

# **Peptoide als potenzielle antibiotische Wirkstoffe gegen multiresistente Bakterien**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie

genehmigte

DISSERTATION

von

**Bettina Simone Fleck**

aus

Neuenbürg

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Ute Schepers

Korreferent:: Prof. Dr. Frank Breitling

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -  
Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0 DE):  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.de>

**Für meine Familie.**



# Inhaltsverzeichnis

---

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung.....	3
1.1 Antimikrobielle Resistenz.....	4
1.1.1 Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
1.1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	10
1.1.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	11
1.1.4 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	12
1.1.5 <i>Candida</i> Spezies.....	14
1.2 Die bakterielle Zellwand.....	15
1.3 Peptide in der pharmakologischen Forschung.....	19
1.4 Peptidomimetika.....	20
1.5 Peptidsynthese.....	22
1.5.1 Monomere-Methode.....	23
1.5.2 Submonomere-Methode.....	24
1.6 Synthese von Peptoidbibliotheken.....	25
1.6.1 IRORI-Technologie.....	26
2. Ergebnisse und Diskussion.....	29
2.1 Peptoidbibliotheken.....	29
2.1.1 Peptoidbibliothek 1.....	32
2.1.2 Peptoidbibliothek 2.....	33
2.1.3 Peptoidbibliothek 3.....	37
2.1.4 Peptoid Oktamere.....	40
2.1.5 Peptoid Pentamer, Nonamere, Undekamere und Dodekamere.....	42
2.2 Antimikrobielle Aktivität gegen <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45

2.2.1 Antimikrobielle Aktivität der Peptoidbibliothek 1 gegen <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
2.2.2 Antimikrobielle Aktivität der Peptoidbibliothek 2 gegen <i>Staphylococcus aureus</i> .....	56
2.2.3 Antimikrobielle Aktivität der Peptoidbibliothek 3 gegen <i>Staphylococcus aureus</i> .....	61
2.2.4 Antimikrobielle Aktivität der Peptoidbibliothek Oktamere gegen <i>Staphylococcus aureus</i> .....	66
2.2.5 Antimikrobielle Aktivität der Peptoidbibliothek Pentamer, Nonamere, Undekamere und Dodekamere gegen <i>Staphylococcus aureus</i> .....	68
2.3 Zeitliche Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität gegen <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29737 .....	70
2.4 Antimikrobielle Aktivität gegen <i>MRSA</i> .....	73
2.5 Antimikrobielle Aktivität gegen gram-negative Bakterien .....	75
2.5.1 Antimikrobielle Aktivität gegen <i>Escherichia coli</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	75
2.5.2 Antimikrobielle Aktivität gegen <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	78
2.6 <i>Ampetoids</i> gegen <i>Mycobacteria</i> .....	81
2.6.1 Synergistischer Effekt von antimikrobiellen Peptoiden, Isoniazid und Rifampicin gegen <i>Mycobacterium bovis</i> .....	83
2.7 Antimikrobielle Aktivität gegen <i>Candida albicans</i> .....	84
2.8 Zytotoxizität von antimikrobiellen Peptoiden .....	87
2.9 Hämolytische Aktivität von antimikrobiellen Peptoiden.....	89
2.10 Membranpermeabilisierung von <i>Ampetoids</i> .....	91
2.11 Lokalisation von <i>Ampetoids</i> in Zellen.....	92
2.12 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ Stimulierung .....	98
2.13 Glykosilierte Peptoidnanosheets.....	100
2.14 Morphometrie Analyse mit Hilfe von <i>soft X-ray Tomographie</i> .....	108
3. Zusammenfassende Diskussion und Schlussfolgerung.....	113
4. Material und Methoden.....	121

4.1 Chemische Methodik.....	121
4.1.1 Synthese von Peptoidbibliotheken .....	121
4.2 Bakterielle Methodik.....	125
4.2.1. Kultivierung von Bakterien.....	126
4.2.2 Kultivierung von Hefepilzen.....	126
4.2.3 Photometrische Analyse des Wachstumsverhaltens.....	127
4.2.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) .....	127
4.2.5 Bestimmung der bakteriziden Wirkung.....	130
4.2.6 Zeitliche Bestimmung der bakteriziden Wirkung.....	130
4.2.7 Synergistischer Effekt antimikrobieller Wirkstoffe .....	131
4.3 Allgemeine Methoden der Zellkultur .....	131
4.3.1 Passagieren der Zellen.....	132
4.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen .....	133
4.4 Bestimmung der Zellzytotoxizität mittels MTS-Test .....	133
4.5 Hämolytische Aktivität .....	134
4.6 Membranpermeabilitätsuntersuchung mittels Durchflusszytometrie .....	135
4.7 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	136
4.8 TNF-alpha ELISA Assay .....	136
4.9 Mannosebeschichtete Peptoid-Nanosheets .....	137
4.9.1 Bindung der Bakterien an Peptoid-Nanosheets .....	137
4.9.2 Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit der an die Nanosheets gebundenen Bakterien.....	140
4.10 <i>Soft X-ray</i> Tomographie.....	141
4.11 Geräte und Materialien.....	143
Literaturverzeichnis.....	147
Appendix.....	173
Publikationsliste .....	203
Danksagung .....	205



# Abkürzungsverzeichnis

---

<b>A</b>	Absorption
<b>aa</b>	„Aminoacid“
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>ÄM</b>	Äußere Membran
<b>AMP</b>	Antimikrobielle Peptide
<b>Ampetoid</b>	Antimikrobielles Peptoid
<b>AMR</b>	Antimikrobielle Resistenz
<b>Äq</b>	Äquivalent
<b>BCG</b>	Bacille Calmette-Guérin
<b><i>C. albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i>
<b>CAT</b>	Computertomographie
<b>CD</b>	Circulardichroismus
<b>CD4</b>	„Cluster of differentiation 4“
<b>CDC</b>	„Centers for Disease Control and Prevention“
<b>CFU</b>	“Colony forming unit“
<b>CHCA</b>	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure
<b>CM</b>	Cytoplasmamembran
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>ConA</b>	Concanavalin A
<b>CPPos</b>	Zellpenetrierende Peptide
<b>CPPs</b>	“Cell penetrating peptides“
<b>CRE</b>	Carbapenem-resistente Enterobacteriaceae
<b>CWH</b>	„Cell wall-anchored“
<b>CY</b>	Cytoplasma
<b>DCM</b>	Dichlormethan
<b>DF</b>	„Drug-free“
<b>DIC</b>	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
<b>DMEM</b>	“Dulbecco`s Modified Eagle Medium“
<b>DMF</b>	Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure

<b>DPBS</b>	“Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline”
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EHEC</b>	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
<b>ELISA</b>	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
<b>EMA</b>	„European Medicines Academy“
<b>ESBL</b>	„Extended-Spectrum-Betalactamase“
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>ExPEC</b>	Extraintestinale pathogene Stämme von <i>E. coli</i>
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>FDA</b>	„Food and Drug Administration“
<b>FIC</b>	„Fractional Inhibitory Concentration“
<b>FICI</b>	„Fractional Inhibitory Concentration Index“
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FKS</b>	Fötales Kälberserum
<b>Fmoc</b>	9H-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)
<b>FnBPA/B</b>	Fn-Bindeprotein A/B
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -Acetylglucosaminsäure
<b>HD<sub>50</sub></b>	“Haemolytic dosis 50%”
<b>HGT</b>	Horizontaler Gentransfer
<b>HIV-1Tat</b>	„HIV-1 transcription activating Protein“
<b>HOBt</b>	Hydroxybenzotriazol
<b>HPLC</b>	“High pressure liquid chromatography”
<b>HWI</b>	Harnwegsinfekt
<b>I</b>	Intensität
<b>ISO</b>	Isoniazid
<b>K</b>	Kontrolle
<b>kanR</b>	Kanamycin Repressor Protein
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbapenem
<b>LAC</b>	Linearer Absorptionskoeffizient
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LD<sub>50</sub></b>	“Lethal Dose 50%”
<b>LPS</b>	„Lipopolysaccharide“

<b><i>M. abscessus</i></b>	<i>Mycobacterium abscessus</i>
<b><i>M. bovis</i> BCG</b>	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG
<b><i>M. chelonae</i></b>	<i>Mycobacterium chelonae</i>
<b><i>M. intracellulare</i></b>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<b>mAGP</b>	Arabinogalaktankomplex
<b>MALDI</b>	“Matrix assisted laser desorption ionisation”
<b>MBK</b>	Minimale bakterizide Konzentration
<b>MDR-TB</b>	„Multidrugresistant tuberculosis“
<b>mec</b>	Methicillin-Resistenzdeterminante
<b>MHB</b>	“Mueller-Hinton Broth”
<b>MHK</b>	Minimale Hemmkonzentration
<b>MRSA</b>	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>Mtb</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<b>MUR</b>	Mureinschicht
<b>MurNAc</b>	<i>N</i> -Glycolyl-muraminsäure
<b>MW</b>	Molekulargewicht
<b>NAD(P)H</b>	Nicotinamidadenindikukleotid(phosphate), reduzierte Form
<b>Nae</b>	<i>N</i> -(2-aminoxyethyl)glycin
<b>NCAC</b>	non- <i>albicans</i> <i>Candida</i>
<b>Nce</b>	<i>N</i> -(2-carboxyethyl)glycin
<b>ND</b>	Nicht determiniert
<b>NDM-1</b>	Neu-Delhi Metallo-Beta-Laktamase
<b>Nhe</b>	<i>N</i> -(hexyl)glycin
<b>NIH</b>	„National Institute of Health“
<b>Nile</b>	<i>N</i> -(1-methylpropyl)glycin
<b>Mys</b>	<i>N</i> -(4-aminobutyl)glycin
<b>Nme</b>	<i>N</i> -(2-methoxyethyl)glycin

<b>Npcb</b>	<i>N</i> -(4-chlorbenzyl)glycin
<b>Npe</b>	<i>N</i> -(2-phenylethyl)glycin
<b>Npfb</b>	<i>N</i> -(4-fluorobenzyl)glycin
<b>Nphb</b>	<i>N</i> -(4-hydroxybenzyl)glycin
<b>Nphe</b>	<i>N</i> -(benzyl)glycin
<b>Nprg</b>	<i>N</i> -(2-prop-2-yn-1-yl)glycin
<b>Nspe</b>	<i>N</i> -(S)-(1-phenylethyl)glycin
<b>NTA</b>	Nitrilotriessigsäure
<b>Ntetradec</b>	<i>N</i> -(tetradecyl)glycin
<b>Ntridec</b>	<i>N</i> -(tridecyl)glycin
<b>Ntrp</b>	<i>N</i> -(2-indolethyl)glycin
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>ORN</b>	Oligoribonuclease
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PBP</b>	Penicillin Bindeprotein
<b>pDMF</b>	“Peptide grade dimethylformamide”
<b>PE</b>	Polyethylen
<b>PIPES</b>	“Piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2-ethanesulfonic acid)”
<b>PP</b>	Polypropylen
<b>Rf</b>	Radiofrequenz
<b>RhoB</b>	Rhodamin B
<b>RIF</b>	Rifampicin
<b>ROS</b>	„Reactive Oxygen Species“
<b>rpm</b>	“Revolution per minute”
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SCCmec</b>	<i>Staphylococcus</i> cassette chromosome <i>mec</i>
<b>spp.</b>	Spezies
<b>TA</b>	„Teichoic acid“
<b>TB</b>	Tuberkulose
<b>TDM</b>	Trehalose-6,6`-dimykolat
<b>tetR</b>	Tetracyclin Repressor Protein
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>THF</b>	Tetrahydrofuran

<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
<b>TSB</b>	“Tryptic Soy Broth”
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VRE</b>	Vancomycin-resistente Enterokokken
<b>WHO</b>	“World Health Organization”
<b>WLA</b>	„Wall teichoic acid“
<b>XDR-TB</b>	„Extrem multidrug tuberculosis“
$\lambda$	Lambda



## Zusammenfassung

---

Die Arzneimittelentwicklung von Antibiotika im goldenen Zeitalter der 1960-er bis 1970-er Jahre führte zu dem Durchbruch, Infektionen weltweit heilen und kontrollieren zu können. Erste Erfolge brachten jedoch ein falsches Sicherheitsgefühl über die vollständige Kontrolle von bakteriellen Infektionen. Das Auftreten und Wiederauftreten von multiresistenten (MDR) Bakterien wurde seitdem als alarmierende Bedrohung für die öffentliche Gesundheit eingestuft. Ein Mangel an neuartigen Antibiotika-Klassen führt zu einem erheblichen Bedarf, der derzeit nicht gedeckt werden kann. Die meisten neuen Antibiotika sind strukturell eng mit den vorhandenen verwandt, so dass der Weg zur Entwicklung von Arzneimittelresistenzen kurz und unumgänglich ist. Für die Behandlung multiresistenter Keime, wie beispielsweise *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* (MRSA, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*), *Klebsiella* und *M. tuberculosis* stehen zunehmend weniger Behandlungsoptionen zur Verfügung.

Zu den bemerkenswertesten neuen und vielversprechenden Klassen von Breitbandantibiotika zählen die antimikrobiellen Peptide (AMPs) und ihre Mimetika, wie beispielweise Peptoide. In dieser Arbeit wurde geprüft, ob sich Peptoide auch als mögliche Substanzklasse zur Behandlung von Infektionen mit multiresistenten Bakterien eignen. In dieser Arbeit wurden Tetramere, Pentamere, Oktamere, Nonamere, Undekamere und Dodekamere auf ihre antimikrobielle Wirkung auf gram-positive Bakterien, gram-negative Bakterien und Mykobakterien getestet. Des Weiteren wurde ihre fungizide Wirkung überprüft. Neben der Untersuchung der zytotoxischen Wirkung, hämolytischen Aktivität und der zellulären Aufnahme wurde zudem die TNF- $\alpha$  Stimulierung antimikrobieller Peptoide untersucht. Durch *soft X-ray* Tomographie wurden Peptoide auf ihren Wirkmechanismus in Bakterien untersucht. Des Weiteren wurden mannosebeschichtete Peptoidnanosheets auf ihre hemmenden Eigenschaften gegenüber *E. coli* überprüft. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Peptoide antimikrobielle Eigenschaften gegen Bakterien haben können. Durch ihre geringe Toxizität in Säugerzellen, hohe Stabilität und niedrige Synthesekosten sind sie als neue antimikrobielle Substanzen mit therapeutischen Anwendungen geeignet.



# 1. Einleitung

---

Die Entdeckung von Penicillin, dem ersten zugelassenen Antibiotikum durch Alexander Fleming im Jahr 1928, gehört zu den bedeutungsvollsten Meilensteinen der Medizingeschichte (Bennett und Chung 2001). Erst durch den Einsatz von Antibiotika konnten bakterielle Infektionen, die zuvor tödlich endeten, geheilt werden (Radetsky 1996). Durch den breiten und stetigen Konsum von Antibiotika seit Anfang der sechziger Jahre entwickelte sich jedoch eine ständig wachsende Resistenz gegen Antibiotika und dadurch eine zunehmende Infektionsreichweite von Bakterien, Parasiten, Viren und Pilze (Ridley et al. 1970, WHO 2014). Für die Therapie gegen multiresistente Bakterien, wie beispielsweise *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* spp. oder *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), und Pilze, wie *Candida* spp., stehen zunehmend weniger Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung (Blaser 2016, Whaley et al. 2017).

Multiresistente Bakterien haben sich mit der Zeit an die Anwesenheit von Antibiotika angepasst und können Strategien entwickeln, um den Wirkmechanismus des Antibiotikums auszuhebeln. Diese sprechen dann nur noch schwach oder gar nicht auf die Arzneiwirkstoffe an (Blair et al. 2014). Zu den am häufigsten vorkommenden multiresistenten Bakterien gehören unter anderem multiresistente Streptokokken, wie beispielsweise Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE), wie beispielsweise *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) (Tacconelli et al. 2018), und *Extended-Spectrum*-Betalaktamasen (ESBL) bildende-Bakterien, wie zum Beispiel *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) und enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) (Paterson 2006). Multiresistente Bakterien kommen weltweit vorwiegend in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen vor (Goldmann und Huskins 1997, Farrington et al. 1999, Arnold et al. 2002, DeLisle und Perl 2003), aber auch inmitten der Gesellschaft (Rayner und Munckhof 2005) und in der Nahrungsmittelindustrie (Sáenz et al. 2004) sind multiresistente Bakterien vorzufinden. Die Neubildung von Resistenzen und die Verbreitung dieser sogenannten Superkeime kann derzeit durch konventionelle Therapien nicht unter Kontrolle gebracht werden. Zudem sind die Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Infektionen mit multiresistenten Bakterien besonders schwierig, langwierig, kostenintensiv und limitiert (Pittet et al. 1994, Hawkey 2008, Friedman et al. 2016).

Die Verhinderung der Ausbreitung von multiresistenten Mikroorganismen gilt daher als eines der wichtigsten Ziele der Medizin.

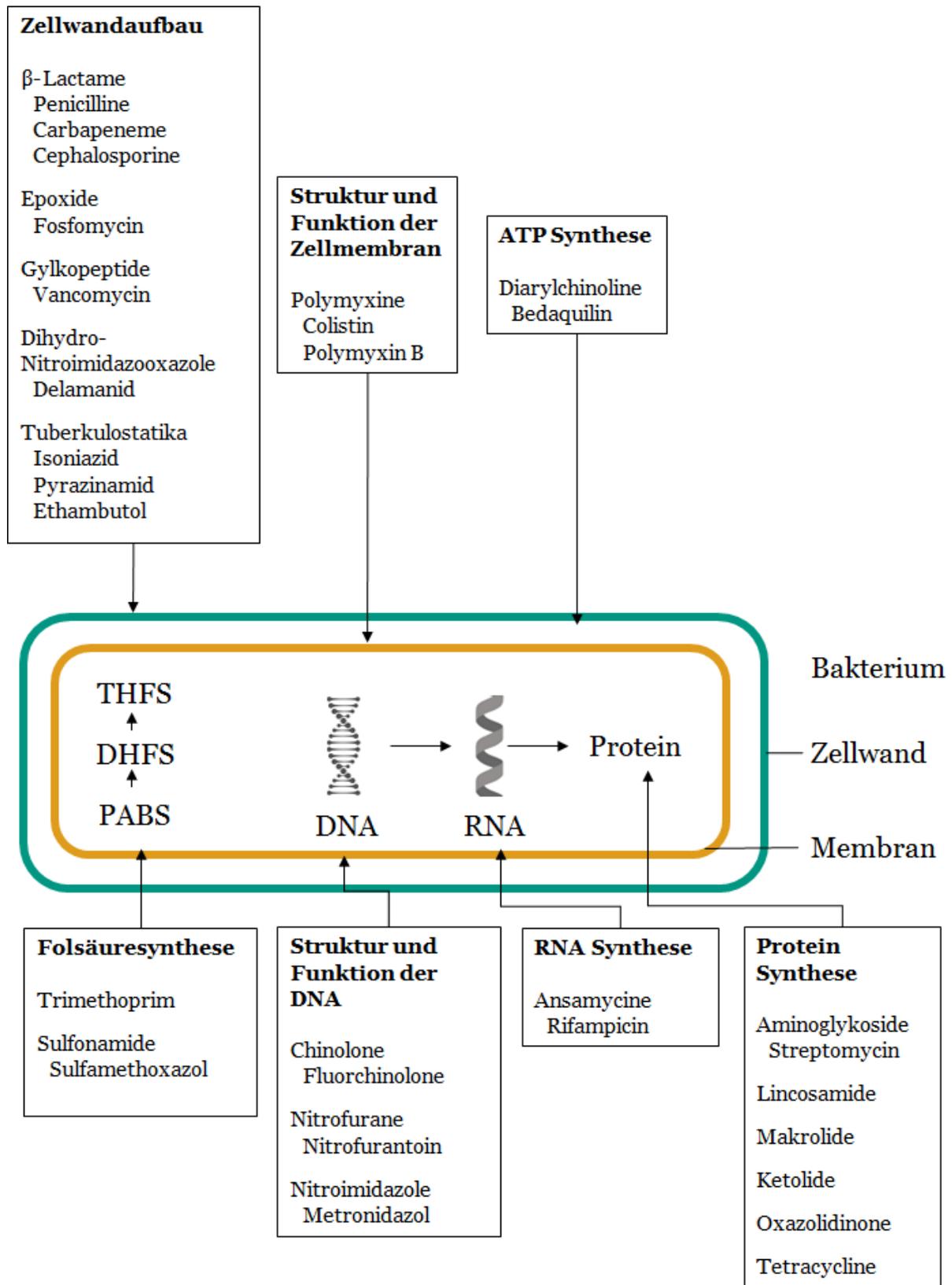
### 1.1 Antimikrobielle Resistenz

Bereits bei seiner Nobelpreiserede im Jahr 1945 warnte Alexander Fleming vor dem übermäßigen Gebrauch von Antibiotika (Spellberg und Gilbert 2014). Bakterien können gegen bestimmte Antibiotika eine intrinsische Resistenz bilden, aber auch eine chromosomale Genmutation und ein horizontaler Gentransfer (HGT) können zu einer Resistenzbildung führen (Blair et al. 2014). Antimikrobielle Resistenz (AMR) ist daher eine wachsende Gesundheitsgefahr für die Öffentlichkeit und im Allgemeinen weltweit besorgniserregend (WHO 2014). Neue Forschungsergebnisse zeigen zudem, dass nicht nur die übermäßige Verwendung von Antibiotika zu AMR führen kann, sondern dass auch der breite Einsatz von Bioziden und Schwermetallen zu der globalen Problematik beiträgt. Dabei kann dieser Konflikt nicht durch den weiteren Gebrauch von Antibiotika gelöst werden (Fang et al. 2016) und neue Lösungsansätze müssen entwickelt werden.

