Giangaspero.** 2000. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55:4-30.
183. **Oren, Z., and Y. Shai.** 1998. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47:451-463.
184. **Andreu, D., R. B. Merrifield, H. Steiner, and H. G. Boman.** 1985. N-terminal analogues of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties. *Biochemistry* 24:1683-8.
185. **Zasloff, M., B. Martin, and H. C. Chen.** 1988. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:910-3.
186. **Maloy, W. L., and U. P. Kari.** 1995. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* 37:105-22.

187. **Saberwal, G., and R. Nagaraj.** 1994. Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. *Biochim. Biophys. Acta* 1197:109-31.
188. **Chou, P. Y., and G. D. Fasman.** 1974. Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* 13:211-222.
189. **Jin-Jiang, H., L. Jin-Chun, L. Min, H. Qing-Shan, and L. Guo-Dong.** 2012. The Design and Construction of K11: A Novel alpha-Helical Antimicrobial Peptide. *Int. J. Microbiol.* 2012:doi: 10.1155/2012/764834.
190. **Eisenberg, D.** 1984. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 53:595-623.
191. **Eisenberg, D., R. M. Weiss, and T. C. Terwilliger.** 1982. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* 299:371-374.
192. **Dathe, M., T. Wieprecht, H. Nikolenko, L. Handel, W. L. Maloy, D. L. MacDonald, M. Beyermann, and M. Bienert.** 1997. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett.* 403:208-212.
193. **Wimley, W. C.** 2002. Toward genomic identification of beta-barrel membrane proteins: composition and architecture of known structures. *Protein Sci.* 11:301-312.
194. **Mayo, K. H., E. Ilyina, and H. Park.** 1996. A recipe for designing water-soluble, beta-sheet-forming peptides. *Protein Sci.* 5:1301-1315.
195. **Smith, C. K., J. M. Withka, and L. Regan.** 1994. A thermodynamic scale for the beta-sheet forming tendencies of the amino acids. *Biochemistry* 33:5510-5517.
196. **Yount, N. Y., and M. R. Yeaman.** 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:7363-8.
197. **Ong, Z. Y., S. J. Gao, and Y. Y. Yang.** 2013. Short synthetic beta-sheet forming peptide amphiphiles as broad spectrum antimicrobials with antibiofilm and endotoxin neutralizing capabilities. *Adv. Funct. Mater.* 23:3682-3692.
198. **Rausch, J. M., J. R. Marks, and W. C. Wimley.** 2005. Rational combinatorial design of pore-forming beta-sheet peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:10511-10515.
199. **Rausch, J. M., J. R. Marks, R. Rathinakumar, and W. C. Wimley.** 2007. Beta-sheet pore-forming peptides selected from a rational combinatorial library: mechanism of pore formation in lipid vesicles and activity in biological membranes. *Biochemistry* 46:12124-12139.
200. **Yamaguchi, S., T. Hong, A. Waring, R. I. Lehrer, and M. Hong.** 2002. Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a beta-sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry* 41:9852-62.
201. **Jin, Y., J. Hammer, M. Pate, Y. Zhang, F. Zhu, E. Zmuda, and J. Blazyk.** 2005. Antimicrobial activities and structures of two linear cationic peptide families with various amphipathic beta-sheet and alpha-helical potentials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4957-4964.
202. **Wojgani, H., C. Kehsa, E. Cloutman-Green, C. Gray, V. Gant, and N. Klein.** 2012. Hospital Door Handle Design and Their Contamination with Bacteria: A Real Life Observational Study. Are We Pulling against Closed Doors? *PLoS One* 7:e40171.
203. **Galvin, S., A. Dolan, O. Cahill, S. Daniels, and H. Humphreys.** 2012. Microbial monitoring of the hospital environment: why and how? *J. Hosp. Infect.* 82:143-51.
204. **Rosenthal, V. D., R. Richtmann, S. Singh, A. Apisarnthanarak, A. Kubler, N. Viet-Hung, F. M. Ramirez-Wong, J. H. Portillo-Gallo, J. Toscani, A. Gikas, L. Duenas, A. El-Kholy, S. Ghazal, D. Fisher, Z. Mitrev, M. O. Gamar-Elanbya, S. S. Kanj, Y. Arreza-Galapia, H. Leblebicioglu, S. Hlinkova, B. A. Memon, H. Guanche-Garcell, V. Gurskis, C. Alvarez-Moreno, A. Barkat, N. Mejia, M. Rojas-Bonilla, G. Ristic, L. Raka, and C. Yuet-Meng.** 2013. Surgical site infections, International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 30 countries, 2005-2010. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 34:597-604.
205. **Hetrick, E. M., and M. H. Schoenfisch.** 2006. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem. Soc. Rev.* 35:780-9.
206. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-22.
207. **Darouiche, R. O.** 2001. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin. Infect. Dis.* 33:1567-72.

208. **Coenye, T., and H. J. Nelis.** 2010. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 83:89-105.
209. **Tiller, J. C., R. Kohli, and K. L. Mittal.** 2008. Coatings for Prevention or Deactivation of Biological Contamination, p. 1013-1065, *Developments in Surface Contamination and Cleaning*. William Andrew Publishing, Norwich, NY.
210. **Börner, H. G., J.-F. Lutz, and J. Tiller.** 2011. Antimicrobial Surfaces, p. 193-217, *Bioactive Surfaces*, vol. 240. Springer Berlin Heidelberg.
211. **Saldarriaga Fernandez, I. C., H. C. van der Mei, M. J. Lochhead, D. W. Grainger, and H. J. Busscher.** 2007. The inhibition of the adhesion of clinically isolated bacterial strains on multi-component cross-linked poly(ethylene glycol)-based polymer coatings. *Biomaterials* 28:4105-12.
212. **Weber, T., Y. Gies, and A. Terfort.** 2012. Bacteria-repulsive polyglycerol surfaces by grafting polymerization onto aminopropylated surfaces. *Langmuir* 28:15916-21.
213. **Privett, B. J., J. Youn, S. A. Hong, J. Lee, J. Han, J. H. Shin, and M. H. Schoenfisch.** 2011. Antibacterial fluorinated silica colloid superhydrophobic surfaces. *Langmuir* 27:9597-601.
214. **Damm, C., and H. Münstedt.** 2008. Kinetic aspects of the silver ion release from antimicrobial polyamide/silver nanocomposites. *Applied Physics A* 91:479-486.
215. **Lin, J., S. Qiu, K. Lewis, and A. M. Klibanov.** 2002. Bactericidal properties of flat surfaces and nanoparticles derivatized with alkylated polyethylenimines. *Biotechnol. Prog.* 18:1082-6.
216. **Siedenbiedel, F., and J. C. Tiller.** 2012. Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers* 4:46-71.
217. **Matl, F. D., J. Zlotnyk, A. Obermeier, W. Friess, S. Vogt, H. Buchner, H. Schnabelrauch, A. Stemberger, and K. D. Kuhn.** 2009. New anti-infective coatings of surgical sutures based on a combination of antiseptics and fatty acids. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 20:1439-49.
218. **Matl, F. D., A. Obermeier, S. Repmann, W. Friess, A. Stemberger, and K. D. Kuehn.** 2008. New anti-infective coatings of medical implants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1957-63.
219. **Kamal, G. D., M. A. Pfaller, L. E. Rempe, and P. J. Jebson.** 1991. Reduced intravascular catheter infection by antibiotic bonding. A prospective, randomized, controlled trial. *J Am Med Assoc* 265:2364-8.
220. **Darouiche, R. O., I. I. Raad, S. O. Heard, J. I. Thornby, O. C. Wenker, A. Gabrielli, J. Berg, N. Khardori, H. Hanna, R. Hachem, R. L. Harris, and G. Mayhall.** 1999. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. *Catheter Study Group. N. Engl. J. Med.* 340:1-8.
221. **Thornton, J., N. J. Todd, and N. R. Webster.** 1996. Central venous line sepsis in the intensive care unit. A study comparing antibiotic coated catheters with plain catheters. *Anaesthesia* 51:1018-20.
222. **Campoccia, D., L. Montanaro, P. Speziale, and C. R. Arciola.** 2010. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials* 31:6363-77.
223. **Jones, J. R., L. M. Ehrenfried, P. Saravanapavan, and L. L. Hench.** 2006. Controlling ion release from bioactive glass foam scaffolds with antibacterial properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17:989-96.
224. **Ravikumar, T., H. Murata, R. R. Koepsel, and A. J. Russell.** 2006. Surface-active antifungal polyquaternary amine. *Biomacromolecules* 7:2762-9.
225. **Bryers, J. D., R. A. Jarvis, J. Lebo, A. Prudencio, T. R. Kyriakides, and K. Urich.** 2006. Biodegradation of poly(anhydride-esters) into non-steroidal anti-inflammatory drugs and their effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in vitro and on the foreign-body response in vivo. *Biomaterials* 27:5039-48.
226. **Ramstedt, M., B. Ekstrand-Hammarstrom, A. V. Shchukarev, A. Bucht, L. Osterlund, M. Welch, and W. T. Huck.** 2009. Bacterial and mammalian cell response to poly(3-sulfopropyl methacrylate) brushes loaded with silver halide salts. *Biomaterials* 30:1524-31.
227. **Costa, F., I. F. Carvalho, R. C. Montelaro, P. Gomes, and M. C. Martins.** 2011. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater.*
228. **Onaizi, S. A., and S. S. Leong.** 2010. Tethering antimicrobial peptides: current status and potential challenges. *Biotechnol. Adv.* 29:67-74.
229. **Glinel, K., A. M. Jonas, T. Jouenne, J. Leprince, L. Galas, and W. T. Huck.** 2009. Antibacterial and antifouling polymer brushes incorporating antimicrobial peptide. *Bioconjugate Chem* 20:71-7.
230. **Cho, W. M., B. P. Joshi, H. Cho, and K. H. Lee.** 2007. Design and synthesis of novel antibacterial peptide-resin conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17:5772-6.