Infektionen mit multiresistenten Bakterien stellen eine der am häufigsten vorkommenden Todesursachen weltweit dar. Hochrechnungen zufolge sterben in Europa pro Jahr etwa 25.000 Menschen an Infektionen durch multiresistente Bakterien. Wirtschaftlich gesehen bedeutet dies eine jährliche Kostenbelastung in Europa von zusätzlich 1,5 Milliarden Euro (Davies et al. 2013). In den Vereinigten Staaten sterben jährlich 23.000 Menschen an multiresistenten Bakterien und mehr als 2 Millionen Menschen sind mit multiresistenten Bakterien infiziert (Hampton 2013, WHO 2014). Die *World Health Organisation* (WHO) veröffentlichte 2017 eine Prioritätenliste über antibiotikaresistente Bakterien zur Unterstützung der Forschung und Entwicklung neuer wirksamer Arzneistoffe. In dieser Liste wurden zwölf Bakterienstämme katalogisiert, darunter zählen unter anderem *E. coli*, *K. pneumoniae* und der Methicillin-resistente *S. aureus*, die eine besonders hohe Gefährdung für die menschliche Gesundheit darstellen. Die Liste beinhalten sowohl gram-negative als auch gram-positive Bakterienstämme. Mykobakterien, darunter *Mycobacterium tuberculosis*, wurden dabei nicht mit in die Risikoüberprüfung einbezogen, da dieser Bakterienstamm bereits weltweit als Höchststufe in der Prioritätenliste etabliert ist und dringend neue innovative Behandlungsmöglichkeiten benötigt werden (WHO 2017).

In den letzten 20 Jahren haben die *Food and Drug Administration* (FDA) und die *European Medicines Agency* (EMA) nur zwei neue Antibiotika-Klassen, die Lipopeptide und Oxazolidinone, gegen gram-positive Bakterien zugelassen (Luepke et al. 2017). Gegen gram-negative Bakterien wurde zuletzt Anfang der 60-iger Jahre die Wirkstoffklasse der Chinolone, wie beispielsweise das Reserveantibiotikum Ciprofloxacin, zugelassen (MacGowan und Andersson 2003, Tacconelli et al. 2018). Dabei sind Infektionen durch gram-negative Bakterien viel häufiger und zudem schwieriger zu behandeln (Vincent et al. 2009, Kaye und Pogue 2015, Zowawi et al. 2015). Im Jahr 2017 zeigten nur 15 von 44 potenziellen neuen Antibiotika in der Entwicklungspipeline eine antimikrobielle Aktivität gegen gram-negative Bakterien und nur 5 davon waren in der klinischen Phase 3 angelangt. Dabei basierten diese potenziellen Wirkstoffe auf bereits zugelassenen Antibiotikaklassen (PEW 2017, Tacconelli et al. 2018). 2018 befanden sich 42 potenzielle Wirkstoffe gegen bakterielle Infektionen in der Entwicklungspipeline. Lediglich 3 wurden davon zugelassen (PEW 2018). Eine Zusammenstellung der in dieser Doktorarbeit erwähnten Antibiotikaklassen und deren Angriffspunkte ist in Abbildung 1 dargestellt.

# 1. Einleitung



**Abbildung 1:** Auswahl von zugelassenen Antibiotika und deren Angriffspunkte in der bakteriellen Zelle (modifiziert nach Kapoor et al. 2017 und Etebu und Ariekpar 2016).

Wird die AMR sich so weiterentwickeln, werden bis 2050 weltweit etwa 10 Millionen Menschen an Infektionen durch multiresistente Bakterien sterben und somit die Anzahl an Todesopfern an Krebserkrankungen überschreiten. Zudem bedeutet dies ein Kostenaufkommen für die Behandlung von Infektionen mit multiresistenten Bakterien von bis zu 100 Milliarden US-Dollar (O'Neill 2015). Eine rasche Diagnostik und eine gezielte Therapie bei bakteriellen Infektionen könnten den Antibiotikakonsum reduzieren und den Prozess verlangsamen, dennoch werden neue Ansätze zur Behandlung resistenter Pathogene benötigt, da Bakterien weiterhin evolvieren.

### **1.1.1 Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus***

Einige multiresistente Bakterien haben in den letzten 10 Jahren einen hohen Bekanntheitsgrad erreicht (Hawkey 2008, Khara et al. 2015). Dazu gehört der weltweit verbreitete Methicillin-resistente Erreger *S. aureus* (MRSA). Die evolutionäre Herkunft von MRSA ist kaum geklärt. Zudem gibt es keine Aufzeichnungen über die exakte Anzahl an MRSA-Klonen oder den Verwandtschaftsgrad der MRSA-Erreger aus unterschiedlichen Ländern (Enright et al. 2002). MRSA sind Staphylokokken, die aus nicht beweglichen, nicht sporenbildenden gram-positiven, katalasepositiven Kokken bestehen und im mikroskopischen Präparat einzeln, als Paare, als kurze Ketten oder als unregelmäßige Anhäufungen auftreten (Rammelkamp und Maxon 1942, Elek 1959, Chambers 2001). Staphylokokken sind mit seltenen Ausnahmen fakultativ anaerob (Mandell 1974) und können die Haut (Otto 2010), sowie die Schleimhäute des Oropharynx und des Darms (Levy et al. 2005, Lakhundi und Zhang 2018) bei Menschen und Tieren besiedeln (Chesneau et al. 1993). Dabei sind Staphylokokken in geringer Anzahl im humanen Körper normal und harmlos. Als Infektionserreger sind Staphylokokken jedoch fakultativ pathogen (Sendi und Proctor 2009). Die größte Pathopotenzen der Staphylokokken besitzt *S. aureus*. *S. aureus* bedeutet übersetzt aus dem lateinischen golden und bezieht sich auf die goldgelbe Färbung der Kolonien nach Kultivierung auf einem Agar-Nährboden. Diese Färbung kommt durch die Bildung von Carotinoiden, die dem Bakterium als Antioxidantien zur Abwehr gegen reaktive Sauerstoffspezies dienen, die beispielsweise von Makrophagen bei einer Immunreaktion ausgeschüttet werden (Liu et al. 2005, Lan et al. 2010).

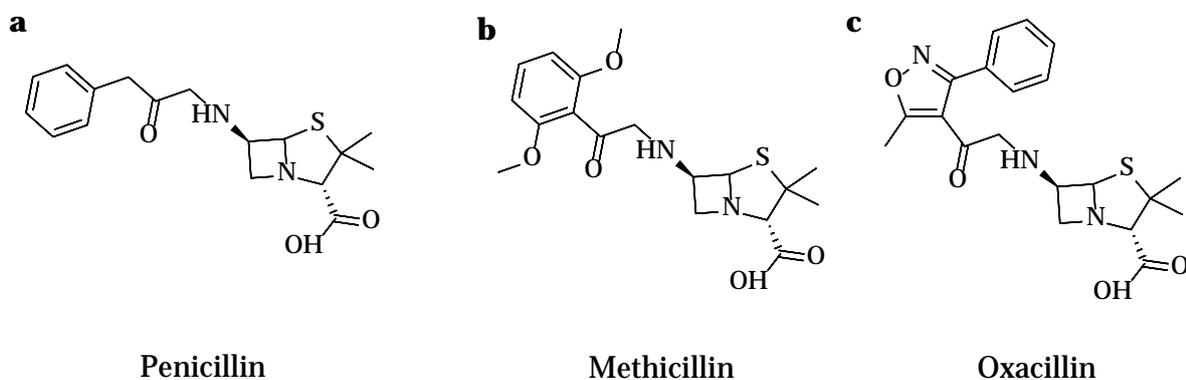
Die Behandlung von *S. aureus*-Infektionen ist durch die Resistenz gegen gleich mehrere Antibiotikaklassen besonders kompliziert. Bereits 2 Jahren nach der Einführung von Penicillin zeigte sich eine Resistenz gegen dieses Antibiotikum (Kirby 1944). Der Entwicklung des semisynthetischen Antibiotikums Methicillin Ende der

1950-er Jahre folgte eine ebenso rasche Resistenzbildung, welche im Jahr 1960 erstmalig beschrieben wurde (Jevons 1961). Infektionsausbrüche mit resistenten *S. aureus* treten dabei in Wellen auf (Chambers und Deleo 2009). Epidemien kamen ursprünglich meist in Europa vor. Erst in den 1980-er-Jahren entstanden neue, weltweit verbreitete multiresistente *S. aureus*-Erreger, die nun zunehmend zu einer Katastrophe führen (Lakhundi und Zhang 2018).

Der durchschnittliche Anteil an Infektionen in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen mit MRSA stieg von < 2% im Jahr 1990 auf > 20% im Jahr 2001 an (Kresken und Hafner 1999, von Eiff et al. 2000, Kresken et al. 2003). Gleichzeitig nimmt die AMR gegenüber neuen Antibiotika wie beispielsweise Chinolonen und Lincosamiden stetig zu (Kresken et al. 2004). Insgesamt zeigt jedoch die Methicillin-Resistenzrate von *S. aureus* in Europa von durchschnittlich 12,9% im Jahr 2014 zu 10,3% im Jahr 2016 eine rückläufige Tendenz. Besonders in Nordeuropa, wie Schweden, Finnland und Norwegen, liegt die Methicillin-Resistenzrate bei unter 5%. Hingegen steigt die Methicillin-Resistenzrate in südlichen europäischen Ländern stark an. So lag die Methicillin-Resistenzrate von *S. aureus*-Stämmen in Spanien, Griechenland, Malta und Zypern im Jahr 2017 zwischen 25% und 50% (EARS-Net 2018, RKI 2018). Dabei ist die Doppelresistenz gegen die Antibiotika Methicillin und Fluorchinolon noch häufiger vertreten als die ursprünglich auftretende Einzelresistenz (EARS-Net 2018).

Methicillin, das in den 60-er Jahre auch Celbenin genannt wurde, ist ein  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum und gehört zu den Penicillinase-stabilen Penicillinen (Çetin und Ang 1962, Baek et al. 2014) (Abbildung 2). Penicilline sind bakterizide antibiotische Verbindungen, welche direkt mit der Zellwandbiosynthese des Bakteriums interferieren (Lederberg 1957, Brown und Reynolds 1980, Etebu und Arikekpar 2016). Der bei der Interaktion geöffnete  $\beta$ -Laktam-Ring der Penicilline interagiert mit dem bakteriellen Enzym D-Alanin-Transpeptidase, welches für die Quervernetzung der Peptidoglycane in der Zellwand bei sich teilenden Bakterien verantwortlich ist. Dadurch kann das Bakterium keine vollständige Zellwand ausbilden, wird osmotisch instabil und stirbt (Waxman und Strominger 1983). Als Antibiotikum bei Infektionen mit *S. aureus* sind Penicillin und dessen Derivate gegenwärtig unbrauchbar (Chambers und Deleo 2009, Stryjewski und Corey 2014). Die Resistenzrate bei humanen *S. aureus*-Isolaten gegen  $\beta$ -Laktamase-empfindliche Penicilline liegt heutzutage bei über 90% (Grema 2015, Peacock und Paterson 2015).

Die Resistenz gegen Methicillin erlangte *S. aureus* durch den Einbau eines zusätzlichen DNA-Fragments in das bakterielle Genom, das sogenannte *Staphylococcus* cassette chromosome *mec* (SCC*mec*). Bis heute wurden 13 unterschiedliche SCC*mec*-Kassetten Typen identifiziert (Lakhundi und Zhang 2018). Diese Kassetten bestehen aus der Methicillin-Resistenzdeterminante *mec*, welche aus dem Gen *mecA* und regulatorischen Elementen *mecI* sowie *mecR1* gebildet wird (Hiramatsu et al. 1992, Katayama et al. 2000). Das Gen *mecA* kodiert für das mutierte Penicillinbindepotein PBP2a oder PBP', welches eine niedrige Affinität gegen die meisten semisynthetischen Penicilline, wie Methicillin oder Oxacillin aber auch gegen Cepheme, eine Subgruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, besitzt (Hartman und Tomasz 1984, Reynolds und Brown 1985, Utsui und Yokota 1985). Neben *mecA* wurden in den letzten Jahren noch 3 weitere Homologe, *mecB* (Becker et al. 2018), *mecC* (Ito et al. 2012) und *mecD* (Schwendener et al. 2017) entdeckt. Diese zusätzliche chromosomale SCC*mec*-Kassette fehlt in Methicillin-sensiblen Stämmen. Sie ist weit verbreitet (Suzuki et al. 1992) und stellt ein mobiles genetisches Element dar, welches über horizontalen Gentransfer übertragen werden kann (Hurlimann-Dalel et al. 1992, Musser und Kapur 1992, Lindsay et al. 2006).



**Abbildung 2:** Molekülstrukturen von Penicillin (a), Methicillin (b) und Oxacillin (c) (modifiziert nach (Citri und Zyk 1965, Fishovitz et al. 2014)).

*S. aureus* besitzt noch weitere Schutzmechanismen, um sich vor dem humanen Immunsystem zu schützen (Thomer et al. 2016). Unter anderem gehört dazu die Expression von zwei unterschiedlichen *cell wall-anchored* (CWA) Proteinen, FnBPA und FnBPB, welche an das Glykoprotein Fibronectin des Wirts binden (Foster et al. 2014, Foster 2016). Die C-terminale Domäne umfasst eine Tandem-Sequenz, die durch

einen  $\beta$ -Zipper-Mechanismus an die *N*-terminalen Typ I-Module von Fibronectin bindet (Wann et al. 2000, Schwarz-Linek et al. 2003). Dies verursacht eine allosterische Aktivierung der Integrin-Bindedomäne und erlaubt dem Bakterium, an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin der Wirtszelle zu binden und so über Phagozytose aufgenommen zu werden. Dadurch ist es *S. aureus* möglich, im Wirt zu überdauern und sich weiterhin im Wirt zu vermehren (Schwarz-Linek et al. 2006, Hymes und Klaenhammer 2016). *S. aureus* hat außerdem eine Strategie entwickelt, sich vor Antikörpern zu schützen. Die Koagulase und der Clumping-Faktor A bewirken eine lokale Gerinnung von Fibrin (Tager 1956). Dadurch entsteht um das Bakterium eine Fibrinwand (Hair et al. 2010), die eine Erkennung durch Antikörper nicht mehr möglich macht. Zudem kann so das Bakterium nicht mehr durch Phagozytose von Immunzellen aufgenommen und verdaut werden (Zapotoczna et al. 2015, Thomer et al. 2016).

### 1.1.2 *Escherichia coli*

*E. coli* gehört zu den gram-negativen Bakterien und kommt im normalen Mikrobiom bei Menschen und Tieren vor (Wellington et al. 2013). Bei einem Ungleichgewicht kann es jedoch zu Niereninfektionen (Hull et al. 1981), Blutvergiftungen (Kim et al. 2002), intra-abdominalen Infektionen, wie Peritonitis (Onderdonk et al. 1974), Neugeborenenmeningitis (Robbins et al. 1974) und Lebensmittelvergiftungen kommen (Manges und Johnson 2012). In der EU wurde im Jahr 2017 bei mehr als der Hälfte aller *E. coli*-Isolate eine Resistenz gegen mindestens eine Antibiotikagruppe, wie beispielsweise Aminopenicilline, Fluorchinolone, Cephalosporine der 3. Generation, Aminoglykoside und Carbapeneme festgestellt (EARS-Net 2018). Eine Resistenz bei *E. coli* entwickelt sich entweder durch Mutation, wie beispielsweise gegen Fluorchinolone, oder durch Erwerb, beispielsweise durch HGT von mobilen Gensequenzen, welche beispielweise für ESBLs kodieren. ESBLs sind Enzyme, die Bakterien eine Resistenz gegen nahezu alle  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, wie Cephalosporine, verleihen, und tauchen meist mit anderen Resistenzmechanismen auf (El-Jade et al. 2016). Gegen Infektionen mit ESBLs-bildende Bakterien kann jedoch das *last-line*-Reserveantibiotikum Carbapenem eingesetzt werden (WHO 2014). Bei Infektionen mit Carbapenem-resistenten Enterobacteriaceae (CRE) gilt die Therapie als besonders schwierig, da CRE-Bakterien auf alle herkömmlichen Antibiotika, inklusive des Reserveantibiotikums Carbapenem, nicht ansprechen (Gross 2013, Sengupta et al. 2013). Das sogenannte Carbapenemase-Enzym New Delhi metallo-beta-Laktamase (NDM-1) verleiht dabei *E. coli* und anderen gram-negative

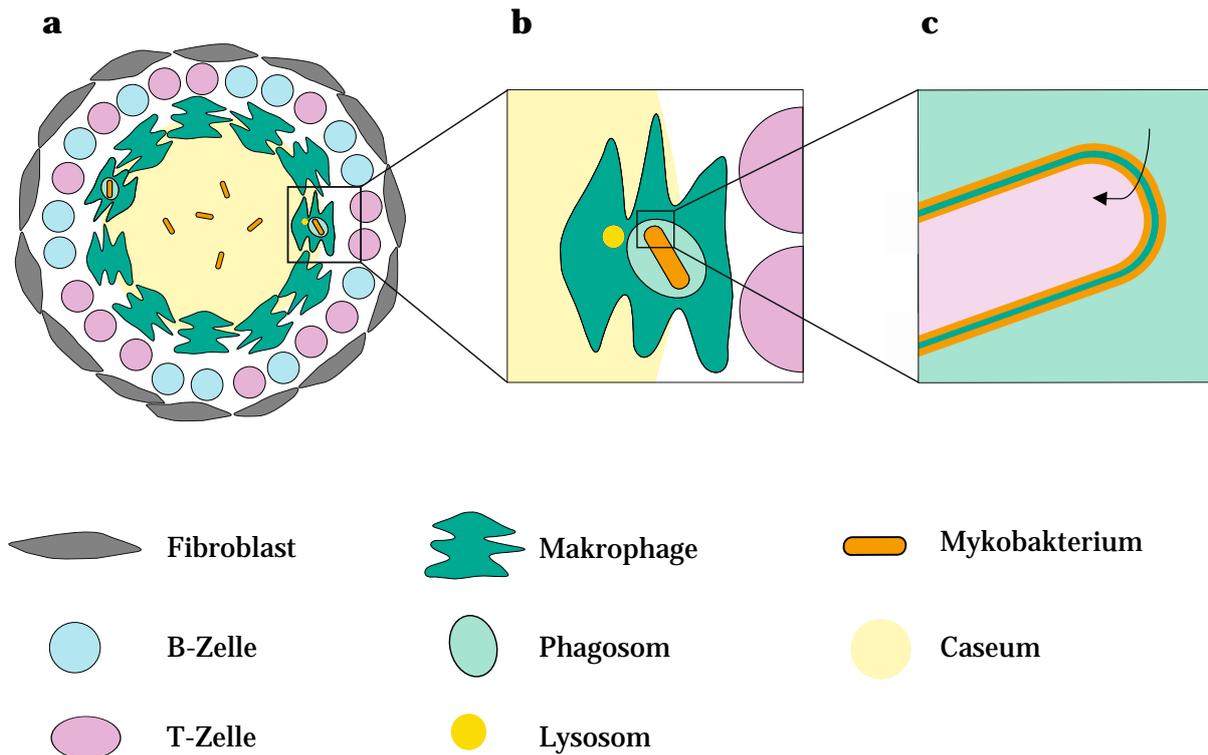
Bakterien, wie *K. pneumoniae*, eine Resistenz gegen alle  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Sengupta et al. 2013). Zudem können die Gene für Carbapenemasen unter Enterobacteriaceae ausgetauscht werden (Peirano et al. 2014). Zwar kommen CRE sehr selten vor (EARS-Net 2018), jedoch führen die hohe Infektionsrate mit ESBLs-Bakterien und der damit verbundene Konsum von Carbapenem Kontraindikation auf den selektiven Druck auf und könnten so die Verbreitung von CRE begünstigen (Martínez et al. 2006, Schwaber und Carmeli 2008, EARS-Net 2018). Die WHO setzte daher im Jahr 2017 Enterobacteriaceae auf die höchste Dringlichkeitsstufe in der Prioritätenliste gegen den Kampf gegen multiresistente Bakterien (WHO 2017).

### **1.1.3 *Klebsiella pneumoniae***

Das gram-negative CRE Bakterium *K. pneumoniae* kommt im Darmtrakt, auf der Haut, in der Nase und im Rachen von gesunden Menschen vor (Podschun und Ullmann 1998, Holt et al. 2015). Das Pathogen kann schwere Infektionen, wie neonatale Sepsen, Meningitis (Hill et al. 1974), Pneumonie (Jones 2010), sowie Wund-, Gewebe- (Chang et al. 2008), Leber- (Shon et al. 2013) und Harnwegsinfektionen (Jarvis et al. 1985) verursachen. Pro Jahr sterben mindestens 600 Menschen allein in den USA an Infektionen mit CRE, wie *K. pneumoniae* (CDC 2013). Mehr als 30% aller *Klebsiella*-Isolate sind resistent gegen mehr als ein Antibiotikum (EARS-Net 2018). Ähnlich wie bei *E. coli* erlangt *K. pneumoniae* die Multiresistenz durch HGT von mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden, Transposons und Introns (Vaidya et al. 2011, Arduino et al. 2012). Allerdings besitzt *K. pneumoniae* im Kontrast zu *E. coli* ein chromosomales SHV-1  $\beta$ -Laktamase-Resistenzgen (Chaves et al. 2001), das dem Bakterium eine Resistenz gegen alle Penicilline, wie Ampicillin und Amoxicillin, verleiht (WHO 2014). *K. pneumoniae* kommt meist mit einer Multiresistenz gegen weitere global verbreitete oral verabreichte Antibiotika, wie Cotrimoxazole und Fluorchinolone (Ciprofloxacin), vor. Dies hat zur Folge, dass nur wenige orale Therapien gegen *Klebsiella* Infektionen auf dem Markt sind (WHO 2014). Derzeit werden *Klebsiella*-Infektionen mit der Reserveantibiotikaklasse der Carbapeneme behandelt (Chen und Kreiswirth 2018) (Abbildung 1). Jedoch sind bereits seit mehreren Jahren Carbapenem-resistente *Klebsiella* bekannt. Gegen diese sogenannten panresistenten (lat. pan=gesamt, ganz) *Klebsiella* stehen derzeit keine klinisch effektiven Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung (Nordmann et al. 2009).

### **1.1.4 *Mycobacterium tuberculosis***

Tuberkulose (TB) wird durch das Bakterium *M. tuberculosis* (Mtb) verursacht und betrifft bevorzugt die Lunge, kann aber auch andere Organe befallen (Auerbach 1944, McMurray 2001). In den meisten Fällen ist TB mit den verfügbaren *first-line*-Antibiotika Isoniazid und Rifampicin behandel- und heilbar. Allerdings können Mtb-Stämme gegen eines oder mehrere dieser *first-line* Antibiotika resistent sein (CDC 2013). 2016 starben 1,3 Millionen Menschen an TB und circa 600 000 Menschen sind mit resistenten Tuberkulosebakterien infiziert. Über die Hälfte der TB-Infektionen kommen in Indien, Indonesien, China, Philippinen und Pakistan vor. Lediglich 3% aller TB-Infektionen befinden sich Europa (WHO 2017). Trotz der geringen Rate in westlichen Ländern, stellt TB trotzdem eine große Gefahr dar. Zwar gibt es immer mehr Präventivmaßnahmen, jedoch werden diese von den meisten Menschen in den Ballungsgebieten nicht angenommen. Dadurch ist eine Eindämmung an TB-Infektionen nicht abzusehen. Ein Drittel der Weltbevölkerung trägt eine asymptomatisch latente Form von Mtb in sich. Dabei ist die latente TB nicht infektiös, trägt aber das lebenslange Risiko mit sich, zu einem unbestimmten Zeitpunkt an aktiver TB zu erkranken (Koul et al. 2011). Eine latente Form ist derzeit nicht bekämpfbar, da bisherige Wirkstoffe den Zielort für die Wirkentfaltung nicht erreichen können (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung einer latenten Mtb-Erkrankung. Nach Verabreichung muss der potenzielle Wirkstoff das Granulom in der Lunge erreichen (a). Um mit den intrazellulären Mykobakterien zu interagieren, muss der Wirkstoff die Plasmamembran des Makrophagen und die Phagosomenmembran überwinden (b). Schließlich kann der Wirkstoff mit der Zellhülle der Mykobakterien interagiert (c) (modifiziert nach (Gutsmann 2016)).

Auf die multiresistente TB (MDR-TB) folgte die extrem multiresistente TB (XDR-TB) (WHO 2010). XDR-TB wird von Bakterien verursacht, die neben Resistenz gegen Rifampicin und Isoniazid auch Resistenzen gegen Fluorchinolone und gegen mindestens ein injizierbares *second-line*-Tuberkuloseantibiotikum, wie Aminoglykoside, besitzt. MDR-TB und XDR-TB sind aufgrund von fehlenden Therapiemöglichkeiten, hohen medizinischen Kosten und einer hohen Sterblichkeitsrate besonders besorgniserregend (Sacchetti et al. 2008). Auch neuere zugelassene MDR-TB und XDR-TB Antibiotika, wie Bedaquilin und Delamanid, zeigen eine Resistenzbildung bei Mtb (Bloemberg et al. 2015). Zudem haben diese neuen Antibiotika schwere Nebenwirkungen, wie beispielsweise kardiovaskuläre Komplikationen (Fox und Menzies 2013, Esposito et al. 2015). Seit der FDA-Zulassung von Bedaquilin (Koh et al. 2016) im Jahr 2012 und der Zulassung von Delamanid im Jahr 2014 (Gler et al. 2012, Skripconoka et al. 2013) wurden keine neuen Antibiotika gegen TB zugelassen (WHO 2017). In Anbetracht der beunruhigenden Tatsache, dass

vor den zuletzt zugelassenen TB-Antibiotika Bedaquilin und Delamanid Rifampicin, die vor mehr als 50 Jahren zugelassen wurden (Koul et al. 2011, Koh et al. 2016), und dass nur sehr wenige neue Wirkstoffe in die klinischen Studien aufgenommen werden (Dover und Coxon 2011), werden dringend neue Molekülklassen für den Kampf gegen TB benötigt.

TB-Infektionen werden über mindestens sechs Monate mit einer Kombination von vier Wirkstoffen-Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid (Abbildung 1) behandelt und verursachen Kosten von circa 40 US-Dollar pro Patient (Glickman und Jacobs 2001, WHO 2017). MDR-TB wird über mindestens 20 Monate lang mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Antibiotika behandelt, die weniger effektiv sind und mehr Nebenwirkungen mit sich tragen. Die Kosten hierfür betragen circa 2000-5000 USD pro Patient (WHO 2017).

Die vor über 100 Jahren entwickelte TB-Schutzimpfung Bacille Calmette-Guerin (BCG) wird immer noch flächendeckend verwendet und schützt vor TB bei Kindern (WHO 2017). Allerdings gibt es keinen Impfschutz gegen die pulmonale adulte TB, weder vor noch nach der TB-Infektion (Méndez-Samperio 2008).

### **1.1.5 *Candida* Spezies**

*Candida* spp. existiert beim menschlichen Körper auf Haut, Mund und im Magen-Darm-Trakt. Dabei werden das Wachstum und die Ausbreitung von *Candida* spp. durch die koexistierende mikrobielle Flora, intakte epitheliale Barrieren und Abwehrkräfte des angeborenen Immunsystems unter Kontrolle gehalten (Calderone und Clancy 2012). *Candida* spp. kann jedoch bei einem Ungleichgewicht der Flora verschiedene Erkrankungen verursachen. Dazu gehören unter anderem neben oberflächlichen Infektionen der Haut, Haare, Nägel und Schleimhäute auch lebensbedrohliche systemische Infektionen (Kontoyiannis und Lewis 2002, Berkow und Lockhart 2017).

In den letzten zehn Jahren wurde in den Krankenhäusern in den USA und Europa ein fünf-mal höheres Vorkommen an Candidiasis verzeichnet. *Candida* spp. ist somit das fünfthäufigste Isolat bei nosokomialen Blutinfektionen und die häufigste Ursache für einen fungalen, septischen Schock (Bassetti et al. 2014). Daher ist die systemische Candidiasis eine weltweit verbreitete Pilzinfektion mit hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten bei verschiedenen Patientengruppen, insbesondere bei Intensivstationspatienten (Dupont et al. 2017). Etwa 92-95% aller *Candida*-Infektionen sind auf fünf häufig vorkommende Spezies zurückzuführen:

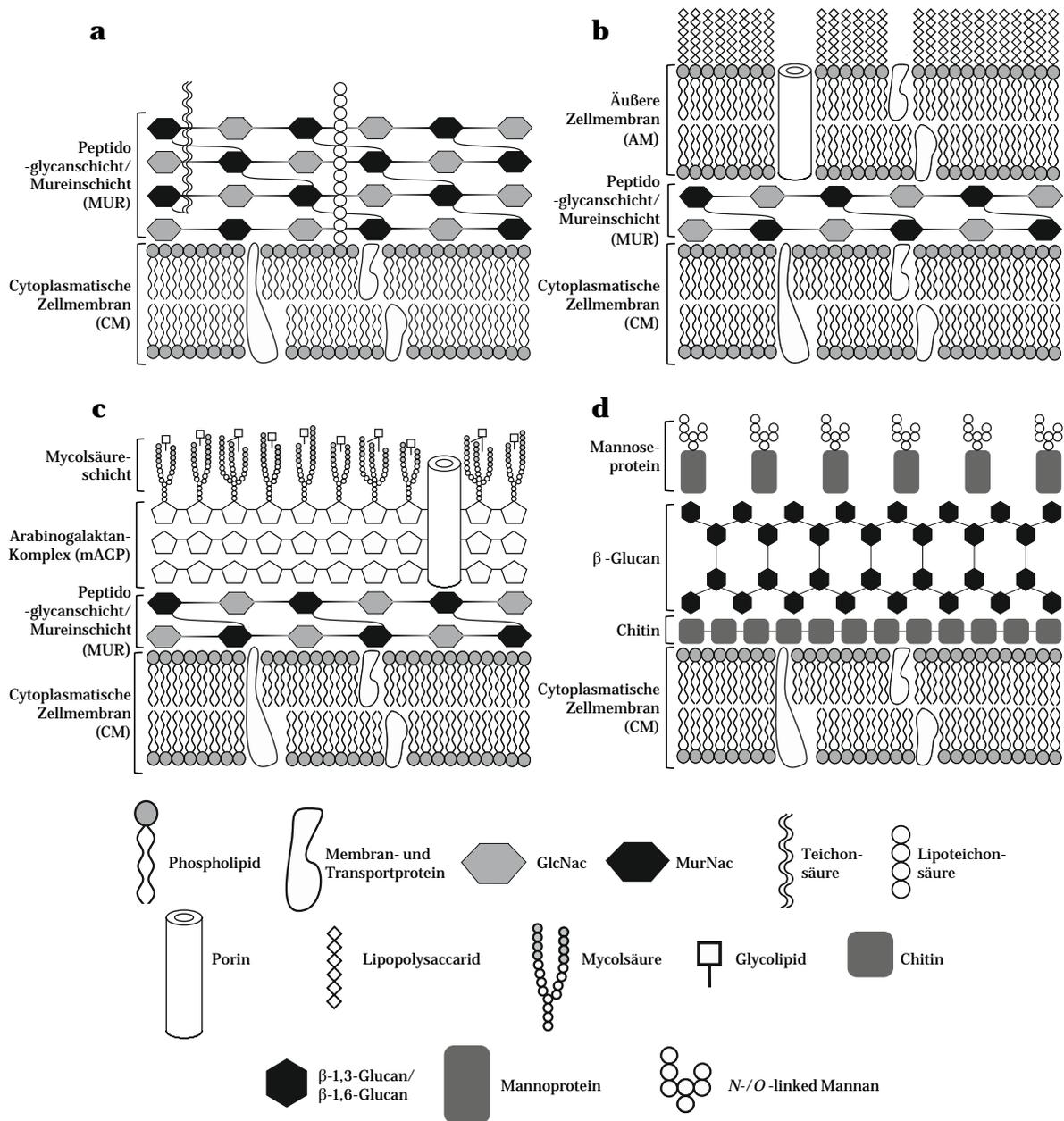
*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, und *Candida krusei*. In den vergangenen Jahrzehnten war *C. albicans* für >50% aller *Candida* Infektionen verantwortlich. Heutzutage hat sich die Verteilung der *Candida* Infektionen auch auf non-*albicans Candida* (NCAC)-Spezies relativiert (Cleveland et al. 2015).

Obwohl bekannt ist, dass die Resistenzbildung gegen Pilze die Gesundheitssysteme insbesondere in den Industrieländern erheblich belastet, ist das weltweite Ausmaß der Antifungizid-Resistenz von *Candida* nicht bekannt (WHO 2014). Eines der meistverschriebenen Medikamente gegen *Candida* spp.-Infektionen beinhaltet Azole, wie das Triazol-Antimykotikum Fluconazol (Pfaller et al. 2010). Azole hemmen das Cytochrom-P450-Enzym 14 $\alpha$ -Demethylase, welches von ERG11 im Ergosterol-Biosyntheseweg kodiert wird (Hitchcock 1991). Dadurch entstehen methylierte Sterole, die an der Zellmembran akkumulieren und so das Pilzwachstum stoppen (Heimark et al. 2002). Die Resistenz gegen Fluconazol ist je nach Land und Art sehr unterschiedlich (Leroy et al. 2009). Mehrere Mechanismen wurden bis heute identifiziert, wie beispielsweise die Manipulation des Ergosterol-Biosynthesewegs, Veränderungen der Ploidie und der Verlust der Heterozygotität (Berkow und Lockhart 2017). Zusätzlich ist Fluconazol eher fungistatisch als fungizid und bietet somit die Möglichkeit, eine Resistenz in Gegenwart dieses Antimykotikums zu entwickeln (Cleveland et al. 2012, Pfaller et al. 2015). In einigen Ländern zeichnet sich bereits eine Resistenz gegen Echinocandine, einer neuen Klasse von Antifungiziden, ab, die das pilzspezifische Enzym Glucansynthase inhibieren, das wiederum für die Biosynthese eines Hauptzellwandpolymers verantwortlich ist (Perlin 2015).

### **1.2 Die bakterielle Zellwand**

Der Naturwissenschaftler van Leeuwenhoek beschrieb 1676 zum ersten Mal die Existenz von Mikroorganismen, insbesondere die der Bakterien (Dobell 1923, Porter 1976). Bakterien gehören zu den Prokaryoten und unterscheiden sich unter anderem von den Eukaryoten durch ihren unterschiedlichen Bau der Zellwand. Bei Bakterien kann zudem in gram-positiv (Abbildung 4 a), gram-negativ (Abbildung 4 b) und in eine mykobakterielle Zellwand (Abbildung 4 c) unterschieden werden.

# 1. Einleitung



**Abbildung 4:** Vereinfachte schematische Darstellung des Zellaufbaus von gram-positiven Bakterien (a), gram-negativen Bakterien (b), Mykobakterien (c) und Pilzen (d). (a): Gram-positive Bakterien besitzen eine cytoplasmatische Zellmembran (CM), die das Cytoplasma (CY) umgibt, und eine mehrschichtige Mureinschicht (MUR). Teichonsäure (TA) und Lipoteichonsäure (WLA) sind kovalent an die Peptidoglycansicht beziehungsweise an die innere Zellmembran gebunden. (b) Gram-negative Bakterien besitzen neben der CM, der MUR, noch eine weitere äußere Zellmembran aus Lipopolysacchariden. (c) Die Zellmembran bei Mykobakterien ist wie bei gram-positiven und gram-negativen Bakterien aus einer cytoplasmatischen Lipiddoppelschicht aufgebaut. Auf eine einschichtige Peptidoglycansicht folgt ein Arabinogalaktan-Komplex (mAGP), der mit Mycolsäuren verestert ist. (d) Ebenfalls wie bei Bakterien besitzt die Pilzzellwand eine Doppellipidschicht aus Phospholipiden. Danach folgen Membranen aus Chitin,  $\beta$ -Glucan und Mannan (modifiziert nach Brown et al. 2015).

Die Zellwände gram-positiver und gram-negativer Bakterien unterscheiden sich maßgeblich durch das Vorhandensein einer weiteren äußeren Membran bei

gram-negativen Bakterien (Kapoor et al. 2017). Die Benennung in gram-positiv und gram-negativ beruht auf der Färbemethode nach Hans Christian Gram, die im Jahr 1884 entwickelt wurde (Moyes et al. 2009). Bakterien werden dabei mit einem basischen Farbstoff, wie beispielsweise Kristallviolett, und anschließender Nachbehandlung mit Lugolscher Lösung eingefärbt, wodurch ein Iod-Kaliumiodid-Charge-Transfer-Farbstoffkomplex entsteht. Der anschließende Waschschrift mit Alkohol entfärbt gram-negative Bakterien. Gram-positive Bakterien werden aufgrund der Interaktion des Iod-Kaliumiodid Komplexes mit der Mureinsäure-Peptidoglykanschicht hingegen durch den Waschschrift nicht entfärbt und erscheinen violett (Hucker und Conn 1923).

Alle Bakterien besitzen ein Peptidoglykanschicht, die aus einem flexiblen, hochmolekularen Netzwerk besteht, das dem Bakterium seine Form und osmotische Stabilität verleiht (Lugtenberg und Van Alphen 1983, Shockman und Barrett 1983, Beveridge 1999, Neuhaus und Baddiley 2003). Peptidoglykan, auch Murein (Latein murus = Mauer, Wall, Schutz) genannt, ist ein Heteropolymer, das aus den Bausteinen *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) und *N*-Acetylglucosaminsäure (GlcNAc) besteht, die in alternierender Folge  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpft sind (Brennan 2003). Diese Bausteine sind untereinander durch bakterienspezifische Aminosäuren, wie beispielsweise L-Alanin, peptidisch meist über tetra-Peptidketten verbunden (Warth und Strominger 1969). Bei den gram-negativen Bakterien ist die Mureinschicht einschichtig und damit viel dünner als bei gram-positiven Bakterien (Vollmer et al. 2008). Die Peptidoglykanschicht wird auch als Mureinsacculus bezeichnet, da sie ein dreidimensionales Makromolekül darstellt, welche die gesamte Zelloberfläche bedeckt (Höltje 1998).