231. **Gabriel, M., K. Nazmi, E. C. Veerman, A. V. Nieuw Amerongen, and A. Zentner.** 2006. Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. *Bioconjugate Chem* 17:548-50.
232. **Chen, R., N. Cole, M. D. Willcox, J. Park, R. Rasul, E. Carter, and N. Kumar.** 2009. Synthesis, characterization and in vitro activity of a surface-attached antimicrobial cationic peptide. *Biofouling* 25:517-524.
233. **Humblot, V., J. F. Yala, P. Thebault, K. Boukerma, A. Hequet, J. M. Berjeaud, and C. M. Pradier.** 2009. The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials* 30:3503-12.
234. **Rusmini, F., Z. Zhong, and J. Feijen.** 2007. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* 8:1775-89.
235. **Gao, G., D. Lange, K. Hilpert, J. Kindrachuk, Y. Zou, J. T. Cheng, M. Kazemzadeh-Narbat, K. Yu, R. Wang, S. K. Straus, D. E. Brooks, B. H. Chew, R. E. Hancock, and J. N. Kizhakkedathu.** 2011. The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. *Biomaterials* 32:3899-909.
236. **Bagheri, M., M. Beyermann, and M. Dathe.** 2012. Mode of action of cationic antimicrobial peptides defines the tethering position and the efficacy of biocidal surfaces. *Bioconjug. Chem.* 23:66-74.
237. **Tsai, C. W., R. C. Ruaan, and C. I. Liu.** 2012. Adsorption of antimicrobial indolicidin-derived peptides on hydrophobic surfaces. *Langmuir* 28:10446-52.
238. **Soliman, W., S. Bhattacharjee, and K. Kaur.** 2010. Adsorption of an antimicrobial peptide on self-assembled monolayers by molecular dynamics simulation. *J. Phys. Chem. B* 114:11292-302.
239. **Etienne, O., C. Picart, C. Taddei, Y. Haikel, J. L. Dimarcq, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. A. Ogier, and C. Egles.** 2004. Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3662-9.
240. **Etienne, O., C. Gasnier, C. Taddei, J. C. Voegel, D. Aunis, P. Schaaf, M. H. Metz-Boutigue, A. L. Bolcato-Bellemin, and C. Egles.** 2005. Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials* 26:6704-12.
241. **Shukla, A., K. E. Fleming, H. F. Chuang, T. M. Chau, C. R. Loose, G. N. Stephanopoulos, and P. T. Hammond.** 2010. Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces. *Biomaterials* 31:2348-57.
242. **Ehtezazi, T., and C. Washington.** 2000. Controlled release of macromolecules from PLA microspheres: using porous structure topology. *J. Control. Release* 68:361-72.
243. **Sukhishvili, S. A.** 2005. Responsive polymer films and capsules via layer-by-layer assembly. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10:37-44.
244. **Kazemzadeh-Narbat, M., B. F. Lai, C. Ding, J. N. Kizhakkedathu, R. E. Hancock, and R. Wang.** 2013. Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials* 34:5969-77.
245. **Eriksen, T. H., E. Skovsen, and P. Fojan.** 2013. Release of antimicrobial peptides from electrospun nanofibres as a drug delivery system. *J. Biomed. Nanotechnol.* 9:492-8.
246. **Gautier, R., D. Douguet, B. Antonny, and G. Drin.** 2008. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics* 24:2101-2102.
247. **Maupetit, J., P. Derreumaux, and P. Tufféry.** 2010. A fast method for large-scale de novo peptide and miniprotein structure prediction. *J. Comput. Chem.* 31:726-738.
248. **Maupetit, J., P. Derreumaux, and P. Tufféry.** 2009. PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 37:W498-W503.
249. **Thévenet, P., Y. Shen, J. Maupetit, F. Guyon, P. Derreumaux, and P. Tufféry.** 2012. PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res.* 40:W288-W293.
250. **Kaur, H., A. Garg, and G. P. Raghava.** 2007. PEPstr: a de novo method for tertiary structure prediction of small bioactive peptides. *Protein Pept. Lett.* 14:626-631.
251. Geneious version 6.1.5 created by Biomatters. Available from www.geneious.com.
252. **Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin.** 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25:1605-1612.
253. UCSF Chimera version 1.8 developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIGMS P41-GM103311). Available from www.cgl.ucsf.edu/chimera.

254. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement. M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA, USA.
255. **European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)**. 2003. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin. Microbiol. Infect.* 9:ix-xv.
256. **Wiegand, I., K. Hilpert, and R. E. Hancock**. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3:163-175.
257. **Eriksson, M., P. E. Nielsen, and L. Good**. 2002. Cell permeabilization and uptake of antisense peptide-peptide nucleic acid (PNA) into *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277:7144-7147.
258. **Hermanson, G. T.** 2010. *Bioconjugate Techniques*, 2 ed. Elsevier Science.
259. **Shih, I. L., Y. T. Van, and M. H. Shen**. 2004. Biomedical applications of chemically and microbiologically synthesized poly(glutamic acid) and poly(lysine). *Mini Rev. Med. Chem.* 4:179-88.
260. **Coghlan, D. R., J. A. Mackintosh, and P. Karuso**. 2005. Mechanism of reversible fluorescent staining of protein with epicocconone. *Org. Lett.* 7:2401-4.
261. **Magun, B. E., and J. W. Kelly**. 1969. A new fluorescent method with phenanthrenequinone for the histochemical demonstration of arginine residues in tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 17:821-7.
262. **Smith, R. E., and R. MacQuarrie**. 1978. A sensitive fluorometric method for the determination of arginine using 9,10-phenanthrenequinone. *Anal. Biochem.* 90:246-55.
263. **Krauson, A. J., J. He, and W. C. Wimley**. 2012. Gain-of-function analogues of the pore-forming peptide melittin selected by orthogonal high-throughput screening. *J. Am. Chem. Soc.* 134:12732-41.
264. **Skerlavaj, B., R. Gennaro, L. Bagella, L. Merluzzi, A. Risso, and M. Zanetti**. 1996. Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities. *J. Biol. Chem.* 271:28375-81.
265. **Vanhoof, G., F. Goossens, I. De Meester, D. Hendriks, and S. Scharpe**. 1995. Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* 9:736-44.
266. **Haney, E. F., H. N. Hunter, K. Matsuzaki, and H. J. Vogel**. 2009. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: linking structure to function? *Biochim. Biophys. Acta* 1788:1639-55.
267. **Hilpert, K.** 2010. High-throughput screening for antimicrobial peptides using the SPOT technique. *Methods Mol. Biol.* 618:125-33.
268. **Hilpert, K., B. McLeod, J. Yu, M. R. Elliott, M. Rautenbach, S. Ruden, J. Burck, C. Muhle-Goll, A. S. Ulrich, S. Keller, and R. E. Hancock**. 2010. Short cationic antimicrobial peptides interact with ATP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4480-3.
269. **Skerlavaj, B., D. Romeo, and R. Gennaro**. 1990. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram-negative bacteria by bactenecins. *Infect. Immun.* 58:3724-3730.
270. **Futaki, S., T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, and Y. Sugiura**. 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* 276:5836-5840.
271. **Gorr, S. U., J. B. Sotsky, A. P. Shelar, and D. R. Demuth**. 2008. Design of bacteria-agglutinating peptides derived from parotid secretory protein, a member of the bactericidal/permeability increasing-like protein family. *Peptides* 29:2118-27.
272. **Torrent, M., D. Pulido, M. V. Nogues, and E. Boix**. 2012. Exploring new biological functions of amyloids: bacteria cell agglutination mediated by host protein aggregation. *PLoS Pathog.* 8:e1003005.
273. **Guilhelmelli, F., N. Vilela, P. Albuquerque, S. Derengowski Lda, I. Silva-Pereira, and C. M. Kyaw**. 2013. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol* 4:353.
274. **Straus, S. K., and R. E. Hancock**. 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1758:1215-23.
275. **Aspedon, A., and E. A. Groisman**. 1996. The antibacterial action of protamine: evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 142:3389-3397.
276. **Johansen, C., A. Verheul, L. Gram, T. Gill, and T. Abee**. 1997. Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1155-1159.