Charakteristisch für viele gram-positive Bakterien, wie beispielsweise *S. aureus*, ist das Vorhandensein von Teichonsäuren (TA), die kovalent an das Peptidoglykan gebunden ist, und Lipoteichonsäure (WLA), die kovalent an die Phospholipidschicht gebunden ist (Morath et al. 2005). Hierbei handelt es um Ketten aus Glycerin- oder Ribitmoleküle, die über Phosphatbrücken miteinander verestert sind. Die Funktion von TA und WLA ist noch nicht vollständig untersucht. Bisherige Untersuchungen zeigen unter anderem, dass TA und WLA eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Bakterium und Wirtzelle spielen (Swoboda et al. 2010).

Gram-negative Bakterien besitzen zusätzlich zur Mureinschicht noch eine äußere, ebenfalls aus zwei Schichten bestehende Membran, die mit wassergefüllten Proteinporen, sogenannten Porinen, durchsetzt ist (Beveridge 1999, Pagès et al. 2008).

Diese äußere Membran ist asymmetrisch aufgebaut. Die Innenseite wird durch die gleichen Phospholipide gebildet, die in der cytoplasmatischen Membran vorkommen, während die Außenseite durch ein besonderes Membranphosphoglykolipid, das Lipopolysaccharid, stabilisiert wird. Diese zusätzliche Membran, die nicht nur aus Phospholipiden, sondern auch aus Polysacchariden und Proteinen besteht, stellt eine zusätzliche Penetrationsbarriere dar, die den gram-negativen Bakterien im Gegensatz zu den gram-positiven Bakterien einen besonders wirksamen Schutz vor hydrolytischen Enzymen, wie beispielsweise Lysozym, verleiht und darüber hinaus auch die Wirkung von Antibiotika beeinflusst und begrenzt (Costerton et al. 1974, Kulp und Kuehn 2010, Schertzer und Whiteley 2012, Brown et al. 2015).

Die Zellwand der Mykobakterien ist äußerst komplex aufgebaut und kann in drei Schichten unterteilt werden: die Plasmamembran, die Zellwand und die Kapsel (Daffé und Draper 1997). Die mykobakterielle Zellwand ähnelt durch den Aufbau und die Struktur der der gram-positiven Bakterien. Dennoch sind Mykobakterien weder gram-positiven noch gram-negativen Bakterien zuzuordnen (Draper 1982).

Die cytoplasmatische Zellmembran ist, wie bei gram-positiven und gram-negativen Bakterien, eine klassische aus amphipathischen, polaren Phospholipiden und Phosphatidylinositolmannosiden bestehende Lipiddoppelschicht (Minnikin et al. 1982, Draper 1998). Die netzartige, flexible Peptidoglykanschicht ist im Vergleich zu gram-positiven Bakterien einschichtig aufgebaut. Die mykobakterielle Zellwand besteht hauptsächlich aus dem Arabinogalaktan-Komplex (mAGP) zusammen mit der Mykolsäureschicht (Chatterjee et al. 1991). Dabei ist mAGP ein Makromolekül aus Arabinose und Galaktan, das kovalent an die Peptidoglycanschicht gebunden und mit unterschiedlichen Mykolsäuren verestert ist (McNeil et al. 1991, McNeil und Brennan 1991). Mykolsäuren kommen in vielen *Mycobacteria* vor und sind hochmolekulare, langkettige  $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -hydroxy-Fettsäuren, die je nach Mykobakterium sehr vielfältig sind (Minnikin et al. 1982). Glykolipide bilden den Abschluss der mykobakteriellen Zellwand und sind nicht-kovalent mit den Mykolsäuren verbunden (Goren und Brennan 1979). Ein Beispiel hierfür ist Trehalose-6,6'-dimykolat (TDM), auch *cord factor* genannt. Dieses spielt eine Rolle bei der Inhibierung der Leukozytenmigration und ist dabei bei der Pathogenese in TB von wichtiger Bedeutung (Goren und Brennan 1979, Rastogi und David 1988). Insgesamt besitzt die mykobakterielle Zellwand einen hohen Lipidgehalt und ist aufgrund dessen besonders säureresistent und bietet zudem eine hohe Permeabilitätsbarriere, vor allem gegenüber vielen Antibiotika (Chatterjee 1997).

Die Zellwand von Pilzen, wie *Candida* spp., unterscheidet sich stark von dem Aufbau bakterieller Zellwände (Abbildung 4 d) (Bowman und Free 2006). Sie besteht zum größten Teil aus Chitin, Glucan, Mannan und Glykoproteinen (Klis 1994). Dabei ist die Glykoproteinschicht aus  $\beta$ -1,3-Glucan und  $\beta$ -1,6-Glucan aufgebaut und ist mit *N*- und *O*-verlinkten Oligosacchariden (Mannan) verestert. Die Zellwand der Pilze variiert je nach Art. So besitzen manche Pilze auch Melanin in der Zellwand. Ob dieses Molekül permanent vorhanden ist oder nur vorübergehend ist, ist nicht bekannt (Free 2013).

### **1.3 Peptide in der pharmakologischen Forschung**

Neben vielen neuartigen Strukturen und antimikrobiellen Naturstoffen stehen auch vor allem kleine kationische Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften im Fokus der gegenwärtigen Antibiotikaforschung. Sie sind in der Lage, eine große Bandbreite an pharmakologischen und pharmakodynamischen Eigenschaften abzudecken. Zu diesen Eigenschaften gehören unter anderem die endocytotische Aufnahme (Lugtenberg und Van Alphen 1983) mit hoher Importeffizienz in diverse Zelllinien (Hoyer et al. 2012), die geringe Zytotoxizität, die gute Löslichkeit in wässrigen Lösungen, die kurze Kettenlänge (Zhu et al. 2019) sowie ein einfacher synthetischer Zugang über Festphasensynthese (Zuckermann et al. 1992). Hierzu gehören unter anderem die zellpenetrierende Peptide (CPPs) (Ryser und Shen 1978, Lindgren et al. 2000) und die antimikrobiellen Peptide (AMPs) (Khara et al. 2015). CPPs können die Plasmamembran diverser Zellen passieren und dabei sogar Moleküle, die ein Vielfaches ihrer Größe besitzen, transportieren (Snyder und Dowdy 2004, Vives 2005, Zorko und Langel 2005). Diese Sequenzen haben sich seit den späten achtziger Jahren als vielversprechende Vektoren für einen verbesserten Transport einer Vielzahl von Molekülen erwiesen (Dietz und Bahr 2004, Snyder und Dowdy 2004). Als Geburtsstunde der CPPs wird die Entdeckung der zellpenetrierenden Eigenschaften des HIV-1 *transcription activating* Proteins (HIV-1 Tat) angesehen, die unabhängig voneinander von zwei Gruppen im Jahr 1988 gemacht wurde (Frankel und Pabo 1988, Green und Loewenstein 1988).

AMPs, die auch *host defense*-Peptide genannt werden, sind kleine (<40 Aminosäuren (aa)), amphiphile, meist kationische Polypeptide und zeigen eine breite antibakterielle Aktivität gegen gram-positive und gram-negative Bakterien (Zaslhoff 2002, Brogden 2005, Hancock und Sahl 2006). Das einzige bekannte humane AMP ist das Cathelicidin LL-37. Zusätzlich zu dem antibakteriellen Effekt, weist LL-37 eine

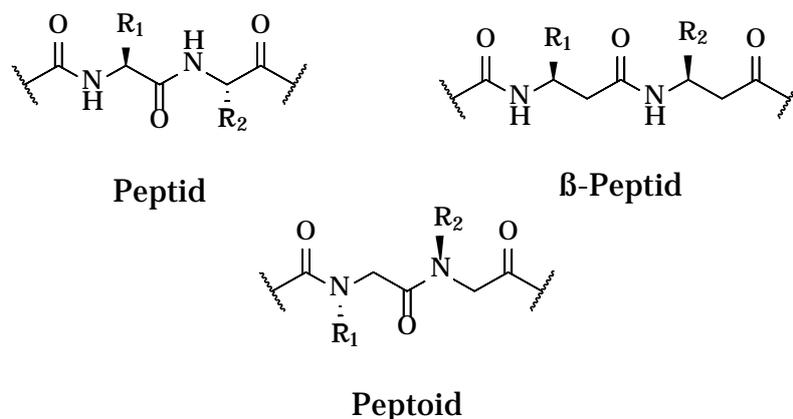
antifungale und antivirale Aktivität auf und spielt zudem eine Rolle in der Immunmodulation (Burton und Steel 2009, Vandamme et al. 2012). Ein weiteres AMP kommt aus der Klasse der Magainine. Magainin ist ein 23-aa langes Peptid aus der Haut des afrikanischen Frosches *Xenopus laevis* und besitzt neben der bakteriziden Wirkung auch eine tumorizide Aktivität (Ostroumova et al. 2015). Magainine, wie beispielsweise Pexiganan, sind seit über 10 Jahren in klinischen Studien, verfehlten aber bisher die Bedingungen für eine Zulassung (Halliday et al. 2006, Pace und Yang 2006). Das im Bienengift, wie beispielsweise von der Honigbiene *Apis mellifera*, vorkommende kationische Polypeptid Melittin ist ebenfalls ein AMP (Blondelle und Houghten 1991). Ebenfalls wie Magainin ist Melittin hämolytisch aktiv und kann nicht als antibiotisches Mittel zugelassen werden (Asthana et al. 2004).

Aufgrund der antimikrobiellen Wirkung von natürlich vorkommenden AMPs werden die Strukturen der AMPs als Vorlage für neue antimikrobiell aktive Wirkstoffe genutzt. Ein Beispiel für dieses Molekülmimikry ist Polymyxin B und Colistin (Polymyxin E) (Tsubery et al. 2000, Saravolatz et al. 2005). Polymyxine sind gegen gram-negative, nicht jedoch gegen gram-positive Bakterien oder *Candida* spp. aktiv (Vaara 2009). Sie wurden in den 1970-er Jahren vom Markt ausgeschlossen, da sie stark nephrotoxisch und neurotoxisch sind. Die aktuelle Flut an multiresistenten Erregern brachte Polymyxine jedoch wieder zurück auf den Markt als letzte Instanz, um schwere Infektionen mit XDR gram-negativen Bakterien zu therapieren (Falagas und Kasiakou 2006, Li et al. 2006, Zavascki et al. 2007, Landman et al. 2008, Pastewski et al. 2008). Polymyxine sind weiterhin aufgrund der stark kationischen Eigenschaft stark toxisch und stellen daher keine *first-line*-Antibiotika dar. Generell sind AMPs neben der toxischen und relativ schwachen antimikrobiellen Komponente auch relativ groß und sind zudem nicht proteolytisch stabil. Eine vielversprechende Alternative zur Umgehung der oben genannten Schwächen, wie beispielsweise die schlechte Hydrolysestabilität der AMPs, bietet die Generation der Peptidomimetika (Wiley und Rich 1993, Wender et al. 2000, Vagner et al. 2008).

### 1.4 Peptidomimetika

Peptide sind durch ihre konformationelle Flexibilität weniger spezifisch, enzymatisch instabil und meist weniger antimikrobiell aktiv. Dennoch machen ihre einfache Herstellung und ihre große Vielfalt sie zu potenziell interessanten Therapeutika. Jedoch können Peptide vor Entfaltung ihrer Wirkung von körpereigenen Enzymen

erkannt und daraufhin abgebaut werden (Marschütz und Bernkop-Schnürch 2000, Torchilin 2000). Damit eine Substanz nicht enzymatisch abgebaut werden kann und antibiotisch wirkt, sind spezielle biologische und physikalische Eigenschaften erforderlich (Reddy et al. 2004). Um diese Nachteile umgehen zu können, wurden Peptid-ähnliche Verbindungen, so genannte Peptidomimetika, entwickelt. Unter diesem Begriff werden alle Verbindungen zusammengefasst, die strukturell oder topologisch den Peptiden ähneln, wobei jedoch häufig die charakteristische Amidbindung der Peptide teilweise oder vollständig verändert wurde (Vagner et al. 2008). Durch diese strukturelle Veränderung sollen verbesserte pharmakokinetische und pharmakodynamische Funktionen geschaffen werden (Simon et al. 1992, Vagner et al. 2008). In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass  $\beta$ -Peptide eine erhöhte Proteasestabilität und eine stabilere Helix aufweisen als  $\alpha$ -Peptide. Die Elemente der  $\beta$ -Peptide sind  $\beta$ -Aminosäuren, deren Aminogruppe statt am  $\alpha$ -Kohlenstoff am  $\beta$ -Kohlenstoff verknüpft ist (Seebach et al. 1996, Potocky et al. 2003).  $\beta$ -Peptide weisen eine eher schwache antimikrobielle Wirkung auf (Ishitsuka et al. 2006, Violette et al. 2006). Zudem zeigen  $\beta$ -Peptide auch eine hämolytische Aktivität gegen humane Erythrozyten (Hamuro et al. 1999, Liu und DeGrado 2001, Porter et al. 2002). Eine weitere Gruppe der Peptidomimetika stellen die Peptoide, wie beispielsweise zellpenetrierende Peptoide (CPPos) dar (Kölmel et al. 2014). Peptoide sind poly-*N*-substituierte Glycine. Die Seitenketten befinden sich im Gegensatz zu den CPPs nicht am  $\alpha$ -Kohlenstoff, sondern am Stickstoffatom des Peptidrückgrats (Abbildung 5) (Zuckermann et al. 1992, Eggenberger et al. 2009).



**Abbildung 5:** Vergleich der Strukturen eines Peptids,  $\beta$ -Peptids und Peptoids (modifiziert nach Kirshenbaum et al. 1998 und Demizu et al. 2015).

Peptoide besitzen ein achirales Rückgrat, während Peptide chiral sind. Dieser Unterschied führt dazu, dass Peptoide hochresolut gegen den proteolytischen Abbau sind. Die achirale Struktur führt zu sehr stabilen Polyprolin Typ-1-ähnlichen Helices, die eine Periodizität von ungefähr drei Seitenketten pro Windung und einer helikalen Ganghöhe von 6,0 bis 6,7 Å durch periodischen Einbringen von großen, sperrigen  $\alpha$ -chiralen, aliphatischen Seitenketten besitzt (Steinberg et al. 1960, Armand et al. 1997, Wu et al. 2003). Auf Grund der Verschiebung der Seitenketten sind die Peptoide proteolytisch resistent und können daher im Organismus nicht durch Enzyme abgebaut werden. Außerdem sind Peptoide besser wasserlöslich als Peptide, da das Stickstoffatom tertiär wird und somit die Wasserlöslichkeit steigt (Tan et al. 2008). Des Weiteren aggregieren die Peptoide weniger häufig als Peptide, was einen entscheidenden Vorteil für die Bioverfügbarkeit darstellt (Chongsiriwatana et al. 2008, Eggenberger et al. 2009, Chongsiriwatana et al. 2011, Kapoor et al. 2011).

Die Anwendungsgebiete der Peptoide sind aufgrund der hohen Diversität breit gefächert. Durch die enorme Vielfalt an unterschiedlichen Seitenketten natürlicher und unnatürlicher Art konnte in ersten Zellkultur- und Fischexperimenten gezeigt werden, dass eine Penetration in unterschiedliche Zellkompartimente stattfindet (Schroder et al. 2007, Kölmel et al. 2014, Popova et al. 2018). Zur Visualisierung können Peptoide mit Fluorophoren, wie beispielsweise Rhodamin B, markiert werden. Generell haben Peptoide eine höhere Permeabilität als Peptide und verhalten sich sehr unterschiedlich im Vergleich zu AMPs. Dafür verantwortlich ist zum einen der fehlende Amid-Wasserstoff, welcher für die Ausbildung einer Sekundärstruktur notwendig ist, und zum anderen die fehlende Chiralität. Durch die große Auswahl an Seitenketten ist es trotzdem möglich, eine bestimmte Sekundär- und/oder Tertiärstruktur zu generieren.

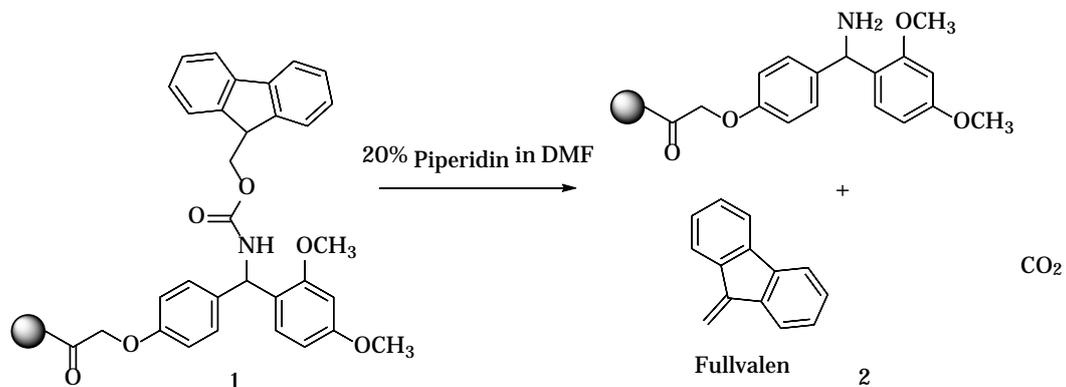
Aufgrund der hohen Diversität, Biokompatibilität und Bioverfügbarkeit besitzen Peptoide ein großes Potential als künftige antibiotische und antimikrobielle Wirkstoffe. Antimikrobielle Peptoide, kurz *Ampetoids*, bilden eine neue Generation der Peptidomimetika.

### 1.5 Peptoidsynthese

Peptoide können kostengünstig und relativ einfach synthetisiert werden. Analog zu den CPPs und CPPos werden *Ampetoids* meist mit der bereits für viele Peptoidsynthesen etablierten Festphasensynthese generiert (Merrifield 1963). Dabei

ist es möglich, unterschiedliche Seitenketten einzufügen. Bei dieser Methode kann eine gute Ausbeute und eine hohe Reinheit erzielt werden. Ein weiterer Vorteil bei der Festphasensynthese bietet zudem die Möglichkeit der Automatisierung (Merrifield 1963, Kölmel et al. 2012).

Bei der Festphasensynthese wird das Peptoid an einem Polystyrolharzkügelchen kovalent synthetisiert. Dabei handelt es sich oft um Chlortritylchlorid-Rink-Amid-, Sieber-Amid- oder Wang-Harze. Das Rink-Amid-Harz besitzt einen säurelabilen funktionalen Linker, der nach Abspaltung der Schutzgruppe an der Funktionalität eine Amidgruppe am C-Terminus des Peptoids hinterlässt. Als Schutzgruppe eignet sich 9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl (Fmoc), welches mit 20%-iger Piperidinlösung abgespalten werden kann (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Schema der Abspaltung des Rink-Amid-Linkers durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit 20%-iger Piperidinlösung.

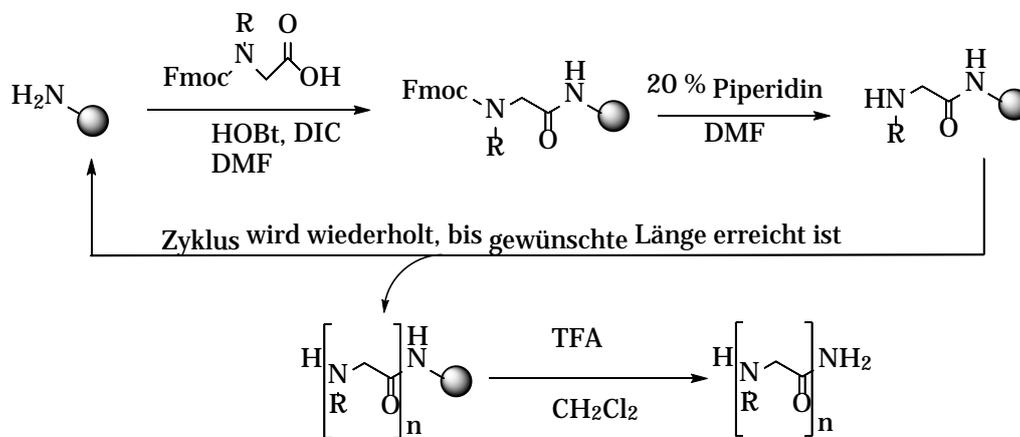
Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe kann über eine UV/Vis-Spektroskopie überprüft werden. Dadurch kann das entstandene Nebenprodukt Fullvalen detektiert werden, das bei der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe entsteht. Danach kann die Synthese des Peptoids beginnen. Es gibt zwei Methoden, um Peptoide zu synthetisieren: Die Monomer-Methode, welche ebenfalls bei Peptiden verwendet wird, und die Submonomer-Methode, die speziell für Peptoide entwickelt wurde (Simon et al. 1992, Zuckermann et al. 1992).

### 1.5.1 Monomere-Methode

Die Monomere-Methode wurde zum ersten Mal von Simon im Jahr 1992 beschrieben und kann wie die Peptidsynthese mit modifizierten Monomer-Einheiten erfolgen. Allerdings müssen für die Peptoidsynthese *N*-substituierte Glycine verwendet werden,

## 1. Einleitung

die mit einer Schutzgruppe, wie beispielsweise Fmoc, temporär geschützt sind. Des Weiteren müssen funktionelle Gruppen der Seitenketten durch orthogonale Schutzgruppen geschützt werden. Für die Kupplung der Monomere an die feste Phase werden meist *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) verwendet. Nach der Kupplungsreaktion kann das Monomer durch 20%-ige Piperidinlösung in DMF entschützt werden. Durch weitere Zyklen können dann mit Hilfe von DIC und HOBT weitere Monomere angeknüpft werden. Eine Peptidkette entsteht, die so lange synthetisiert werden kann, bis die gewünschte Länge erreicht wurde. Schließlich kann das entstandene Peptid bzw. Peptoid durch 95%-ige TFA-Lösung vom Linker abgespalten werden (Abbildung 7).



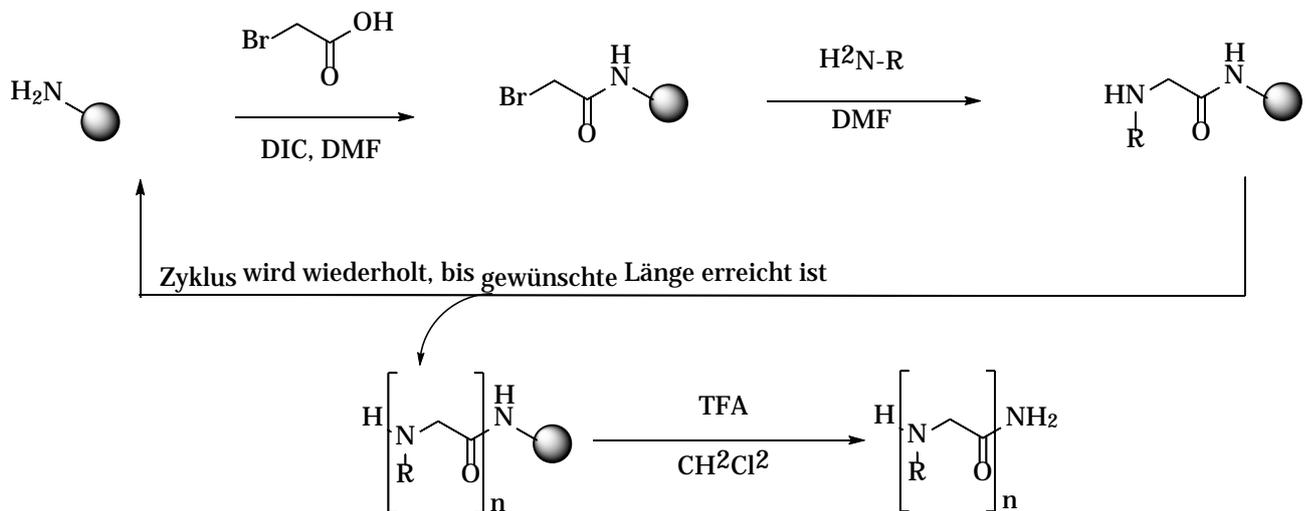
**Abbildung 7:** Peptoidsynthese mit Hilfe der Monomer-Methode (Kölmel et al. 2012).

Alle Reaktionen bei der Monomer-Methode werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktionszeit kann durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung verringert werden. (Olivos et al. 2002).

### 1.5.2 Submonomere-Methode

Eine weitere Methode zur Synthese von Peptoiden ist die Submonomer-Methode. Diese wurde im Jahr 1992 von Zuckermann entwickelt. Bei diesem Verfahren besteht der Zyklus aus einer Acylierung und einer nukleophilen Substitution. Dabei werden die *N*-Alkylglycine in einer zweistufigen Synthese durch Bromacetylierung eines festgebundenen Amins zum Bromacetamid aufgebaut, wodurch das sekundäre Amin durch aktivieren Halogenessigsäure acyliert wird. Anschließend kann durch ein Carbodiimid, wie beispielsweise DIC, die Carboxylgruppe der Bromessigsäure aktivieren und das Amin gekuppelt werden. Diese Schritte werden so lange wiederholt,

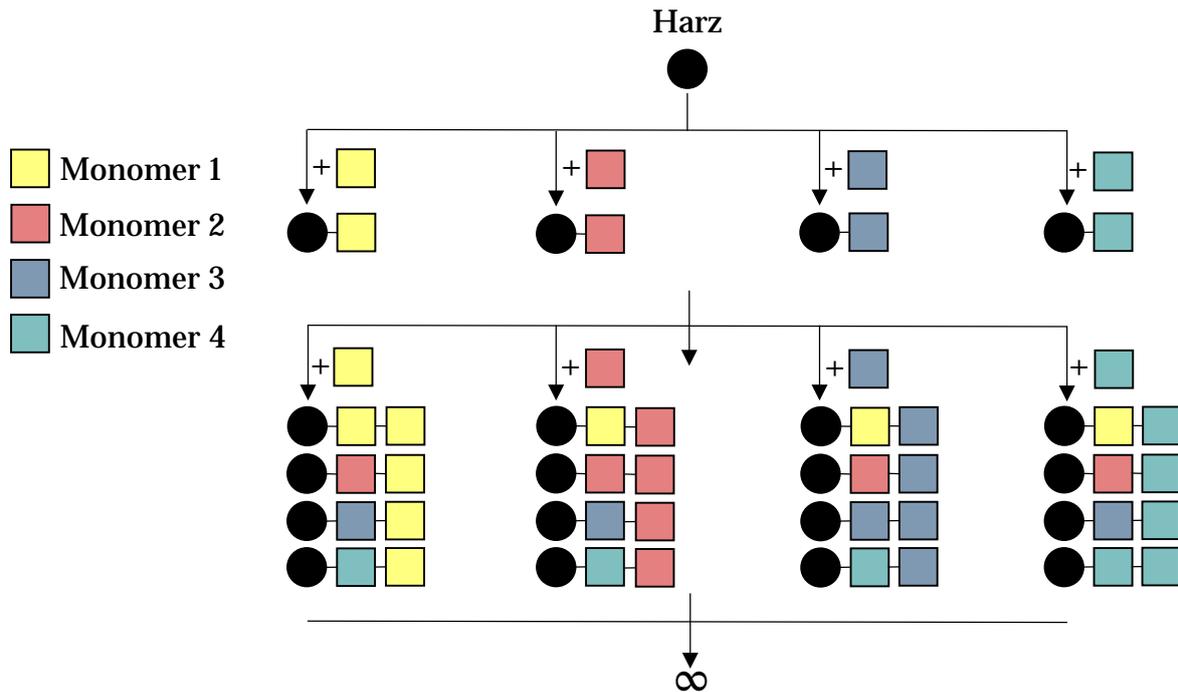
bis die gewünschte Kettenlänge erreicht wird. Schließlich wird wie bei der Monomeren-Methode das entstandene Peptoid mit Hilfe von 95%-iger TFA-Lösung von der festen Phase abgespalten (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Submonomer-Synthese von Peptoiden nach Zuckermann (Zuckermann et al. 1992).

## 1.6 Synthese von Peptoidbibliotheken

Die Monomer Methode und die Submonomer Methode eignen sich beide als Grundlage für die Herstellung großer Peptoidbibliotheken. Seit dem Aufkommen der Peptide Ende der achtziger Jahre wurden verschiedenen Methoden entwickelt, um große Bibliotheken zu erstellen. Eine gängige Methode ist die „*Split and Mix*“-Methode, die von Furka beschrieben wurde (Abbildung 9) (Furka et al. 1991). Dabei besteht die Synthese aus drei einfachen Schritten: Sortieren (*Split*), Kuppeln und Mischen (*Mix*). Die Synthese findet für jedes Peptid bzw. Peptoid in einem eigenen Reaktionsgefäß statt. Dies hat den Vorteil, dass jedes einzelne Produkt separat vorliegt und nicht aufwendig getrennt werden muss. Die einzelnen Reaktionsgefäße werden dann in unterschiedliche Reaktionslösungen getaucht, um die verschiedenen Monomere zu verknüpfen. Nach jeder beendeten Reaktion werden die Reaktionsgefäße gewaschen und neu gemischt.



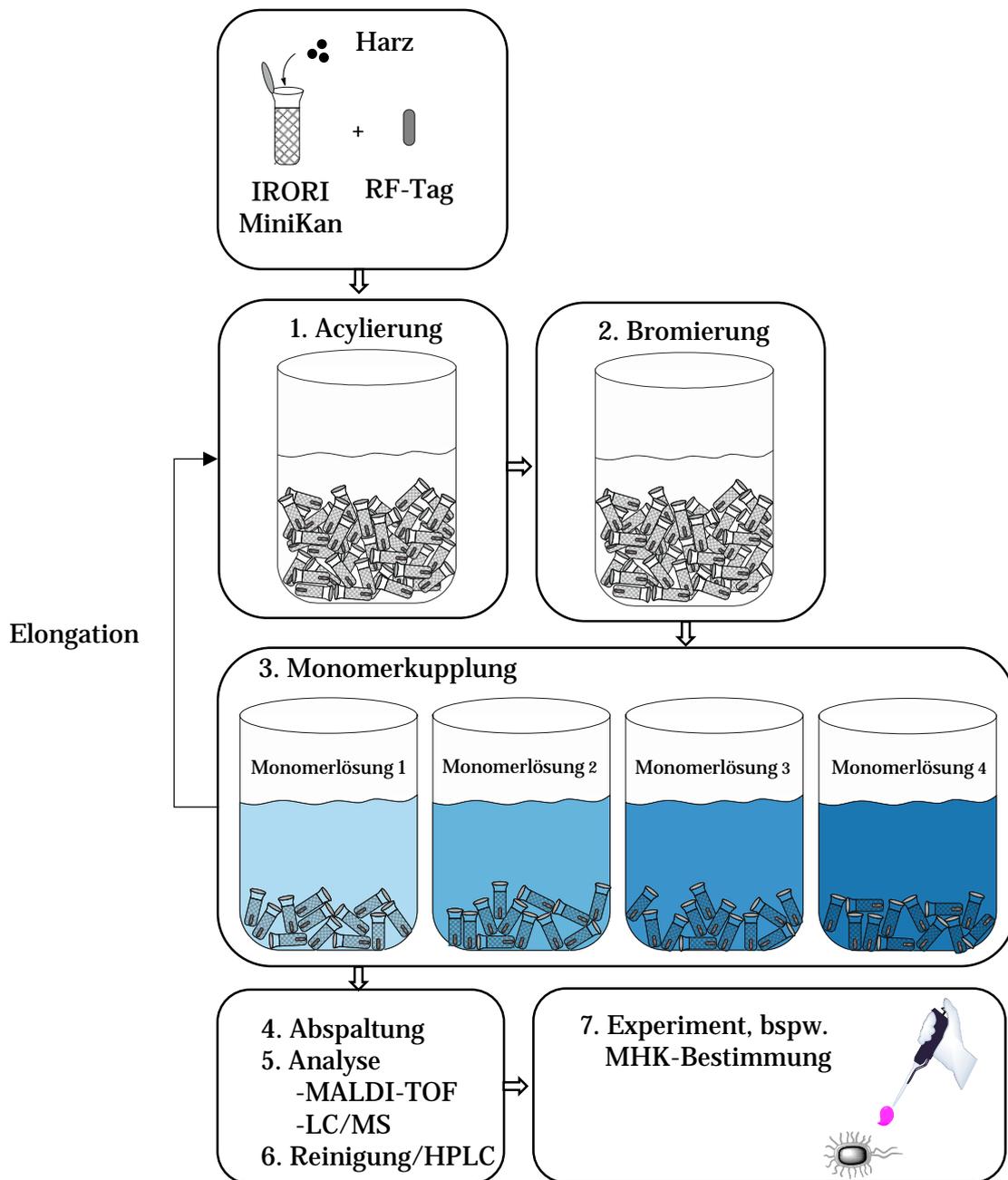
**Abbildung 9:** Schema der „Split and Mix“ Methode. Darstellung der Synthese einer Bibliothek mit vier verschiedenen Seitenketten. Die grauen Kugeln stellen die feste Phase der Synthese dar. Jede Farbe stellt eine Seitenkette dar.

Durch diese Methode kann eine beliebig große Bibliothek entstehen. Die Gesamtgröße der Bibliothek ist dabei von der Anzahl der Seitenketten ( $n$ ) und der Kettenlänge ( $m$ ) abhängig. Die Gesamtzahl der Bibliothek kann mit Hilfe der Formel  $n^m$  ermittelt werden. Werden beispielsweise Tetramere mit vier unterschiedlichen Seitenketten synthetisiert, so wird die Bibliothek  $4^4=256$  Elemente enthalten.

## 1.6.1 IRORI-Technologie

Die IRORI-Technologie erleichtert das Synthetisieren mit Hilfe der *Split and Mix*-Methode von sehr großen Peptoidbibliotheken. Durch die Verwendung von Radiofrequenz-Tags (Rf-Tags), die einen einzigartigen Code beinhalten, kann der Prozess noch während der Synthese gesteuert und nachverfolgt werden. Für die Synthese werden Mikroreaktoren, sogenannten MiniKans, verwendet. Die MiniKans werden mit Harz sowie mit einem Rf-Tag befüllt und bilden so ein permeablen Reaktionsraum. Die IRORI-Synthese ist komfortabel und erfolgt in Glaswaren. Die Synthese erfolgt dabei in 6 Schritten: 1. Acylierung, 2. Bromierung,

3. Monomerkupplung, 4. Abspaltung, 5. Analyse und 6. Reinigung (Abbildung 10)  
(Moran et al. 1995, Nicolaou et al. 1995, Kölmel et al. 2012).



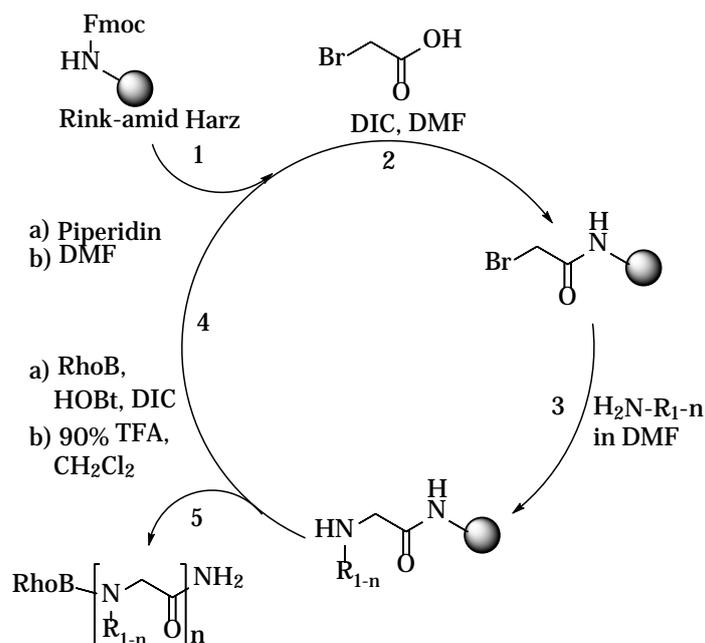
**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der auf IRORI-Technologie basierenden Festphasensynthese von *Split* and *Mix*-Bibliotheken.



## 2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.1 Peptoidbibliotheken

Für die Evaluierung neuer antimikrobieller Peptide, sogenannter *Ampetoids* wurden, Peptoidbibliotheken aus Tetrameren, Pentameren, Oktameren, Nonameren, Undekameren und Dodekameren nach der Submonomer-Methode synthetisiert (Abbildung 11). Für die Synthese wurde das Harz zunächst durch Piperidin entschützt (Abbildung 11 Schritt 1). Anschließend folgte die Acylierung des Harzes durch Bromessigsäure und *N,N'*-diisopropylcarbodiimid (Abbildung 11 Schritt 2). Auf die Acylierung folgte die Monomerkupplung der entsprechenden Amine durch nukleophile Substitution von *N*-substituierte Glycine (Abbildung 11 Schritt 3). Dabei fungiert das Brommolekül als Abgangsgruppe und eine Amidbindung entsteht. Je nach Peptoidbibliothek wurden Schritt 2 und Schritt 3 wiederholt, bis die gewünschte Peptoidlänge synthetisiert wurde. Nach der Kupplung des letzten Aminbausteins wurde jedes Peptoid mit dem Fluorophor Rhodamin B markiert, um die Peptide sowohl in lebenden Zellen als auch in Bakterien visualisieren zu können (Abbildung 11 Schritt 5a). Danach folgte die Abspaltung vom Harz durch Zugabe von 95% TFA (Abbildung 11 Schritt 5b) und die anschließende Reinigung mittels HPLC.

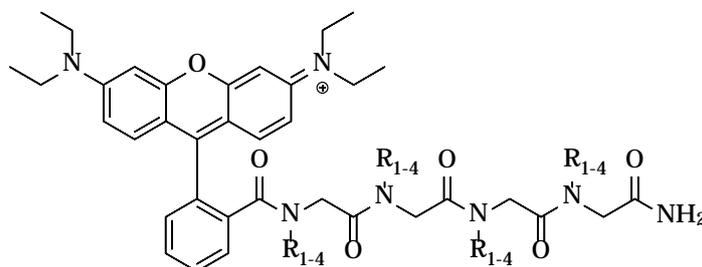


**Abbildung 11:** Vereinfachte schematische Darstellung der Synthese von Peptoidbibliotheken durch die Submonomer-Methode.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

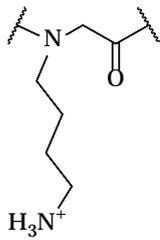
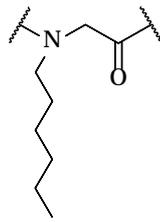
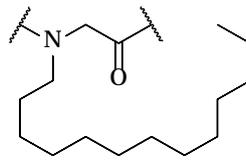
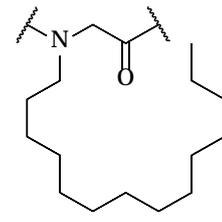
---

Durch die Verwendung von semi-permeablen Reaktionsräumen, wie IRORI MiniKans oder Minireaktoren, ist es möglich, permutierte Peptoidbibliotheken zu synthetisieren. Die chemische Struktur eines Tetramers ist in Abbildung 12 abgebildet.

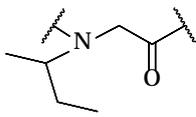
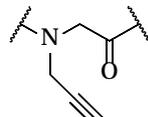
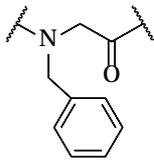
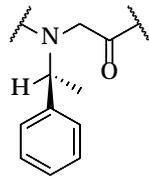
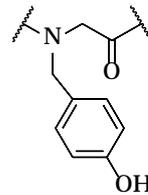
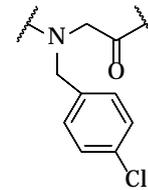
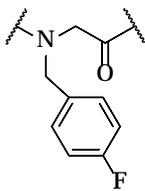
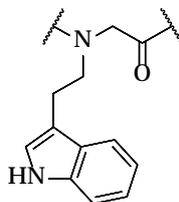


**Abbildung 12:** Chemische Struktur eines mit Rhodamin B gekuppelten Tetramers.  $R_{1-4}$  steht für die jeweiligen Seitenketten.