277. **Nan, Y. H., S. H. Lee, H. J. Kim, and S. Y. Shin.** 2010. Mammalian cell toxicity and candidacidal mechanism of Arg- or Lys-containing Trp-rich model antimicrobial peptides and their d-enantiomeric peptides. *Peptides* 31:1826-1831.
278. **Ramachandran, G. N., C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan.** 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* 7:95-9.
279. **Blazyk, J., R. Wiegand, J. Klein, J. Hammer, R. M. Epand, R. F. Epand, W. L. Maloy, and U. P. Kari.** 2001. A novel linear amphipathic beta-sheet cationic antimicrobial peptide with enhanced selectivity for bacterial lipids. *J. Biol. Chem.* 276:27899-906.
280. **Schug, K. A., and W. Lindner.** 2005. Noncovalent binding between guanidinium and anionic groups: focus on biological- and synthetic-based arginine/guanidinium interactions with phosph[on]ate and sulf[on]ate residues. *Chem. Rev.* 105:67-114.
281. **Wender, P. A., W. C. Galliher, E. A. Goun, L. R. Jones, and T. H. Pillow.** 2008. The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60:452-472.
282. **Mishra, A., V. D. Gordon, L. Yang, R. Coridan, and G. C. Wong.** 2008. HIV TAT forms pores in membranes by inducing saddle-splay curvature: potential role of bidentate hydrogen bonding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47:2986-2989.
283. **Schmidt, N., A. Mishra, G. H. Lai, and G. C. Wong.** 2010. Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Lett.* 584:1806-1813.
284. **Schmidt, N. W., A. Mishra, G. H. Lai, M. Davis, L. K. Sanders, D. Tran, A. Garcia, K. P. Tai, P. B. McCray, A. J. Ouellette, M. E. Selsted, and G. C. Wong.** 2011. Criterion for amino acid composition of defensins and antimicrobial peptides based on geometry of membrane destabilization. *J. Am. Chem. Soc.* 133:6720-6727.
285. **Engelman, D. M., T. A. Steitz, and A. Goldman.** 1986. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15:321-353.
286. **Monera, O. D., T. J. Sereda, N. E. Zhou, C. M. Kay, and R. S. Hodges.** 1995. Relationship of sidechain hydrophobicity and alpha-helical propensity on the stability of the single-stranded amphipathic alpha-helix. *J. Pept. Sci.* 1:319-29.
287. **McGaughey, G. B., M. Gagne, and A. K. Rappe.** 1998. pi-Stacking interactions. *Alive and well in proteins.* *J. Biol. Chem.* 273:15458-15463.
288. **Chelli, R., F. L. Gervasio, P. Procacci, and V. Schettino.** 2002. Stacking and T-shape competition in aromatic-aromatic amino acid interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 124:6133-6143.
289. **Harms, M. J., J. L. Schlessman, G. R. Sue, and E. B. García-Moreno.** 2011. Arginine residues at internal positions in a protein are always charged. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:18954-18959.
290. **Lam, K. L., H. Wang, T. A. Siaw, M. R. Chapman, A. J. Waring, J. T. Kindt, and K. Y. Lee.** 2012. Mechanism of structural transformations induced by antimicrobial peptides in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1818:194-204.
291. **Bulet, P., R. Stocklin, and L. Menin.** 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198:169-84.
292. **Bagheri, M., M. Beyermann, and M. Dathe.** 2009. Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:1132-41.
293. **Sitaram, N., and R. Nagaraj.** 1999. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:29-54.
294. **Kuhn-Nentwig, L., M. Dathe, A. Walz, J. Schaller, and W. Nentwig.** 2002. Cupiennin 1d*: the cytolytic activity depends on the hydrophobic N-terminus and is modulated by the polar C-terminus. *FEBS Lett.* 527:193-8.
295. **Pukala, T. L., M. P. Boland, J. D. Gehman, L. Kuhn-Nentwig, F. Separovic, and J. H. Bowie.** 2007. Solution structure and interaction of cupiennin 1a, a spider venom peptide, with phospholipid bilayers. *Biochemistry* 46:3576-85.
296. **Hilpert, K., M. Elliott, H. Jenssen, J. Kindrachuk, C. D. Fjell, J. Korner, D. F. Winkler, L. L. Weaver, P. Henklein, A. S. Ulrich, S. H. Chiang, S. W. Farmer, N. Pante, R. Volkmer, and R. E. Hancock.** 2009. Screening and characterization of surface-tethered cationic peptides for antimicrobial activity. *Chem. Biol.* 16:58-69.
297. **Chen, G., S. Zhou M Fau - Chen, G. Chen S Fau - Lv, J. Lv G Fau - Yao, and J. Yao.** 2009. Nanolayer biofilm coated on magnetic nanoparticles by using a dielectric barrier discharge glow plasma fluidized bed for immobilizing an antimicrobial peptide.
298. **Avalos Vizcarra, I., P. Emge, P. Miermeister, M. Chabria, R. Konradi, V. Vogel, and J. Moller.** 2013. Fluorescence-based in situ assay to probe the viability and growth kinetics of surface-adhering and suspended recombinant bacteria. *Biointerphases* 8:22.

299. **Kulagina, N. V., M. E. Lassman, F. S. Ligler, and C. R. Taitt.** 2005. Antimicrobial peptides for detection of bacteria in biosensor assays. *Anal. Chem.* 77:6504-8.
300. **Sheng, H., and B. C. Ye.** 2009. Different strategies of covalent attachment of oligonucleotide probe onto glass beads and the hybridization properties. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152:54-65.
301. **Cordes, E. H., and W. P. Jencks.** 1963. The Mechanism of Hydrolysis of Schiff Bases Derived from Aliphatic Amines. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2843-2848.
302. **Lomant, A. J., and G. Fairbanks.** 1976. Chemical probes of extended biological structures: Synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). *J. Mol. Biol.* 104:243-261.
303. **Bagwe, R. P., L. R. Hilliard, and W. Tan.** 2006. Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding. *Langmuir* 22:4357-4362.
304. **Benters, R., C. M. Niemeyer, D. Drutschmann, D. Blohm, and D. Wöhrle.** 2002. DNA microarrays with PAMAM dendritic linker systems. *Nucleic Acids Res.* 30:E10.
305. **Risso, A., M. Zanetti, and R. Gennaro.** 1998. Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity. *Cell. Immunol.* 189:107-15.
306. **Magnusson, K. E.** 1989. Physicochemical properties of bacterial surfaces. *Biochem. Soc. Trans.* 17:454-8.
307. **Hong, Y., and D. G. Brown.** 2008. Electrostatic behavior of the charge-regulated bacterial cell surface. *Langmuir* 24:5003-9.
308. **Utsugi, T., A. J. Schroit, J. Connor, C. D. Bucana, and I. J. Fidler.** 1991. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res.* 51:3062-6.
309. **Lobo, R. F. M., M. A. Pereira-da-Silva, M. Raposo, R. M. Faria, and J. O. N. Oliveira.** 2003. The morphology of layer-by-layer films of polymer/polyelectrolyte studied by atomic force microscopy. *Nanotechnology* 14:101.
310. **Anzai, J.-i., Y. Kobayashi, N. Nakamura, M. Nishimura, and T. Hoshi.** 1998. Layer-by-Layer Construction of Multilayer Thin Films Composed of Avidin and Biotin-Labeled Poly(amine)s. *Langmuir* 15:221-226.
311. **Appendini, P., and J. H. Hotchkiss.** 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3:113-126.
312. **O'Neill, K., N. Aghaeepour, J. Spidlen, and R. Brinkman.** 2013. Flow cytometry bioinformatics. *PLoS Comput. Biol.* 9:e1003365.

A Materialien

Anhang A.1: Geräte.