Für die Synthese neuer Peptoidbibliotheken wurden verschiedene Seitenketten gewählt (Abbildung 13). Die Seitenketten wurden dabei in drei verschiedene Klassen, lipophil, klein und aromatisch, unterteilt werden. Zu den lipophilen Monomeren gehörten die Amine *N*-(4-aminobutyl)glycin (*N*lys), *N*-(hexyl)glycin (*N*he), *N*-(tridecyl)glycin (*N*tridec) und *N*-(tetradecyl)glycin (*N*tetradec). Dabei wurden die Seitenketten nach steigender Lipophilie geordnet. In die Gruppe der kleinen Seitenketten gehörten die Amine *N*-(1-methylpropyl)glycin (*N*ile) und *N*-(2-prop-2-yn-1-yl)glycin (*N*prg). Zu den aromatischen Seitenketten zählten die Amine *N*-(benzyl)glycine (*N*phe), *N*-(*S*)-(1-phenylethyl)glycin (*N*spe), *N*-(4-hydroxybenzyl)glycin (*N*pfb), *N*-(4-chlorobenzyl)glycin (*N*pcb), *N*-(4-fluorobenzyl)glycin (*N*pfb) und *N*-(2-indolethyl)glycin (*N*trp).

**Lipophil****N<sub>Lys</sub>***N*-(4-aminobutyl)glycine**N<sub>he</sub>***N*-(hexyl)glycine**N<sub>tridec</sub>***N*-(tridecyl)glycine**N<sub>tetradec</sub>***N*-(tetradecyl)glycine

Lipophilität

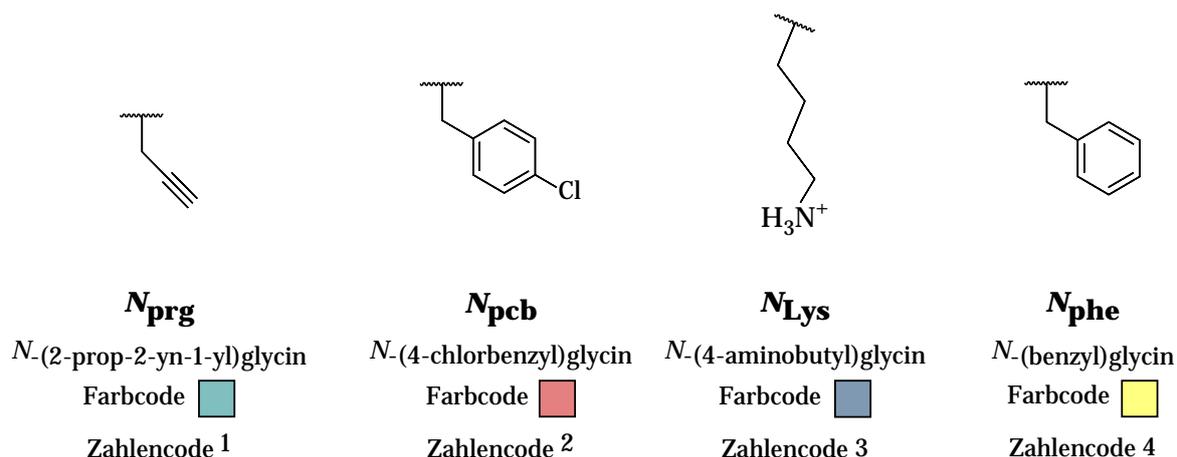
**Klein****N<sub>ile</sub>***N*-(1-methylpropyl)glycine**N<sub>prg</sub>***N*-(2-prop-2-yn-1-yl)glycine**Aromatisch****N<sub>phe</sub>***N*-(benzyl)glycine**N<sub>spe</sub>***N*-(S)-(1-phenylethyl)glycine**N<sub>phb</sub>***N*-(4-hydroxybenzyl)glycine**N<sub>pcb</sub>***N*-(4-chlorobenzyl)glycine**N<sub>pfb</sub>***N*-(4-fluorobenzyl)glycine**N<sub>trp</sub>***N*-(2-indolethyl)glycine

**Abbildung 13:** Verwendete Seitenketten für die Synthese unterschiedlicher Peptoidbibliotheken. Es wurden die Amine *N*-(4-aminobutyl)glycine (*Nlys*), *N*-(hexyl)glycine (*Nhe*), *N*-(tridecyl)glycine (*Ntridec*), *N*-(tetradecyl)glycine (*Ntetradec*), Amine *N*-(1-methylpropyl)glycine (*Nile*), *N*-(2-prop-2-yn-1-yl)glycine (*Nprg*), *N*-(benzyl)glycine (*Nphe*), *N*-(S)-(1-phenylethyl)glycine (*Nspe*), *N*-(4-hydroxybenzyl)glycine (*Nphb*), *N*-(4-chlorobenzyl)glycine (*Npcb*), *N*-(4-fluorobenzyl)glycine (*Npfb*) und *N*-(2-indolethyl)glycine (*Ntrp*) verwendet. Der Zahlen- und Farbcode der Monomere ist in Tabelle 23 zusammengestellt.

### 2.1.1 Peptoidbibliothek 1

In der Doktorarbeit von Dr. Franziska Rönicke (Rönicke 2015) wurde eine Peptoidbibliothek mit tetrameren CPPos erstellt. In dieser Bibliothek wurden verschiedene hydrophile und lipophile Seitenketten verwendet, um die Organ- und Organellspezifität zu evaluieren. Die verwendeten Seitenketten für diese Peptoidbibliothek waren *N*-(4-aminobutyl)glycin (*Mys*), *N*-(2-prop-2-yn-1-yl)glycin (*Nprg*), *N*-(benzyl)glycine (*Nphe*) und *N*-(4-chlorobenzyl)glycin (*Npcb*) (Abbildung 14). Dabei wurden die Amine nach ihrer steigenden Lipophilie sortiert. Die Seitenkette *Nprg* wurde ausgewählt, um eine spätere Modifizierung und weitere Funktionalisierung der Peptide noch nach der Abspaltung zu ermöglichen. Durch eine Clickreaktion der Alkyngruppe von *Nprg* und eines Azids oder Thiols können beispielsweise modifizierte Zucker oder Cargos an das Peptoid gekuppelt werden (Kolb et al. 2001, Dondoni 2008). Die Seitenketten *Nphe* und *Mys* repräsentierten die zwei natürlich vorkommenden neutralen Aminosäuren Phenylalanin und Lysin. Die Einführung der Lysin- und lysinähnlichen Seitenketten erfolgte über die Kupplung von einseitig Boc geschützten Seitenketten. Die spätere Entschützung der Boc geschützten Seitenketten *Mys* erfolgte bei der Abspaltung des Harzes unter sauren Bedingungen mit TFA. Die Seitenkette *Npcb* wurde ausgewählt um die Lipophilie der Peptoidbibliothek zu erhöhen. Die Peptoidbibliothek wurde mittels der Submonomermethode in Kombination mit der *Split&Mix* Methode an der festen Phase synthetisiert. Dabei wurde die Peptoidbibliothek komplett permutiert, sodass  $4^4=256$  Peptide synthetisiert wurden. Die Sequenzen für diese Bibliothek sind in im Appendix in Tabelle 22 zu finden. Die durchschnittliche Ausbeute nach Reinigung durch HPLC betrug 33%.

Um neben den zellpenetrierenden Eigenschaften der Peptide noch weitere Eigenschaften zu determinieren, wurden weitere Untersuchungen vorgenommen. Daher wurde diese Bibliothek zu Beginn dieser Arbeit auf ihre antimikrobielle Wirkung gegen gram-positive und gram-negative Bakterien untersucht.

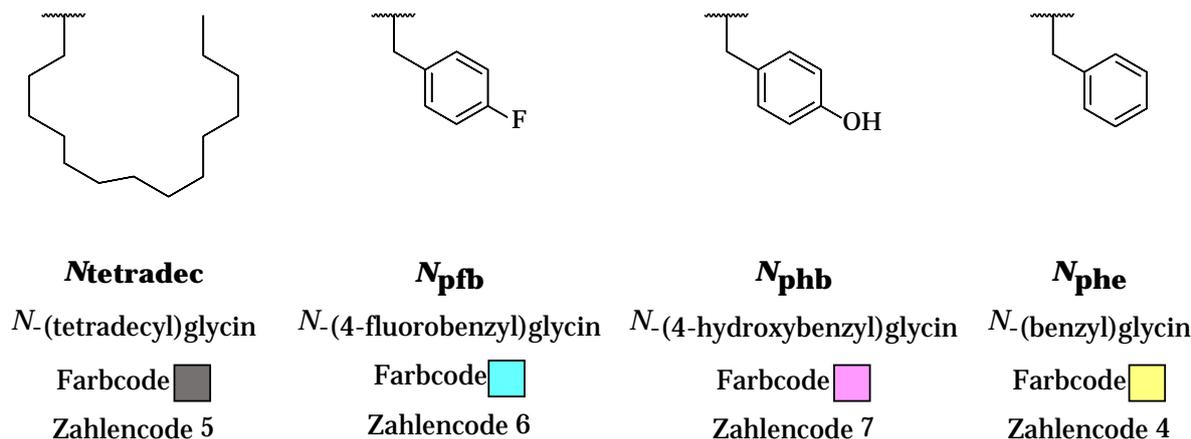


**Abbildung 14:** Darstellung von Struktur, Abkürzung, Strukturname, Farbcode und Zahlencode der verwendeten Seitenketten in der Peptoidbibliothek 1. Für die Synthese wurden die Seitenketten *N*-(2-prop-2-yne-1-yl)glycine (*Nprg*, Farbcode grün, Zahlencode 1), *N*-(4-chlorobenzyl)glycine (*Npcb*, Farbcode grün, Zahlencode 2), *N*-(4-aminobutyl)glycine (*Nlys*, Farbcode blau, Zahlencode 3) und *N*-(benzyl)glycine (*Nphe*, Farbcode gelb, Zahlencode 4) verwendet.

### 2.1.2 Peptoidbibliothek 2

Peptoidbibliothek 2 besteht aus ebenfalls vier verschiedenen Aminseitenketten. Ziel war es, eine neue Peptoidbibliothek mit noch stärkerer antimikrobieller Aktivität und geringerer Toxizität zu erstellen. Dabei wurden für diese Peptoidbibliothek die Seitenketten *N*-(tetradecyl)glycine (*Ntetradec*), *N*-(4-fluorobenzyl)glycine (*Npfb*), *N*-(4-hydroxybenzyl)glycine (*Nphb*) und *N*-(benzyl)glycine (*Nphe*) verwendet. Die Strukturen der Seitenketten sind in Abbildung 15 zusammengestellt. Die Seitenkette *Ntetradec* repräsentierte einen stark lipophilen Baustein und sollte die Membrangängigkeit des Peptoids in Bakterien und humanen Zellen erhöhen. Aufgrund der starken Lipophilie dieses Amins und der erschwerten Synthese wurde diese Peptoidbibliothek nicht komplett permutiert. Die Seitenkette *Nphb* ahmt die neutrale, polare Aminosäure Tyrosin nach. Die unpolare Seitenkette *Npfb* ersetzt den toxischen Baustein *Npcb* aus Peptoidbibliothek 1. Zudem enthalten viele kommerzielle Antibiotika, wie beispielsweise Fluorchinolon und das  $\beta$ -Laktam Antibiotikum Flucloxacillin Fluor (Sutherland et al. 1970, Hooper und Wolfson 1985). Dadurch soll die antimikrobielle Aktivität erhöht werden.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

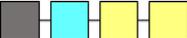
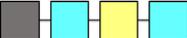
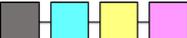
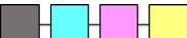
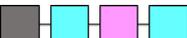
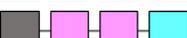


**Abbildung 15:** Darstellung von Struktur, Abkürzung, Strukturname, Farbcode und Zahlencode der verwendeten Seitenketten in der Peptoidbibliothek 2. Für die Synthese wurden die Seitenketten *N*-(tetradecyl)glycine (*Ntetradec*, Farbcode grau, Zahlencode 5), *N*-(4-fluorobenzyl)glycine (*Npfb*, Farbcode türkis, Zahlencode 6), *N*-(4-hydroxybenzyl)glycine (*Nphb*, Farbcode rosa, Zahlencode 7) und *N*-(benzyl)glycine (*Nphe*, Farbcode gelb, Zahlencode 4) verwendet.

Die halbpermutierte Peptoidbibliothek enthält  $3^4=81$  Peptoide, die mittels der IRORI basierten Submonomermethode synthetisiert wurden. Alle Peptoide wurden mit Rhodamin B markiert, um die Lokalisation der Peptoide in Zellen analysieren zu können. Nach der Fluoreszenzmarkierung wurden die Peptoide mit 95% TFA vom Harz abgespalten und mit MALDI identifiziert. 79 von 81 Peptoiden konnten identifiziert werden und wurden in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Ausbeute nach Reinigung mittels HPLC betrug durchschnittlich 30%.

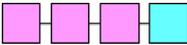
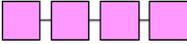
**Tabelle 1:** Überblick über die Peptoidbibliothek 2. Peptoidnummer, Sequenz, Farbcode, Zahlencode, Molekulargewicht der jeweiligen Peptoide. Erfolgreich synthetisierte und durch MALDI-TOF Massenspektrometrie identifizierte Peptoide sind mit einem ✓ markiert. Peptoide die nicht identifiziert werden konnten sind mit einem × markiert.

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup> [g/mol]	Peptoid vor- handen <sup>c</sup> (✓/×)
257	<i>Ntetradec-Nphe-Nphe-Nphe-RhodB</i>		5 4 4 4	1137,5	✓
258	<i>Ntetradec-Nphe-Nphe-Npfb-RhodB</i>		5 4 4 6	1155,5	✓
259	<i>Ntetradec-Nphe-Nphe-Nphb-RhodB</i>		5 4 4 7	1153,5	✓
260	<i>Ntetradec-Nphe-Npfb-Nphe-RhodB</i>		5 4 6 4	1155,5	✓
261	<i>Ntetradec-Nphe-Npfb-Npfb-RhodB</i>		5 4 6 6	1173,5	✓
262	<i>Ntetradec-Nphe-Npfb-Nphb-RhodB</i>		5 4 6 7	1171,5	✓
263	<i>Ntetradec-Nphe-Nphb-Nphe-RhodB</i>		5 4 7 4	1153,5	✓

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup>	Peptoid vor- handen <sup>c</sup> (✓/×)
				[g/mol]	
264	Ntetradec-Nphe-Nphb-Npfb-RhodB		5 4 7 6	1171,5	✓
265	Ntetradec-Nphe-Nphb-Nphb-RhodB		5 4 7 7	1169,5	✓
266	Ntetradec-Npfb-Nphe-Nphe-RhodB		5 6 4 4	1155,5	✓
267	Ntetradec-Npfb-Nphe-Npfb-RhodB		5 6 4 6	1173,5	✓
268	Ntetradec-Npfb-Nphe-Nphb-RhodB		5 6 4 7	1171,5	✓
269	Ntetradec-Npfb-Npfb-Nphe-RhodB		5 6 6 4	1173,5	✓
270	Ntetradec-Npfb-Npfb-Npfb-RhodB		5 6 6 6	1191,5	✓
271	Ntetradec-Npfb-Npfb-Nphb-RhodB		5 6 6 7	1189,5	✓
272	Ntetradec-Npfb-Nphb-Nphe-RhodB		5 6 7 4	1171,5	✓
273	Ntetradec-Npfb-Nphb-Npfb-RhodB		5 6 7 6	1189,5	✓
274	Ntetradec-Npfb-Nphb-Nphb-RhodB		5 6 7 7	1187,5	✓
275	Ntetradec-Nphb-Nphe-Nphe-RhodB		5 7 4 4	1153,5	✓
276	Ntetradec-Nphb-Nphe-Npfb-RhodB		5 7 4 6	1171,5	✓
277	Ntetradec-Nphb-Nphe-Nphb-RhodB		5 7 4 7	1169,5	✓
278	Ntetradec-Nphb-Npfb-Nphe-RhodB		5 7 6 4	1171,5	✓
279	Ntetradec-Nphb-Npfb-Npfb-RhodB		5 7 6 6	1189,5	✓
280	Ntetradec-Nphb-Npfb-Nphb-RhodB		5 7 6 7	1187,5	✓
281	Ntetradec-Nphb-Nphb-Nphe-RhodB		5 7 7 4	1169,5	✓
282	Ntetradec-Nphb-Nphb-Npfb-RhodB		5 7 7 6	1187,5	✓
283	Ntetradec-Nphb-Nphb-Nphb-RhodB		5 7 7 7	1185,5	✓
284	Npfb-Nphe-Nphe-Nphe-RhodB		6 4 4 4	1049,3	✓
285	Npfb-Nphe-Nphe-Npfb-RhodB		6 4 4 6	1067,3	✓
286	Npfb-Nphe-Nphe-Nphb-RhodB		6 4 4 7	1065,3	✓
287	Npfb-Nphe-Npfb-Nphe-RhodB		6 4 6 4	1067,3	✓
288	Npfb-Nphe-Npfb-Npfb-RhodB		6 4 6 6	1085,3	✓
289	Npfb-Nphe-Npfb-Nphb-RhodB		6 4 6 7	1083,3	✓
290	Npfb-Nphe-Nphb-Nphe-RhodB		6 4 7 4	1065,3	✓
291	Npfb-Nphe-Nphb-Npfb-RhodB		6 4 7 6	1083,3	✓
292	Npfb-Nphe-Nphb-Nphb-RhodB		6 4 7 7	1081,3	✓
293	Npfb-Npfb-Nphe-Nphe-RhodB		6 6 4 4	1067,3	✓
294	Npfb-Npfb-Nphe-Npfb-RhodB		6 6 4 6	1085,3	✓
295	Npfb-Npfb-Nphe-Nphb-RhodB		6 6 4 7	1083,3	✓
296	Npfb-Npfb-Npfb-Nphe-RhodB		6 6 6 4	1085,3	✓
297	Npfb-Npfb-Npfb-Npfb-RhodB		6 6 6 6	1103,3	✓
298	Npfb-Npfb-Npfb-Nphb-RhodB		6 6 6 7	1101,3	✓