Geräteart	Gerätename	Bezugsquelle
Autoklav	Autoclav VA65	Systec
Durchflusszytometer	Cytomics FC 500	Beckman Coulter
Hybridisierungsstation	Prototyp	Fraunhofer IBMT
Inkubationsmischer	Thriller	Peqlab
Inkubationsschüttler	Innova 40R	New Brunswick Scientific
Inkubator	Inkubator BD 115	Binder
Inkubator	TECO 20	Selutec
Laborwasser-Aufbereitungsanlage	Arium 611VF	Sartorius
Microarryscanner	Axon Genepix 4200A	Molecular Devices
Mikroskop	IX71	Olympus
Mikroskop	IX81	Olympus
Mikroskop	DMRB	Leica
Mikrotiterplatten-Lesegerät	FLUOstar Omega	BMG Labtech
Photometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Pipette, Mehrkanal	Charlotte 8 Kanal Pipette	VistaLab Technologies
Pipette, Mehrkanal	Research	Eppendorf
Pipette, verschiedene Größen	Research plus	Eppendorf
Sicherheitswerkbank	Biowizard KR-130	Kojair Tech Oy
Trockenschrank	Trockenschrank E 28	Binder
Vakuumgerät	NT2/46N	Boss
Vortexmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	LE6202P, Präzisionswaage	Sartorius
Waage	ME235S, Semimikrowaage	Sartorius
Waage	ME5, S2, Mikrowaage	Sartorius
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf
Zentrifuge, Vakuum	Concentrator 5301	Eppendorf

Anhang A.2: Peptide.

Peptidname	Reinheit	Peptidquelle	Bezugsquelle
A1-A5 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
Bac2a (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
BMAP-27	>80%	SPPS	GenScript USA und GeneCust Europe
BMAP-27 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
BMAP-27/1 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
BMAP-27/2 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
BMAP-27-Alexa647	>95%	SPPS	JPT Peptide Technologies
Buforin II	>80%	SPPS	GenScript USA und GeneCust Europe
C1-C8 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
D1-D8 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
H1-H8 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
Indolicidin (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
KL-Helix (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
LL-37	>80%	SPPS	GenScript USA und GeneCust Europe
M1-M9 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
Melittin	>85%	Bienengift	Sigma-Aldrich Chemie
Melittin	>80%	SPPS	GeneCust Europe und JPT Peptide Technologies
Melittin (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
Melittin/1 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
Melittin/2 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
N1-N8 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
O1	>95%	SPPS	Fraunhofer IBMT
O1 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
O2	>95%	SPPS	Fraunhofer IBMT
P7 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
Protamin	>90	Rekombinante Expression	ILBC
Protamin	Grade IV	Lachs	Sigma-Aldrich Chemie
Protamin	>80	SPPS	GeneCust Europe und JPT Peptide Technologies
S1-S10 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies
Tet127 (Bibliothek)	>70%	SPPS	JPT Peptide Technologies

Anhang A.3: Mikroorganismen.

Name	Spezifikation	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> DH5 α	Gramnegatives Bakterium	DSMZ
<i>E. coli</i> ML-35p	Gramnegatives Bakterium	Dr. R. I. Lehrer (Center for Health Sciences, Los Angeles, CA, USA)
L-929	Murine Fibroblasten-Zelllinie	DSMZ
<i>S. xylosus</i>	Grampositives Bakterium	DSMZ
U-937	Humane histiozytäre Lymphom-Zelllinie	DSMZ

Anhang A.4: Puffer und Kulturmedien.

Name	Variante	Komponenten	Bezugsquelle
Bicarbonat-Puffer		3,03 g/L Na ₂ CO ₃	Einzelkomponenten
		6,00 g/L NaHCO ₃	
		9,60 pH	
DMEM-Medium		Komplexes Zellkulturmedium	Biochrom GmbH
HEPES-Puffer		10,0 mM HEPES	Einzelkomponenten
		100,0 mM NaCl	
		7,2 pH	
LB-Medium	unmodifiziert	10,0 g/L NaCl 10,0 g/L Trypton 7,0 g/L Hefeextrakt	Einzelkomponente
	mit Ampicillin	100 mg/L Ampicillin	Einzelkomponente
MES-Puffer		25,0 mM MES	Einzelkomponente
		5,0 pH	
MHB	Medium	19,5 g/L Pepton 1,5 g/L Stärke 7,4 pH	AppliChem
	Agar	17,0 g/L Agar 7,4 pH	Einzelkomponente
PBS-Puffer		8,00 g/L NaCl	AppliChem
		0,20 g/L KCl	
		1,42 g/L Na ₂ HPO ₄	
		0,27 g/L KH ₂ PO ₄	
		7,40 pH	
RPMI 1640 Medium	unmodifiziert	Komplexes Zellkulturmedium	Biochrom
	mit Glutamin und FCS	2,0 mM Glutamin 10,0 % FCS	Einzelkomponenten
TRIS-Puffer	unmodifiziert	1,0 mM TRIS	Einzelkomponenten
		150,0 mM NaCl	
	mit BSA	8,0 pH	Einzelkomponente
		1,0 % BSA 8,0 pH	

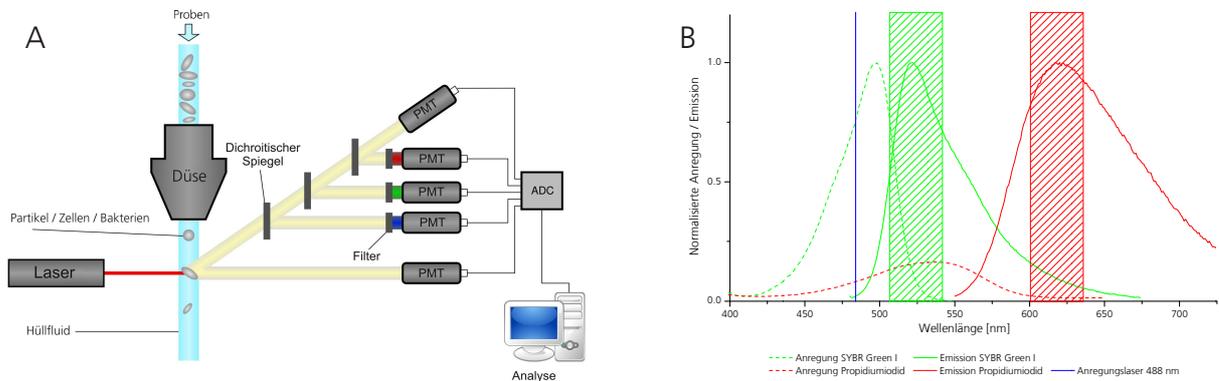
Anhang A.5: Verbrauchsmaterialien.

Materialart	Materialname	Bezugsquelle
Glasflaschen	Duran; mehrere Größen	Schott
Handschuhe, einmal	Blossom, Verschiedene Ausführungen	Mexpo International
Hüllfluid	Isoton II Diluent	Beckman Coulter
Kalibrierpartikel	PeakFlow Orange Flow Cytometry Reference Beads, 2.5 µM, 575 nm emission	Life Technologies
Küvetten	Einmalküvetten; PS	Brand
Mikrotiterplatten	PlateOne; PP; durchsichtig; flach	Starlab International
Mikrotiterplatten	BRANDplates; PS; schwarz; flach	Brand
Objektträger	Nunc Lab-Tek; 4er	Thermo Fisher Scientific
Objektträger	Menzel-Gläser; Glas; geschliffen	Gerhard Menzel
Objektträger, modifiziert		
Aldehyd	2D/3D-Aldehyde Glass Slide	PolyAn
Epoxy	2D/3D-Epoxy Glass Slide	
PDITC	2D/3D-PDITC Glass Slide	
NHS	2D/3D-NHS Glass Slide	
Pipettenspitzen	TipOne; mehrere Größen	Starlab International
Reaktionsgefäße	TubeOne; 1,5 ml	Starlab International
Reaktionsgefäße	Rotilabo; 1,5 ml; schwarz	Carl Roth
Röhren	Reagenz und Zentrifugenröhren; 5 ml; 15 ml; 50 ml	Sarstedt
Separationskammern	SecureSeal; 16er	Grace Bio-Labs
Separationskammern	ProPlate; 16er	Grace Bio-Labs
Trocknungsmittel	DriCap	Ted Pella Inc.
Zählkammer	Neubauer-Improved; mehrer Größen	Laboroptik
Zellkulturflaschen	T-75	TPP Techno Plastic Products

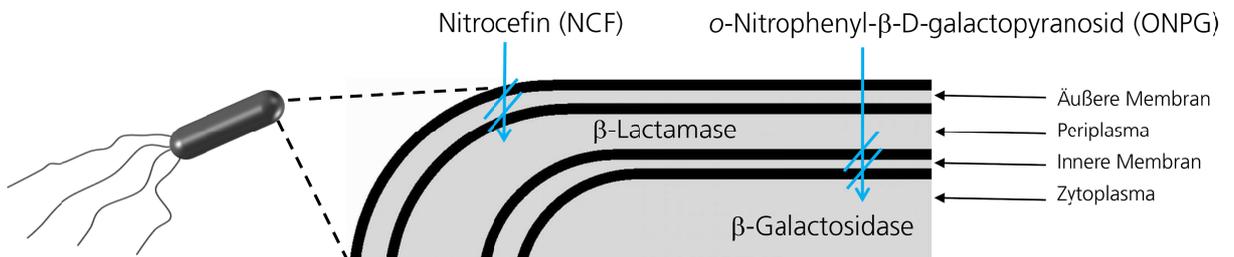
Anhang A.6: Sonstige Chemikalien und Komponenten.