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup>	Peptoid vor- handen <sup>c</sup> (✓/×)
				[g/mol]	
299	<i>Npfb-Npfb-Nphb-Nphe-RhodB</i>		6 6 7 4	1083,3	✓
300	<i>Npfb-Npfb-Nphb-Npfb-RhodB</i>		6 6 7 6	1101,3	✓
301	<i>Npfb-Npfb-Nphb-Nphb-RhodB</i>		6 6 7 7	1099,3	×
302	<i>Npfb-Nphb-Nphe-Nphe-RhodB</i>		6 7 4 4	1065,3	✓
303	<i>Npfb-Nphb-Nphe-Npfb-RhodB</i>		6 7 4 6	1083,3	✓
304	<i>Npfb-Nphb-Nphe-Nphb-RhodB</i>		6 7 4 7	1081,3	✓
305	<i>Npfb-Nphb-Npfb-Nphe-RhodB</i>		6 7 6 4	1083,3	✓
306	<i>Npfb-Nphb-Npfb-Npfb-RhodB</i>		6 7 6 6	1101,26	✓
307	<i>Npfb-Npfb-Npfb-Nphb-RhodB</i>		6 7 6 7	1099,3	✓
308	<i>Npfb-Nphb-Nphb-Nphe-RhodB</i>		6 7 7 4	1081,3	✓
309	<i>Npfb-Nphb-Nphb-Npfb-RhodB</i>		6 7 7 6	1099,3	✓
310	<i>Npfb-Nphb-Nphb-Nphb-RhodB</i>		6 7 7 7	1097,3	✓
311	<i>Nphb-Nphe-Nphe-Nphe-RhodB</i>		7 4 4 4	1047,3	✓
312	<i>Nphb-Nphe-Nphe-Npfb-RhodB</i>		7 4 4 6	1065,3	✓
313	<i>Nphb-Nphe-Nphe-Nphb-RhodB</i>		7 4 4 7	1063,3	✓
314	<i>Nphb-Nphe-Npfb-Nphe-RhodB</i>		7 4 6 4	1065,3	✓
315	<i>Nphb-Nphe-Npfb-Npfb-RhodB</i>		7 4 6 6	1083,3	✓
316	<i>Nphb-Nphe-Npfb-Nphb-RhodB</i>		7 4 6 7	1081,3	✓
317	<i>Nphb-Nphe-Nphb-Nphe-RhodB</i>		7 4 7 4	1063,3	✓
318	<i>Nphb-Nphe-Nphb-Npfb-RhodB</i>		7 4 7 6	1081,3	✓
319	<i>Nphb-Nphe-Nphb-Nphb-RhodB</i>		7 4 7 7	1079,3	✓
320	<i>Nphb-Npfb-Nphe-Nphe-RhodB</i>		7 6 4 4	1065,3	✓
321	<i>Nphb-Npfb-Nphe-Npfb-RhodB</i>		7 6 4 6	1083,3	✓
322	<i>Nphb-Npfb-Nphe-Nphb-RhodB</i>		7 6 4 7	1081,3	✓
323	<i>Nphb-Npfb-Npfb-Nphe-RhodB</i>		7 6 6 4	1083,3	✓
324	<i>Nphb-Npfb-Npfb-Npfb-RhodB</i>		7 6 6 6	1101,3	✓
325	<i>Nphb-Npfb-Npfb-Nphb-RhodB</i>		7 6 6 7	1099,3	✓
326	<i>Nphb-Npfb-Nphb-Nphe-RhodB</i>		7 6 7 4	1081,3	✓
327	<i>Nphb-Npfb-Nphb-Npfb-RhodB</i>		7 6 7 6	1099,3	✓
328	<i>Nphb-Npfb-Nphb-Nphb-RhodB</i>		7 6 7 7	1063,3	✓
329	<i>Nphb-Nphb-Nphe-Nphe-RhodB</i>		7 7 4 4	1097,3	✓
330	<i>Nphb-Nphb-Nphe-Npfb-RhodB</i>		7 7 4 6	1081,3	✓
331	<i>Nphb-Nphb-Nphe-Nphb-RhodB</i>		7 7 4 7	1079,3	✓
332	<i>Nphb-Nphb-Npfb-Nphe-RhodB</i>		7 7 6 4	1081,3	✓
333	<i>Nphb-Nphb-Npfb-Npfb-RhodB</i>		7 7 6 6	1099,3	✓

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup> [g/mol]	Peptoid vor- handen <sup>c</sup> (✓/×)
334	<i>Nphb-Nphb-Npfb-Nphb-RhodB</i>		7 7 6 7	1097,3	×
335	<i>Nphb-Nphb-Nphb-Nphe-RhodB</i>		7 7 7 4	1079,3	✓
336	<i>Nphb-Nphb-Nphb-Npfb-RhodB</i>		7 7 7 6	1097,3	✓
337	<i>Nphb-Nphb-Nphb-Nphb-RhodB</i>		7 7 7 7	1095,3	✓

<sup>a</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 22.

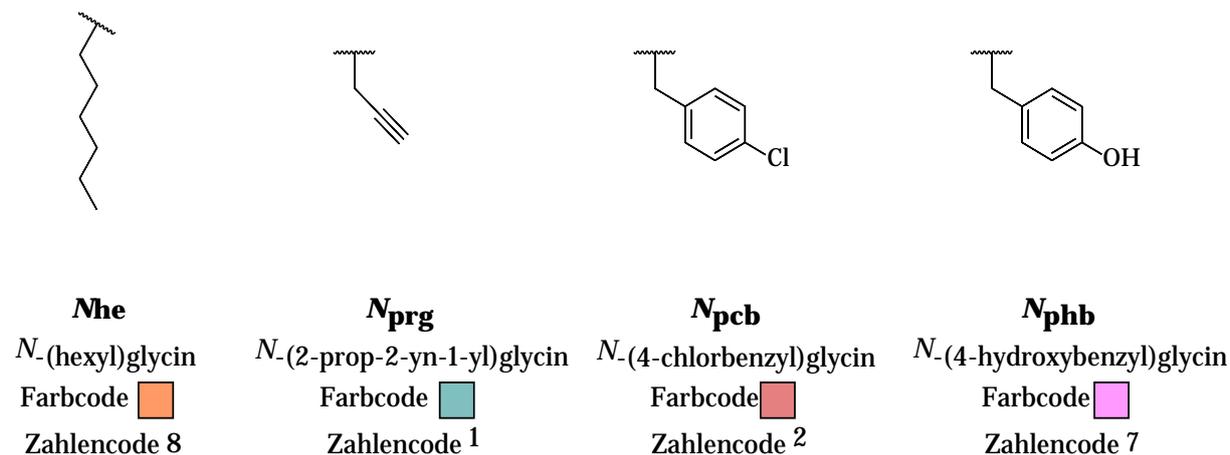
<sup>b</sup> MW, Molekulargewicht.

<sup>c</sup> ✓ Peptoid vorhanden, × Peptoid nicht vorhanden.

### 2.1.3 Peptoidbibliothek 3

Peptoidbibliothek 3 wurde ebenfalls wie die Peptoidbibliotheken 1 und 2 aus vier verschiedenen Aminseitenketten synthetisiert. Es wurde ein Mix aus den Seitenketten der Peptoidbibliotheken 1 und 2 verwendet, da hier einige Peptoide eine starke, antimikrobielle Aktivität zeigten. Ziel war es eine neue Peptoidbibliothek mit geringerer Toxizität, geringerer hämolytischer Aktivität und starker antimikrobieller Aktivität gegen gram-positive und gram-negative Bakterien zu erstellen. Dazu wurden für diese Peptoidbibliothek die Seitenketten *N*-(hexyl)glycin (*Nhe*), *N*-(2-prop-2-yn-1-yl)glycin (*Nprg*), *N*-(4-chlorobenzyl)glycin, (*Npcb*) und (*Nphb*) verwendet. Die Strukturen der Seitenketten sind in Abbildung 16 zusammengestellt. Die Seitenkette *Nhe* ersetzt den nur schwach aktiven und schwer in der Synthese einsetzbaren Baustein *N*tetradec und repräsentiert einen lipophilen Baustein, wodurch die Membrangängigkeit des Peptoids in Bakterien und humanen Zellen erhöht werden soll. Die Seitenkette *Nprg* wurde ausgewählt, um eine spätere Modifizierung und weitere Funktionalisierung des Peptoids noch nach der Abspaltung zu ermöglichen. Die Seitenkette *Nphb* ahmt die neutrale, polare Aminosäure Tyrosin nach. *Npcb* aus Peptoidbibliothek 1 zeigte eine gute antimikrobielle Aktivität und diente als Mimikry für chlorhaltige Antibiotika, wie Cefaclor, ein Cephalosporin der zweiten Generation (Sanders 1977).

## 2. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 16:** Darstellung von Struktur, Abkürzung, Strukturname, Farbcode und Zahlencode der verwendeten Seitenketten in der Peptoidbibliothek 3. Für die Synthese wurden die Seitenketten *N*-(hexyl)glycin (*Nhe*, Farbcode orange, Zahlencode 8), *N*-(2-prop-2-yne-1-yl)glycin (*Nprg*, Farbcode grün, Zahlencode 3), *N*-(4-chlorobenzyl)glycin, (*Npcb*, Farbcode grün, Zahlencode 3) und (*Nphb*, Farbcode rosa, Zahlencode 7) verwendet.

Die halbpermutierte Peptoidbibliothek enthält  $4^3=64$  Peptoide, die mittels der IRORI basierten Submonomermethode synthetisiert wurden. Alle Peptoide wurden mit Rhodamin B markiert, um die Lokalisation der Peptoide in Zellen analysieren zu können. Nach der Fluoreszenzmarkierung wurden die Peptoide mit 95% TFA vom Harz abgespalten und mit MALDI identifiziert. Alle Peptoide konnten identifiziert werden und wurden in Tabelle 2 zusammengestellt. Die Ausbeute nach Reinigung mittels HPLC betrug durchschnittlich 34%.

**Tabelle 2:** Überblick über die Peptoidbibliothek 3. Peptoidnummer, Sequenz, Farbcode, Zahlencode, Molekulargewicht der jeweiligen Peptoide. Erfolgreich synthetisierte und durch MALDI-TOF Massenspektrometrie identifizierte Peptoide sind mit einem ✓ markiert. Peptoide die nicht identifiziert werden konnten sind mit einem × markiert.

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup> [g/mol]	Peptoid vor- handen <sup>c</sup> (✓/×)
338	<i>Nhe-Nprg-Nprg-Nprg-RhodB</i>	<span style="color: orange;">■</span> <span style="color: green;">■</span> <span style="color: green;">■</span> <span style="color: green;">■</span>	8 1 1 1	869,1	✓
339	<i>Nhe-Nprg-Nprg-Npcb-RhodB</i>	<span style="color: orange;">■</span> <span style="color: green;">■</span> <span style="color: green;">■</span> <span style="color: red;">■</span>	8 1 1 2	955,6	✓
340	<i>Nhe-Nprg-Nprg-Nhe-RhodB</i>	<span style="color: orange;">■</span> <span style="color: green;">■</span> <span style="color: green;">■</span> <span style="color: orange;">■</span>	8 1 1 8	915,2	✓
341	<i>Nhe-Nprg-Nprg-Nphb-RhodB</i>	<span style="color: orange;">■</span> <span style="color: green;">■</span> <span style="color: green;">■</span> <span style="color: magenta;">■</span>	8 1 1 7	937,2	✓
342	<i>Nhe-Nprg-Npcb-Nprg-RhodB</i>	<span style="color: orange;">■</span> <span style="color: green;">■</span> <span style="color: red;">■</span> <span style="color: green;">■</span>	8 1 2 1	955,6	✓
343	<i>Nhe-Nprg-Npcb-Npcb-RhodB</i>	<span style="color: orange;">■</span> <span style="color: green;">■</span> <span style="color: red;">■</span> <span style="color: red;">■</span>	8 1 2 2	955,6	✓

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup>	Peptoid vor- handen <sup>c</sup> (✓/×)
				[g/mol]	
344	<i>Nhe-Nprg-Npcb-Nhe-RhodB</i>		8 1 2 8	1001,7	✓
345	<i>Nhe-Nprg-Npcb-Nphb-RhodB</i>		8 1 2 7	1023,7	✓
346	<i>Nhe-Nprg-Nhe-Nprg-RhodB</i>		8 1 8 1	915,2	✓
347	<i>Nhe-Nprg-Nhe-Npcb-RhodB</i>		8 1 8 2	1001,7	✓
348	<i>Nhe-Nprg-Nhe-Nhe-RhodB</i>		8 1 8 8	951,3	✓
349	<i>Nhe-Nprg-Nhe-Nphb-RhodB</i>		8 1 8 7	983,3	✓
350	<i>Nhe-Nprg-Nphb-Nprg-RhodB</i>		8 1 7 1	937,17	✓
351	<i>Nhe-Nprg-Nphb-Npcb-RhodB</i>		8 1 7 2	1023,7	✓
352	<i>Nhe-Nprg-Nphb-Nhe-RhodB</i>		8 1 7 8	983,3	✓
353	<i>Nhe-Nprg-Nphb-Nphb-RhodB</i>		8 1 7 7	1005,3	✓
354	<i>Nhe-Npcb-Nprg-Nprg-RhodB</i>		8 2 1 1	955,6	✓
355	<i>Nhe-Npcb-Nprg-Npcb-RhodB</i>		8 2 1 2	955,6	✓
356	<i>Nhe-Npcb-Nprg-Nhe-RhodB</i>		8 2 1 8	1001,7	✓
357	<i>Nhe-Npcb-Nprg-Nphb-RhodB</i>		8 2 1 7	1023,7	✓
358	<i>Nhe-Npcb-Npcb-Nprg-RhodB</i>		8 2 2 1	955,6	✓
359	<i>Nhe-Npcb-Npcb-Npcb-RhodB</i>		8 2 2 2	1128,7	✓
360	<i>Nhe-Npcb-Npcb-Nhe-RhodB</i>		8 2 2 8	1088,3	✓
361	<i>Nhe-Npcb-Npcb-Nphb-RhodB</i>		8 2 2 7	1110,2	✓
362	<i>Nhe-Npcb-Nhe-Nprg-RhodB</i>		8 2 8 1	1001,7	✓
363	<i>Nhe-Npcb-Nhe-Npcb-RhodB</i>		8 2 8 2	1088,3	✓
364	<i>Nhe-Npcb-Nhe-Nhe-RhodB</i>		8 2 8 8	1047,8	✓
365	<i>Nhe-Npcb-Nhe-Nphb-RhodB</i>		8 2 8 7	1069,8	✓
366	<i>Nhe-Npcb-Nphb-Nprg-RhodB</i>		8 2 7 1	1023,7	✓
367	<i>Nhe-Npcb-Nphb-Npcb-RhodB</i>		8 2 7 2	1110,2	✓
368	<i>Nhe-Npcb-Nphb-Nhe-RhodB</i>		8 2 7 8	1069,8	✓
369	<i>Nhe-Npcb-Nphb-Nphb-RhodB</i>		8 2 7 7	1091,8	✓
370	<i>Nhe-Nhe-Nprg-Nprg-RhodB</i>		8 8 1 1	915,2	✓
371	<i>Nhe-Nhe-Nprg-Npcb-RhodB</i>		8 8 1 2	1001,7	✓
372	<i>Nhe-Nhe-Nprg-Nhe-RhodB</i>		8 8 1 8	951,3	✓
373	<i>Nhe-Nhe-Nprg-Nphb-RhodB</i>		8 8 1 7	983,3	✓
374	<i>Nhe-Nhe-Npcb-Nprg-RhodB</i>		8 8 2 1	1001,7	✓
375	<i>Nhe-Nhe-Npcb-Npcb-RhodB</i>		8 8 2 2	1088,3	✓
376	<i>Nhe-Nhe-Npcb-Nhe-RhodB</i>		8 8 2 8	1047,8	✓
377	<i>Nhe-Nhe-Npcb-Nphb-RhodB</i>		8 8 2 7	1069,8	✓
378	<i>Nhe-Nhe-Nhe-Nprg-RhodB</i>		8 8 8 1	951,3	✓

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup>	Peptoid vor- handen <sup>c</sup> (✓/×)
				[g/mol]	
379	<i>Nhe-Nhe-Nhe-Npcb-RhodB</i>		8 8 8 2	1047,8	✓
380	<i>Nhe-Nhe-Nhe-Nhe-RhodB</i>		8 8 8 8	1007,4	✓
381	<i>Nhe-Nhe-Nhe-Nphb-RhodB</i>		8 8 8 7	1029,4	✓
382	<i>Nhe-Nhe-Nphb-Nprg-RhodB</i>		8 8 7 1	983,3	✓
383	<i>Nhe-Nhe-Nphb-Npcb-RhodB</i>		8 8 7 2	1069,8	✓
384	<i>Nhe-Nhe-Nphb-Nhe-RhodB</i>		8 8 7 8	1029,4	✓
385	<i>Nhe-Nhe-Nphb-Nphb-RhodB</i>		8 8 7 7	1051,4	✓
386	<i>Nhe-Nphb-Nprg-Nprg-RhodB</i>		8 7 1 1	937,2	✓
387	<i>Nhe-Nphb-Nprg-Npcb-RhodB</i>		8 7 1 2	1023,7	✓
388	<i>Nhe-Nphb-Nprg-Nhe-RhodB</i>		8 7 1 8	983,3	✓
389	<i>Nhe-Nphb-Nprg-Nphb-RhodB</i>		8 7 1 7	1005,3	✓
390	<i>Nhe-Nphb-Npcb-Nprg-RhodB</i>		8 7 2 1	1023,7	✓
391	<i>Nhe-Nphb-Npcb-Npcb-RhodB</i>		8 7 2 2	1110,2	✓
392	<i>Nhe-Nphb-Npcb-Nhe-RhodB</i>		8 7 2 8	1069,8	✓
393	<i>Nhe-Nphb-Npcb-Nphb-RhodB</i>		8 7 2 7	1091,8	✓
394	<i>Nhe-Nphb-Nhe-Nprg-RhodB</i>		8 7 8 1	983,3	✓
395	<i>Nhe-Nphb-Nhe-Npcb-RhodB</i>		8 7 8 2	1069,8	✓
396	<i>Nhe-Nphb-Nhe-Nhe-RhodB</i>		8 7 8 8	1029,4	✓
397	<i>Nhe-Nphb-Nhe-Nphb-RhodB</i>		8 7 8 7	1051,4	✓
398	<i>Nhe-Nphb-Nphb-Nprg-RhodB</i>		8 7 7 1	1005,3	✓
399	<i>Nhe-Nphb-Nphb-Npcb-RhodB</i>		8 7 7 2	1091,8	✓
400	<i>Nhe-Nphb-Nphb-Nhe-RhodB</i>		8 7 7 8	1051,4	✓
401	<i>Nhe-Nphb-Nphb-Nphb-RhodB</i>		8 7 7 7	1073,3	✓

<sup>a</sup>Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 22.

<sup>b</sup>MW, Molekulargewicht.

<sup>c</sup> ✓ Peptoid vorhanden, × Peptoid nicht vorhanden.

### 2.1.4 Peptoid Oktamere

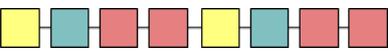
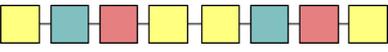
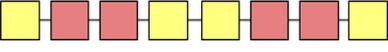
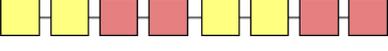
Die Peptoidbibliothek Oktamere setzt sich aus Verdoppelungen einer Auswahl an Peptoiden aus Peptoidbibliothek 1 zusammen. Die Peptoidbibliothek Oktamere besteht aus 16 Peptoiden, die mit der IRORI basierten Submonomermethode in Minireaktoren synthetisiert wurden. Alle Peptoide wurden mit Rhodamin B markiert, um die Lokalisation der Peptoide in Zellen analysieren zu können. Nach

Fluoreszenzmarkierung wurden die Peptoide mit 95% TFA vom Harz abgespalten und mit MALDI identifiziert. Alle Peptoide konnten identifiziert werden und sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Ausbeute nach Reinigung mittels HPLC betrug zwischen 20 und 61%.

**Tabelle 3:** Überblick über die Peptoidbibliothek Oktamere. Peptoidnummer, Sequenz, Farbcode, Zahlencode, Molekulargewicht der jeweiligen Peptoide. Erfolgreich synthetisierte und durch MALDI-TOF Massenspektrometrie identifizierte Peptoide sind mit einem ✓ markiert. Peptoide die nicht identifiziert werden konnten sind mit einem × markiert.