Name	Summenformel	CAS-Nummer	Bezugsquelle
Agar	n. a.	9002-18-0	AppliChem
Ampicillin	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	69-52-3	AppliChem
APTS	C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si	919-30-2	Sigma-Aldrich Chemie
Bersteinsäureanhydrid	C ₄ H ₄ O ₃	108-30-5	Sigma-Aldrich Chemie
BSA	n. a.	9048-46-8	AppliChem
CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	n. a.	n. a.	Promega
DMSO	C ₂ H ₆ OS	67-68-5	Carl Roth
EDC	C ₈ H ₁₇ N ₃	25952-53-8	Sigma-Aldrich Chemie
Epicocconone (LavaPep Peptide Quantification Kit / FluoroProfile Protein Quantification Kit)	n. a.	n. a.	FLUORotechnics Australia / Sigma-Aldrich Chemie
Ethanol	C ₂ H ₆ O	64-17-5	Carl Roth
FCS	n. a.	n. a.	Biochrom
GOPTS	C ₉ H ₂₀ O ₅ Si	2530-83-8	Sigma-Aldrich Chemie
Hefeextrakt	n. a.	8013-01-2	Carl Roth
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	7365-45-9	AppliChem
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	67-63-0	Carl Roth
Kollagen	n. a.	n. a.	BioCore Medical Technologies
L-Glutamin	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	56-85-9	Biochrom
MES	C ₆ H ₁₃ NO ₄ S	4432-31-9	AppliChem
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	497-19-8	Carl Roth
Natriumchlorid	NaCl	7647-14-5	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	144-55-8	Carl Roth
Natriumhydroxid	NaOH	1310-73-2	Carl Roth
NHS	C ₄ H ₅ NO ₃	6066-82-6	Sigma-Aldrich Chemie
Nitrocefin	C ₂₁ H ₁₆ N ₄ O ₈ S ₂	41906-86-9	VWR International
ONPG	C ₁₂ H ₁₅ NO ₈	369-07-3	Sigma-Aldrich Chemie
Penicillin - Streptomycin	n. a.	n. a.	AppliChem
Pepton	n. a.	91079-46-8	Carl Roth
PHQ	C ₁₄ H ₈ O ₂	84-11-7	Sigma-Aldrich Chemie
PLL >300kDa	n. a.	25988-63-0	Sigma-Aldrich Chemie
Polymyxin B	C ₅₅ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₃	1405-20-5	Sigma-Aldrich Chemie
Propidiumiodid	C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄	25535-16-4	Sigma-Aldrich Chemie
Salzsäure	HCl	7647-01-0	Carl Roth
SYBR Green I	C ₃₂ H ₃₇ N ₄ S	163795-75-3	Sigma-Aldrich Chemie
Toluol	C ₇ H ₈	108-88-3	Carl Roth
TRIS	C ₄ H ₁₁ NO ₃	77-86-1	Carl Roth
Triton X-100	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n mit n = 9–10	9002-93-1	Sigma-Aldrich Chemie
Trypanblau	C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₄ S ₄	72-57-1	AppliChem
Trypsin	n. a.	n. a.	Biochrom
Trypton	n. a.	91079-40-2	Carl Roth

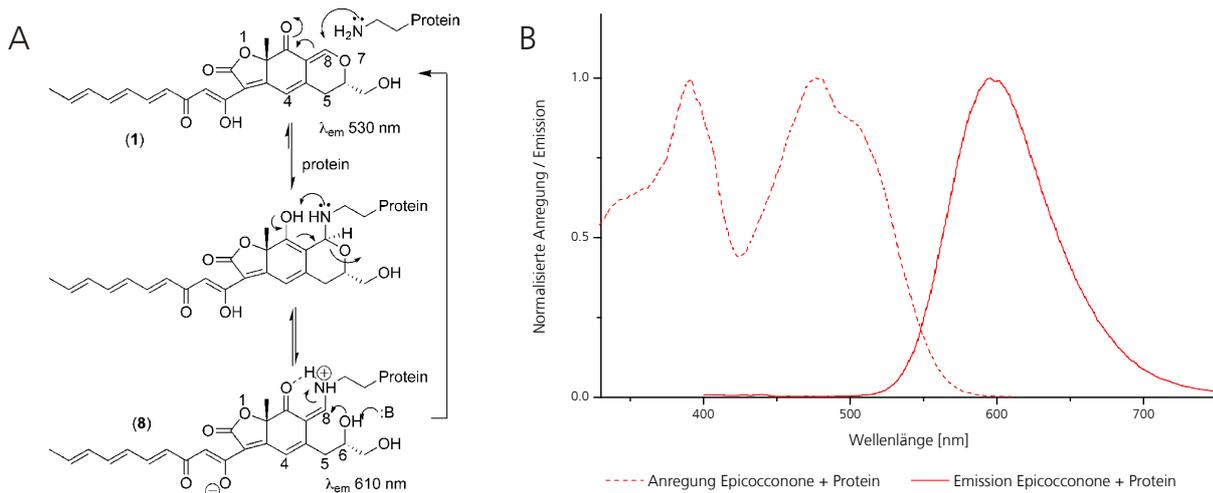
B Zusätzliche Abbildungen



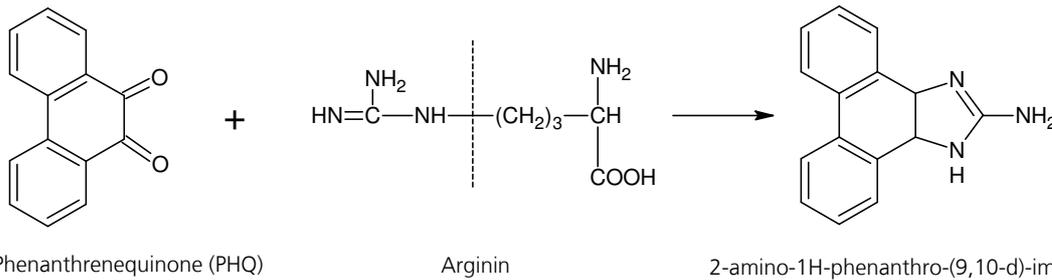
Anhang B.1: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers sowie das Fluoreszenzspektrum von SYBR Green I und Propidiumiodid. (A) Dargestellt ist der schematische Aufbau eines Durchflusszytometers [312][V], bei welchem die zu analysierenden Proben mittels einer Düse injiziert werden und von einem Hüllfluid ummantelt werden. Nach der Anregung mit einem Laser, werden die daraus resultierenden Fluoreszenzen und Streustrahlungen mittels selektiver Filter separiert und die Signale unter Verwendung von Photonenvervielfachern (PMT) amplifiziert. Anschließend werden die Signale unter Verwendung eines Digital-Analog-Wandlers (ADC) in auswertbare Daten überführt. (B) Dargestellt sind die normalisierten Anregungs- und Emissionsspektren von SYBR Green I und Propidiumiodid, wie sie während der Diskriminierung von Organismen mit intakten und beschädigten Membranen verwendet wurden. Die beiden schraffierten Bereiche repräsentieren die Wellenlängenbereiche, welche durch die verwendeten Detektoren erfasst wurden.



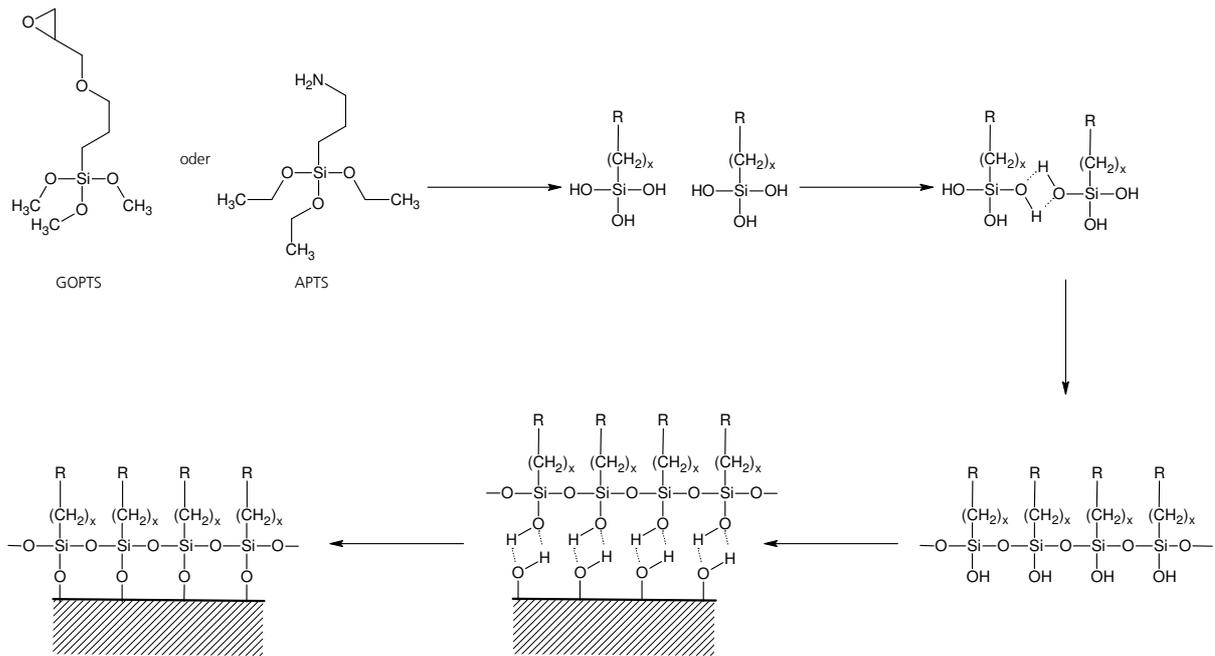
Anhang B.2: Schematische Darstellung von *E. coli* ML-35p. Dargestellt ist das Bakterium *E. coli* ML-35p, mit den für die Analyse der Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran relevanten Enzymen [VI]. Während die β -Lactamase in dem periplasmatischen Raum vorliegt, wird die β -Galactosidase als zytosolisches Enzym exprimiert. Die Substrate können die bakteriellen Membranen nicht mittels passiver Diffusion durchdringen und das Bakterium besitzt auch keine Transporter, welche den Austausch der Substrate über die Membranen ermöglichen würden. Somit kann eine enzymatische Reaktion erst stattfinden, sobald die jeweils äußere oder innere Bakterienmembran permeabilisiert wird [257].



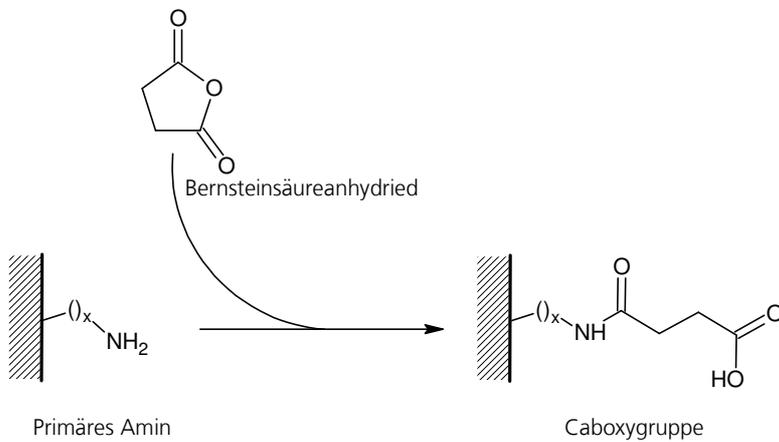
Anhang B.3: Reaktionsmechanismus und Fluoreszenzspektrum von Epicocconone. (A) Dargestellt ist das exemplarische Reaktionsschema von Epicocconone mit einem proteininternen, freien Amin [260][VII]. Aufgrund der kovalenten Bindung ändert sich der Konjugationszustand von Epicocconone, woraufhin fluoreszierende Eigenschaften induziert werden. (B) Dargestellt ist das normalisierte Anregungs- und Emissionsspektrum von Epicocconone, welches kovalent mit der Aminogruppe eines Proteins verbunden ist.



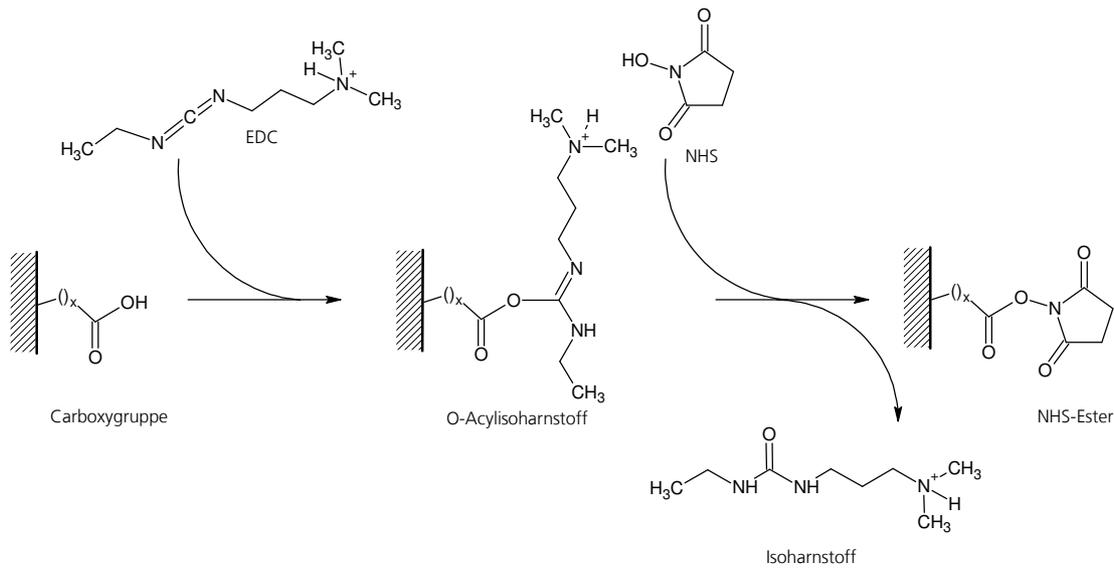
Anhang B.4: Schematische Darstellung der Reaktion zwischen PHQ und Arginin. Dargestellt ist das Reaktionsschema, bei welchem PHQ mit Arginin reagiert, woraufhin das lösliche Produkt 2-amino-1H-phenanthro-(9,10-d)-imidazol entsteht [261, 262][VIII]. Dieses Produkt weist, im Vergleich zum Edukt, fluoreszierende Eigenschaften auf, welche bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 405 nm detektiert werden können.



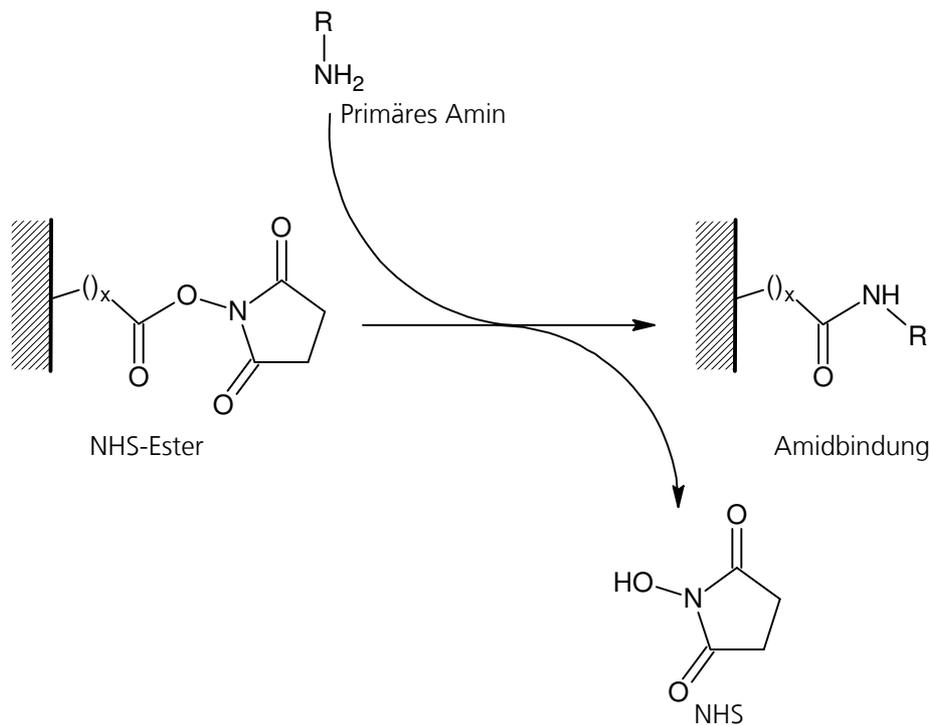
Anhang B.5: Silanisierung von Glasobjektträgern mittels GOPTS bzw. APTS. Dargestellt ist die schematische Polymerisation der beiden monomeren Organosilane GOPTS und APTS mit den freien Hydroxylgruppen von anorganischen Oberflächen [258]. Die Reaktion umfasst die Hydrolyse der Alkoxysilane, wodurch reaktive Silanole entstehen, welche im Anschluss daran Wasserstoffbrückenbindungen zu anderen Silanolen oder den auf der Oberfläche befindlichen Hydroxylgruppen ausbilden. Dies resultiert in einem Netzwerk mehrerer Organosilane. Durch eine anschließende Kondensationsreaktion entstehen polymerisierte, kovalente Oberflächenbeschichtungen, welche mit der jeweiligen reaktiven Gruppe funktionalisiert sind.



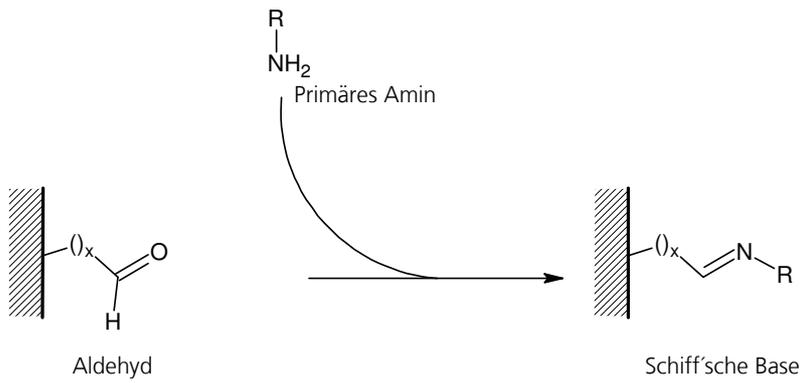
Anhang B.6: Reaktion von primären Aminen mit Bernsteinsäureanhydrid. Dargestellt ist die chemische Reaktion von primären Aminen mit Bernsteinsäureanhydrid [258]. Durch die Reaktion des Anhydrids mit primären Aminen findet ein Ringöffnungsprozess statt, welcher die Ausbildung von Amidbindungen zur Folge hat und letztendlich in freien terminalen Carboxygruppen resultiert.



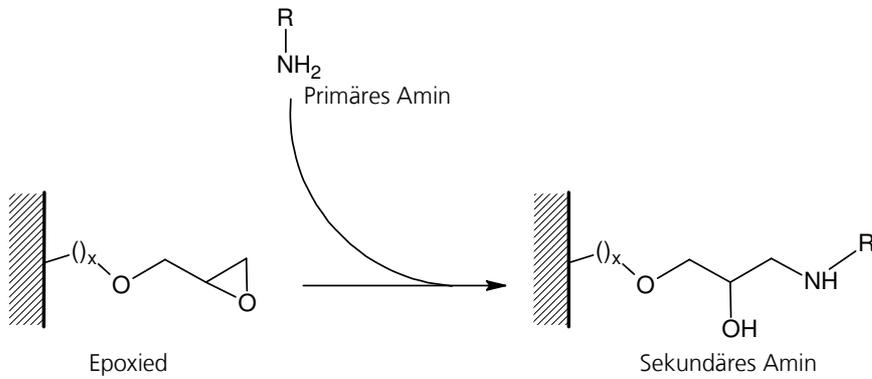
Anhang B.7: Chemische Aktivierung von Carboxygruppen mittels EDC/NHS. Dargestellt ist die chemische Aktivierung von freien terminalen Carboxygruppen unter Zuhilfenahme von EDC und NHS [258]. Durch die Reaktion der Carboxygruppe mit EDC entsteht ein aktiviertes O-Acylharnstoffderivat, welches ein Zwischenprodukt bei der Aktivierung darstellt. Durch die anschließende Substitutionsreaktion mit NHS entsteht ein hydrolysestabiler NHS-Ester (aktivierte Carbonsäure), welcher sich durch seine hohe Reaktivität gegenüber primären Aminen auszeichnet.



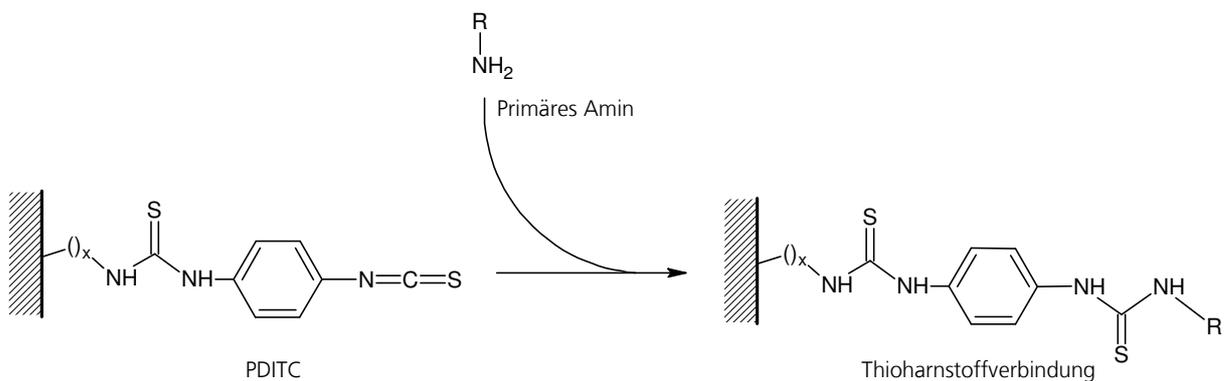
Anhang B.8: Reaktion von NHS-Estern mit primären Aminen. Dargestellt ist die chemische Reaktion von NHS-Estern mit primären Aminen [258]. Bei der Reaktion entstehen stabile Amidbindungen zwischen den zuvor aktivierten Carboxygruppen und den primären Aminen, wobei NHS als gute Abgangsgruppe fungiert.



Anhang B.9: Reaktion von Aldehyden mit primären Aminen. Dargestellt ist die chemische Reaktion von Aldehyden mit primären Aminen, wodurch hydrolyselabile Schiff'sche Basen entstehen [258].



Anhang B.10: Reaktion von Epoxiden mit primären Aminen. Dargestellt ist die chemische Reaktion von Epoxiden mit primären Aminen. Bei der Reaktion findet eine Ringöffnung statt, welche in der Ausbildung von stabilen sekundären Aminen und β -Hydroxygruppen resultiert [258].



Anhang B.11: Reaktion von Isothiocyanaten mit primären Aminen. Dargestellt ist die chemische Reaktion von Isothiocyanaten mit primären Aminen, wobei stabile Thioharnstoffverbindungen entstehen [258].

C Lizenzen für die Reproduktion von Bilder

- I. Grafik entnommen aus: **Brogden, K. A.** 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3:238-250.
Lizenzierungsnummer für die Reproduktion der Abbildung: 3261870191854 (Copyright Clearance Center)
- II. Grafik entnommen aus: **Brogden, K. A.** 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3:238-250.
Lizenzierungsnummer für die Reproduktion der Abbildung: 3261870191854 (Copyright Clearance Center)
- III. Grafik entnommen aus: **Peschel, A.** 2002. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology* 10:179-186.
Lizenzierungsnummer für die Reproduktion der Abbildung: 3278161264537 (Copyright Clearance Center)
- IV. Grafik entnommen aus: **Siedenbiedel, F., and J. C. Tiller.** 2012. Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers* 4:46-71.
Die Grafik wurde modifiziert.
Lizenzierung: Open access Artikel, Reproduktion unter den Bedingungen der CC-Lizenz Namensnennung 3.0
- V. Grafik entnommen aus: **O'Neill, K., N. Aghaeepour, J. Spidlen, and R. Brinkman.** 2013. Flow cytometry bioinformatics. *PLoS Comput. Biol.* 9:e1003365.
Die Grafik wurde modifiziert.
Lizenzierung: Open access Artikel, Reproduktion unter den Bedingungen der CC-Lizenz Namensnennung 4.0
- VI. Grafik entnommen aus: **Eriksson, M., P. E. Nielsen, and L. Good.** 2002. Cell permeabilization and uptake of antisense peptide-peptide nucleic acid (PNA) into *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277:7144-7147.
Die Grafik wurde modifiziert und in einer überarbeiteten Form gezeichnet.
Lizenzierung: Open access Artikel, Reproduktion unter den Bedingungen der Berechtigungsrichtlinien der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Stand April 2014
- VII. Grafik entnommen aus: **Coghlan, D. R., J. A. Mackintosh, and P. Karuso.** 2005. Mechanism of reversible fluorescent staining of protein with epicocconone. *Org. Lett.* 7:2401-4.
Die Grafik wurde modifiziert.
Lizenzierung: Genehmigung für die Reproduktion in gedruckter und digitaler Form. Copyright (2005) American Chemical Society.
- VIII. Grafik entnommen aus: **Magun, B. E., and J. W. Kelly.** 1969. A new fluorescent method with phenanthrenequinone for the histochemical demonstration of arginine residues in tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 17:821-7.
Die Grafik wurde modifiziert.
Lizenzierung: Open access Artikel, Reproduktion unter den Bedingungen der Berechtigungsrichtlinien von SAGE, Stand April 2014

D Veröffentlichungen

Peer-Review Artikel

Rapsch, K., F. F. Bier, M. Tadros, and M. von Nickisch-Rosenegk. 2014. Identification of antimicrobial peptides and immobilization strategy suitable for a covalent surface coating with biocompatible properties. *Bioconjug. Chem.* 25:308-19.

Rapsch, K., F. F. Bier, and M. von Nickisch-Rosenegk. 2014. Rational design of artificial beta-strand forming antimicrobial peptides with biocompatible properties. *Mol. Pharm.* 11:3492-502

Patent

Rapsch, K. und M. von Nickisch-Rosenegk. 2014. Synthetische artifizielle Peptide mit antimikrobieller Wirkung. Deutsche Patentanmeldung, Nr.: 10 2014 101 663.7

Wissenschaftliche Vorträge

Rapsch, K., F. F. Bier, M. Tadros, and M. von Nickisch-Rosenegk. 2012. Investigation of antimicrobial peptides as functional molecules for the prevention of bacterial surface contamination using high-throughput methods. „Third International Symposium on Antimicrobial Peptides: Today knowledge and future applications“, Lille, Frankreich, 13. - 15. Juni 2012.

Rapsch, K., F. F. Bier, and M. von Nickisch-Rosenegk. 2011. Antimikrobielle Peptide als funktionale Moleküle für die Oberflächenbeschichtung. Workshop "Funktionsschichten: Materialien und Prozesse", Technische Hochschule Wildau, Wildau, Deutschland, 05. Dezember 2011.

Posterpräsentationen

Rapsch, K., F. F. Bier, M. Tadros, and M. von Nickisch-Rosenegk. 2012. Optimization and characterization of a BMAP-27 based antimicrobial surface coating. „Second International Meeting on Antimicrobial Peptides: Antimicrobial peptides as lead compounds to combat multi-resistant pathogens“, Leipzig, Deutschland, 30. - 31. August 2012.

Tadros, M., G. Präg, **K. Rapsch**, F.F. Bier, D. Meißner, V. Klix and M. von Nickisch-Rosenegk. 2012. Expression, isolation and purification of the antimicrobial peptide BMAP-27 and its application as a bacteri-/ fungicidal surface. „Second International Meeting on Antimicrobial Peptides: Antimicrobial peptides as lead compounds to combat multi-resistant pathogens“, Leipzig, Deutschland, 30. - 31. August 2012.

Rapsch, K., F. F. Bier, M. Tadros, and M. von Nickisch-Rosenegk. 2012. Investigation of antimicrobial peptides as functional molecules for the prevention of bacterial surface contamination using high-throughput methods. „Third International Symposium on Antimicrobial Peptides: Today knowledge and future applications“, Lille, Frankreich, 13. - 15. Juni 2012.

Rapsch, K., F. F. Bier, and M. von Nickisch-Rosenegk. 2011. Selektive Immobilisierung von probiotischen Bakterien durch biochemisch funktionalisierte Oberflächen. „7. Deutsches BioSensor Symposium“, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland, 03. - 06. April 2011.

E Danksagung

Während dieser Arbeit standen mir viele Menschen mit Rat und Tat zur Seite und obwohl ich weiß, dass Worte nicht annähernd die angemessene Dankbarkeit ausdrücken können, möchte ich dennoch die Gelegenheit nutzen, um einigen Leuten meinen speziellen Dank auszusprechen.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Neubauer vom Fachbereich Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Berlin für die Betreuung und uneingeschränkte Unterstützung dieser Dissertation bedanken.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Bier vom Fraunhofer IBMT für die Bereitstellung dieses Dissertationsthemas und in diesem Zusammenhang speziell für seine fachliche und organisatorische Unterstützung sowie Betreuung. Zudem bin ich dankbar dafür, dass mir durch die Arbeit am Fraunhofer Institut auch ein Einblick in weitere interessante Thematiken, Methoden und Prozesse ermöglicht wurde, welche nicht nur mein naturwissenschaftliches Verständnis sondern auch meinen intellektuellen Horizont erweitert und maßgeblich beeinflusst haben.

Bei meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Markus von Nickisch-Rosenegk möchte ich mich außerordentlich für seine Unterstützung in fachlicher, moralischer und organisatorischer Hinsicht bedanken. Außerdem bedanke ich mich für sein fortwährendes Vertrauen, welches mir meine wissenschaftliche Entfaltung und den nötigen Freiraum ermöglicht hat. Zudem bin ich sehr dankbar für seine unablässige Ermutigung und Förderung meiner extravaganen Ideen, ohne welche das rationale Design der antimikrobiellen Peptide niemals möglich gewesen wäre.

Martina Obry danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Umsetzung von vielen Experimenten, und organisatorischen Belangen. Wahrscheinlich hätte diese Arbeit ohne sie in einem totalen Desaster und absoluten Chaos geendet. Außerdem möchte ich mich für ihre andauernde Ermutigung bedanken, welche mich insbesondere durch die schweren Abschnitte dieser Arbeit begleitet hat. Dank ihr werde ich immer an diese Zeit zurück denken, wenn mir eine Eiskugel mal in den Dreck fallen sollte.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Simone Aubele, insbesondere für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Zellkultur, bedanken. Ohne sie wäre die praktische Umsetzung kaum möglich gewesen. Außerdem möchte ich mich für die uneingeschränkte Unterstützung bei meinen ausufernden Experimenten bedanken, egal wie viele Proben sie auch enthielten.

Ein weiterer besonderer Dank geht an Anne Thomas, deren Masterarbeit den methodischen Grundstein für diese Dissertation gelegt hat. Ich bedanke mich dafür, dass ich sie auf dem Weg ihrer Masterarbeit begleiten durfte. Zudem bin ich sehr dankbar für ihre unermüdliche Unterstützung bei der Evaluierung der MIC-Werte und der Membran-permeabilisierenden Eigenschaften der artifiziellen Peptide.

Vielen Dank auch an Michaela Schellhase, die mich tatkräftig bei der Funktionalisierung der Oberflächen unterstützt hat.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Sebastian Hoppe bedanken, welcher mir während der gesamten Zeit nicht nur ein guter Freund und Leidensgenosse war, sondern durch seine wissenschaftliche Unterstützung und Diskussion diese Arbeit maßgeblich bereichert hat. Insbesondere danke ich ihm für die Korrektur meiner englischen Texte, denen ansonsten garantiert das gewisse Extra gefehlt hätte.

Vielen Dank auch an Sebastian Kersting, Maria Bosserdts und Christine Hüttl, die diese Arbeit durch ihre kontinuierliche moralische Unterstützung, unzähligen Diskussionen und orthographischen als auch konzeptionellen Hilfestellungen bereichert haben. Außerdem möchte ich ihnen auch für die Unterstützung bei der farblichen Gestaltung zahlreicher Abbildungen und Präsentationen danken.

Ein ganz großer Dank geht an dieser Stelle auch an alle anderen Mitarbeiter des Fraunhofer Instituts, die mit ihrer entgegengebrachten Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Geduld maßgeblich für das sehr angenehme Arbeitsklima verantwortlich waren. Dank ihnen werde ich diese Arbeit stets in guter und angenehmer Erinnerung behalten.

Mein Dank geht auch an Kathi Scheinpflug vom Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie für ihre Unterstützung bei den Experimenten bezüglich der äußeren und inneren Membranpermeabilisierung von *E. coli* ML-35p.

Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle einen ganz besonderen Dank für ihre fortwährende Unterstützung und Ermutigung während dieser Arbeit aussprechen. Letztendlich haben sie diese Arbeit erst ermöglicht, da sie mir bereits während meiner Schulzeit wichtige Werte wie Ausdauer, Disziplin, Engagement und Zuversicht beigebracht haben, welche mir bei dieser Dissertation und in meinem bisherigen Leben von unschätzbarem Nutzen waren und es auch weiter hin sein werden.

Abschließend möchte ich mich bei Franziska Schlegel, einem der wichtigsten Menschen in meinem Leben, für ihre seelische und moralische Unterstützung als auch ihre Geduld und Akzeptanz während dieser Arbeit bedanken. Ich bedanke mich dafür, dass sie meine Motive und Beweggründe versteht wie kein anderer und ich bin glücklich sie in meinem Leben zu haben.

Dieses Projekt wurde teilweise durch das Ministerium für Wirtschaft und Europaangelegenheiten des Landes Brandenburg, Förderkennzeichen: ILB80139358/ILB80139359, gefördert und zusätzlich durch den Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) kofinanziert. Zudem wurde dieses Projekt teilweise durch das Zentrale Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM) des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie unterstützt und durch die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e.V. (AiF), Förderkennzeichen: KF22674001MD9, begleitet.