Peptoid	Sequenz/Farbcode <sup>a</sup>	Zahlencode	MW <sup>b</sup> [g/mol]	Peptoid vorhanden <sup>c</sup> (✓/×)
402	<i>Nprg-Nprg-Npcb-Nphe-Nprg-Nprg-Npcb-Nphe</i> 	1 1 2 4 1 1 2 4	1446,14	✓
403	<i>Nprg-Nphe-Npcb-Npcs-Nprg-Nphe-Npcb-Npcb</i> 	1 4 2 2 1 4 2 2	1653,61	✓
404	<i>Npcb-Nprg-Npcb-Nphe-Npcb-Nprg-Npcb-Nphe</i> 	2 1 2 4 2 1 2 4	1653,61	✓
405	<i>Npcb-Nprg-Nphe-Nprg-Npcb-Nprg-Nphe-Nprg</i> 	2 1 4 1 2 1 4 1	1480,58	✓
406	<i>Npcb-Npcb-Nprg-Nprg-Npcb-Npcb-Nprg-Nprg</i> 	2 2 1 1 2 2 1 1	1549,46	✓
407	<i>Npcb-Npcb-Nprg-Npcb-Npcb-Npcb-Nprg-Npcb</i> 	2 2 1 2 2 2 1 2	1722,5	✓
408	<i>Npcb-Npcb-Mys-Nphe-Npcb-Npcb-Mys-Nphe</i> 	2 2 3 4 2 2 3 4	1719,76	✓
409	<i>Npcb-Npcb-Mys-Nprg-Npcb-Npcb-Mys-Nprg</i> 	2 2 4 1 2 2 4 1	1653,61	✓
410	<i>Npcb-Nphe-Npcb-Nphe-Npcb-Nphe-Npcb-Nphe</i> 	2 4 2 4 2 4 2 4	1757,77	✓
411	<i>Npcb-Nphe-Mys-Npcb-Npcb-Nphe-Mys-Npcb</i> 	2 4 3 2 2 4 3 2	1719,76	✓
412	<i>Npcb-Nphe-Nphe-Nphe-Npcb-Nphe-Nphe-Nphe</i> 	2 4 4 4 2 4 4 4	1688,88	✓
413	<i>Nphe-Nprg-Nprg-Nphe-Nphe-Nprg-Nprg-Nphe</i> 	4 1 1 4 4 1 1 4	1411,69	✓

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz/Farbcode <sup>a</sup>	Zahlencode	MW <sup>b</sup> [g/mol]	Peptoid vorhanden <sup>c</sup> (✓/×)
414	<i>Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb</i> 	4 1 2 2 4 1 2 2	1653,61	✓
415	<i>Nphe-Nprg-Npcb-Nphe-Nphe-Nprg-Npcb-Nphe</i> 	4 1 2 4 4 1 2 4	1584,73	✓
416	<i>Nphe-Npcb-Npcb-Nphe-Nphe-Npcb-Npcb-Nphe</i> 	4 2 2 4 4 2 2 4	1757,77	✓
417	<i>Nphe-Nphe-Npcb-Npcb-Nphe-Nphe-Npcb-Npcb</i> 	4 4 2 2 4 4 2 2	1757,77	✓

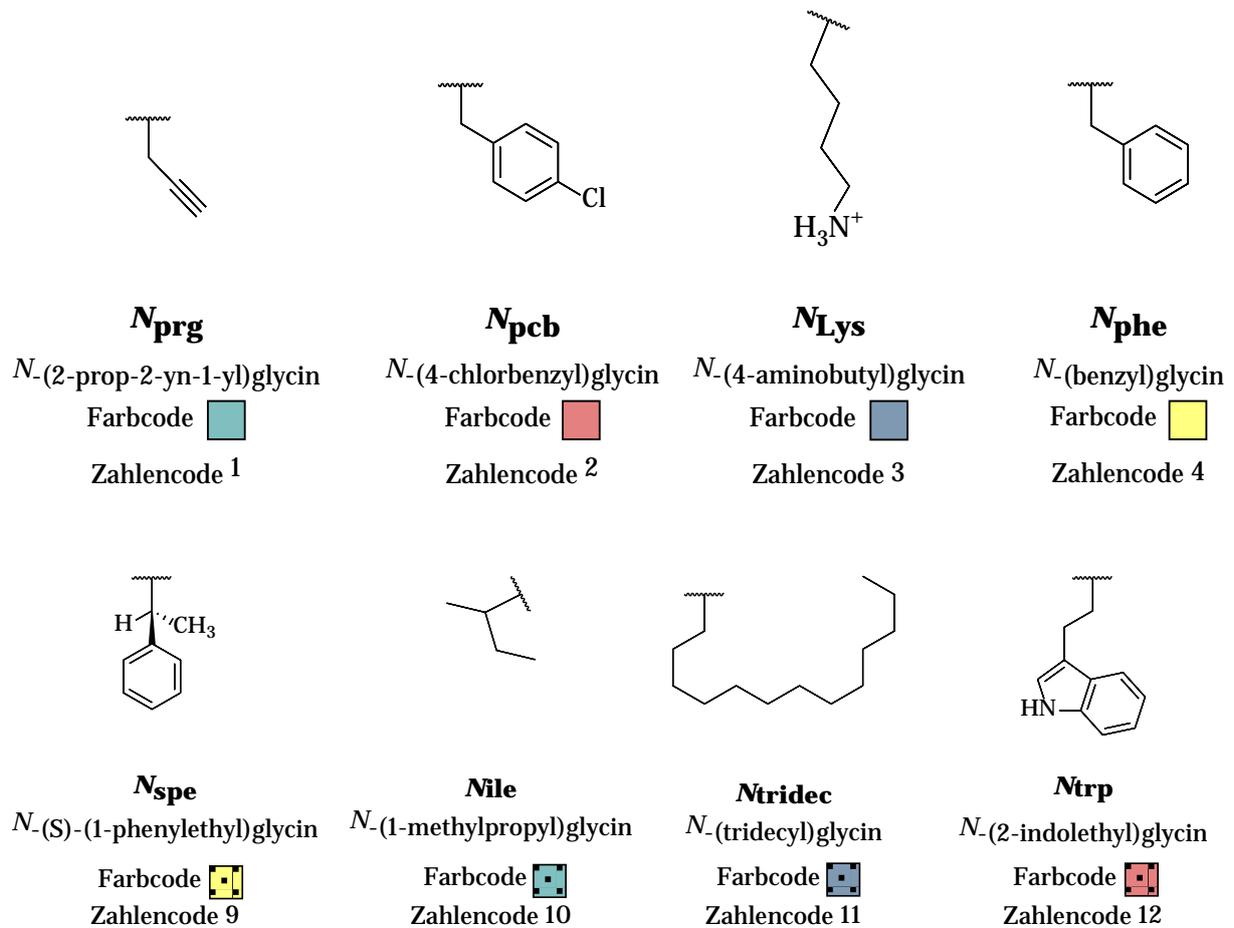
<sup>a</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 22

<sup>b</sup> MW, Molekulargewicht

<sup>c</sup> ✓ Peptoid vorhanden, × Peptoid nicht vorhanden

### 2.1.5 Peptoid Pentamer, Nonamere, Undekamere und Dodekamere

Die Peptoidbibliothek Pentamer, Nonamere, Undekamere und Dodekamere besteht aus einem Pentamer, zwei Nonameren, einem Undekamer und drei Dodekameren. Dabei handelt es sich bei den Dodekameren 422 und 423 um Verdreifachungen der antimikrobiell aktiven Tetramere 198 und 200 aus Peptoidbibliothek 1. Die Peptide 418, 419, 420, 421 und 424 sind Peptide aus dem Labor von Dr. Annelise Barron (Stanford University, USA). Für diese Peptoidbibliothek wurden die Seitenketten *N*-(2-prop-2-yn-1-yl)glycin (*Nprg*), *N*-(4-chlorobenzyl)glycin (*Npcb*), *N*-(4-aminobutyl)glycin (*Nlys*), *N*-(benzyl)glycine (*Nphe*), *N*-(*S*)-(1-phenylethyl)glycin (*Nspe*), *N*-(1-methylpropyl)glycin (*Nile*), *N*-(tridecyl)glycin (*Ntridec*) und *N*-(2-indolethyl)glycin (*Ntrp*) verwendet. Die Strukturen der Seitenketten sind in Abbildung 17 dargestellt. Das Amin *Nspe* repräsentiert die unpolare, hydrophobe Aminosäure Phenylalanin. Im Gegensatz zu *Nphe* ist *Nspe* chiral und bietet dadurch die Möglichkeit der Ausbildung einer Sekundärstruktur des Peptoids. Die Seitenkette *Ntrp* ahmt die unpolare und hydrophobe Aminosäure Tryptophan nach. *Npcb* aus Peptoidbibliothek 1 zeigte eine gute antimikrobielle Aktivität und dient als Mimikry für chlorhaltige Antibiotika.

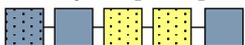
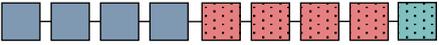
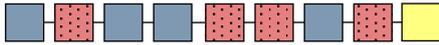
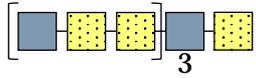
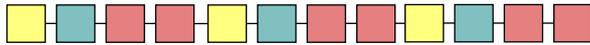
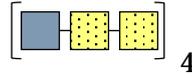


**Abbildung 17:** Darstellung von Struktur, Abkürzung, Strukturname, Farbcode und Zahlencode der verwendeten Seitenketten in der Peptoidbibliothek Pentamer, Nonamere, Undekamer und Dodekamere. Für die Synthese wurden die Seitenketten *N*-(2-prop-2-yn-1-yl)glycin (N<sub>prg</sub>, Farbcode grün, Zahlencode 1), *N*-(4-chlorobenzyl)glycin (N<sub>pcb</sub>, Farbcode grün, Zahlencode 2), *N*-(4-aminobutyl)glycin (N<sub>Lys</sub>, Farbcode blau, Zahlencode 3), *N*-(benzyl)glycine (N<sub>phe</sub>, Farbcode gelb, Zahlencode 4), *N*-(S)-(1-phenylethyl)glycin (N<sub>spe</sub>, Farbcode gelb schraffiert, Zahlencode 9), *N*-(1-methylpropyl)glycin (N<sub>ile</sub>, Farbcode grün schraffiert, Zahlencode 10), *N*-(tridecyl)glycin (N<sub>tridec</sub>, Farbcode blau schraffiert, Zahlencode 11) und *N*-(2-indolethyl)glycin (N<sub>trp</sub>, Farbcode rot schraffiert, Zahlencode 12) verwendet.

Die Peptoidbibliothek aus Multimeren enthält 7 Peptide, die mittels der Submonomermethode mit einem vollautomatischen Peptidsynthesizer synthetisiert wurden. Die Peptide wurden mit 95% TFA vom Harz abgespalten und mit MALDI identifiziert. Alle Peptide konnten identifiziert werden und sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Diese Peptoidbibliothek wurde nicht Fluoreszenz markiert. Die Ausbeute nach Reinigung mittels HPLC betrug durchschnittlich 36%.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4:** Überblick über die Peptoidbibliothek Pentamer, Nonamere, Undekamer, Dodekamere. Peptoidnummer, Sequenz, Farbcode, Zahlencode, Molekulargewicht der jeweiligen Peptide. Erfolgreich synthetisierte und durch MALDI-TOF Massenspektrometrie identifizierte Peptide sind mit einem ✓ markiert. Peptide die nicht identifiziert werden konnten sind mit einem × markiert.

Nr.	Sequenz/ Farbcode <sup>a</sup>	Zahlen code	MW <sup>b</sup> [g/mol]	Peptoid vor- handen <sup>c</sup> (✓/×)
<b>Pentamer</b>				
418	H-Ntridec-NLys-Nspe-Nspe-NLys-NH <sub>2</sub> 	11 3 9 9 3	835,19	✓
<b>Nonamere</b>				
419	H-Mys-Mys-Mys-Mys-Ntrp-Ntrp-Ntrp-Ntrp-Nile-NH <sub>2</sub> 	3 3 3 3 12 12 12 12 10	1443,86	✓
420	H-Mys-Ntrp-Mys-Mys-Ntrp-Ntrp-Mys-Ntrp-Nphe-NH <sub>2</sub> 	3 12 3 3 12 12 3 12 4	1477,87	✓
<b>Undekamere</b>				
421	H-(NLys-Nspe-Nspe) <sub>3</sub> -NLys-Nspe NH <sub>2</sub> 	(3 9 9) <sub>3</sub> 9	1658,16	✓
<b>Dodekamere</b>				
422	H-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-Nphe-Nprg- Npcb-Npcb-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-NH <sub>2</sub> 	4 1 2 2 4 1 2 2 4 1 2 2	1833,58	✓
423	H-Nphe-Nprg-Nprg-Nphe-Nphe-Nprg- Nprg-Nphe-Nphe-Nprg-Nprg-NH <sub>2</sub> 	4 1 2 4 4 1 2 4 4 1 2 4	1730,25	✓
424	H-(NLys-Nspe-Nspe) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> 	3 9 9 3 9 9 3 9 9 3 9 9	1819,36	✓

<sup>a</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 22.

<sup>b</sup> MW, Molekulargewicht.

<sup>c</sup> ✓ Peptoid vorhanden, × Peptoid nicht vorhanden.

## 2.2 Antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus*

Wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben verlieren konservative Antibiotika aufgrund von Resistenzbildungen sukzessive ihre Effektivität gegen viele Pathogene. Aufgrund dieser Abwärtsspirale muss eine Alternative zu herkömmlichen Therapien entwickelt werden. Peptoide stellen aufgrund ihrer Eigenschaften, wie u.a. der erhöhte Bioverfügbarkeit und Biostabilität, eine mögliche Lösung der Problematik dar. Daher wurden Peptoidbibliotheken (siehe Kapitel 2.1) erstellt, um die antimikrobiellen Eigenschaften zu untersuchen. Alle Peptoidbibliotheken wurden auf die antimikrobielle Aktivität gegen das gram-positive Bakterium *S. aureus* ATCC 29737 untersucht.

### 2.2.1 Antimikrobielle Aktivität der Peptoidbibliothek 1 gegen *Staphylococcus aureus*

In Peptoidbibliothek 1 konnten 234 Peptoide erfolgreich synthetisiert werden (siehe Kapitel 2.1.1) und wurden auf ihre antimikrobielle Aktivität gegen den gram-positiven Erreger *S. aureus* ATCC 29737 überprüft. Dafür wurden Bakterienkulturen mit dem jeweiligen Peptoid behandelt und anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen. Aus den gemessenen Werten wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) ermittelt. Dabei entspricht der MHK<sub>90</sub> Wert der Konzentration, bei der im Vergleich zur Kontrolle 90% weniger Wachstum stattgefunden hat. Die antimikrobielle Aktivität ist in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5:** Peptoidnummer, Sequenz, Molekulargewicht und antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 29737 der Peptoide in Peptoidbibliothek 1.

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
1	<i>Nprg-Nprg-Nprg-Nprg</i>	822,5	>200	>164,5
2	<i>Nprg-Nprg-Nprg-Npcb</i>	908,5	ND <sup>d</sup>	ND
3	<i>Nprg-Nprg-Nprg-Mys</i>	855,6	>200	>171,1
4	<i>Nprg-Nprg-Nprg-Nphe</i>	874,5	>200	>174,9
5	<i>Nprg-Nprg-Npcb-Nprg</i>	908,5	50	45,4
6	<i>Nprg-Nprg-Npcb-Npcb</i>	994,4	100	99,4
7	<i>Nprg-Nprg-Npcb-Mys</i>	941,5	ND	ND
8	<i>Nprg-Nprg-Npcb-Nphe</i>	960,5	25	24

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
9	<i>Nprg-Nprg-Mys-Nprg</i>	855,6	>200	>171,1
10	<i>Nprg-Nprg-Mys-Npcb</i>	941,5	>200	>188,3
11	<i>Nprg-Nprg-Mys-Mys</i>	888,6	>200	>177,7
12	<i>Nprg-Nprg-Mys-Nphe</i>	907,6	>200	>181,5
13	<i>Nprg-Nprg-Nphe-Nprg</i>	874,5	>200	>174,9
14	<i>Nprg-Nprg-Nphe-Npcb</i>	960,5	50	48
15	<i>Nprg-Nprg-Nphe-Mys</i>	907,6	>200	>181,4
16	<i>Nprg-Nprg-Nphe-Nphe</i>	926,6	ND	ND
17	<i>Nprg-Npcb-Nprg-Nprg</i>	908,5	100	90,9
18	<i>Nprg-Npcb-Nprg-Npcb</i>	994,5	100	99,4
19	<i>Nprg-Npcb-Nprg-Mys</i>	941,5	200	188,3
20	<i>Nprg-Npcb-Nprg-Nphe</i>	960,5	50	48,0
21	<i>Nprg-Npcb-Npcb-Nprg</i>	994,5	100	99,4
22	<i>Nprg-Npcb-Npcb-Npcb</i>	1080,5	50	54,0
23	<i>Nprg-Npcb-Npcb-Mys</i>	1029,5	>200	>205,9
24	<i>Nprg-Npcb-Npcb-Nphe</i>	1046,5	200	209,3
25	<i>Nprg-Npcb-Mys-Nprg</i>	941,5	>200	>188,3
26	<i>Nprg-Npcb-Mys-Npcb</i>	1027,5	>200	>205,5
27	<i>Nprg-Npcb-Mys-Mys</i>	974,6	>200	>194,9
28	<i>Nprg-Npcb-Mys-Nphe</i>	993,6	>200	>198,7
29	<i>Nprg-Npcb-Nphe-Nprg</i>	960,5	200	192,1
30	<i>Nprg-Npcb-Nphe-Npcb</i>	1046,5	200	209,3
31	<i>Nprg-Npcb-Nphe-Mys</i>	993,6	>200	>198,7
32	<i>Nprg-Npcb-Nphe-Nphe</i>	1012,5	ND	ND
33	<i>Nprg-Mys-Nprg-Nprg</i>	855,5	>200	>171,1
34	<i>Nprg-Mys-Nprg-Npcb</i>	941,5	ND	ND
35	<i>Nprg-Mys-Nprg-Mys</i>	888,6	>200	>177,6
36	<i>Nprg-Mys-Nprg-Nphe</i>	907,6	>200	>181,5
37	<i>Nprg-Mys-Npcb-Nprg</i>	941,53	200	188,3
38	<i>Nprg-Mys-Npcb-Npcb</i>	1027,5	50	51,4
39	<i>Nprg-Mys-Npcb-Mys</i>	974,6	>200	>194,9
40	<i>Nprg-Mys-Npcb-Nphe</i>	993,6	100	99,4
41	<i>Nprg-Mys-Mys-Nprg</i>	888,6	>200	>177,7
42	<i>Nprg-Mys-Mys-Npcb</i>	974,6	>200	>194,9
43	<i>Nprg-Mys-Mys-Mys</i>	921,6	ND	ND

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
44	<i>Nprg-Mys-Mys-Nphe</i>	940,6	>200	>188,1
45	<i>Nprg-Mys-Nphe-Nprg</i>	907,6	>200	>181,5
46	<i>Nprg-Mys-Nphe-Npcb</i>	993,6	>200	>198,7
47	<i>Nprg-Mys-Nphe-Mys</i>	940,6	>200	>188,1
48	<i>Nprg-Mys-Nphe-Nphe</i>	959,6	>200	>191,9
49	<i>Nprg-Nphe-Nprg-Nprg</i>	874,5	>200	>174,9
50	<i>Nprg-Nphe-Nprg-Npcb</i>	960,5	50	48
51	<i>Nprg-Nphe-Nprg-Mys</i>	907,6	>200	>181,5
52	<i>Nprg-Nphe-Nprg-Nphe</i>	926,6	100	92,7
53	<i>Nprg-Nphe-Npcb-Nprg</i>	960,5	ND	ND
54	<i>Nprg-Nphe-Npcb-Npcb</i>	1046,5	6,3	6,54
55	<i>Nprg-Nphe-Npcb-Mys</i>	993,6	>200	>198,6
56	<i>Nprg-Nphe-Npcb-Nphe</i>	1012,5	>200	>202,5
57	<i>Nprg-Nphe-Mys-Nprg</i>	907,6	ND	ND
58	<i>Nprg-Nphe-Mys-Npcb</i>	993,6	>200	>198,7
59	<i>Nprg-Nphe-Mys-Mys</i>	940,6	>200	>188,1
60	<i>Nprg-Nphe-Mys-Nphe</i>	959,6	>200	>191,9
61	<i>Nprg-Nphe-Nphe-Nprg</i>	926,6	100	92,7
62	<i>Nprg-Nphe-Nphe-Npcb</i>	1012,5	100	101,3
63	<i>Nprg-Nphe-Nphe-Mys</i>	959,6	>200	>191,9
64	<i>Nprg-Nphe-Nphe-Nphe</i>	978,6	100	97,86
65	<i>Npcb-Nprg-Nprg-Nprg</i>	908,5	200	181,7
66	<i>Npcb-Nprg-Nprg-Npcb</i>	994,5	50	49,7
67	<i>Npcb-Nprg-Nprg-Mys</i>	941,5	>200	>188,3
68	<i>Npcb-Nprg-Nprg-Nphe</i>	960,5	100	96
69	<i>Npcb-Nprg-Npcb-Nprg</i>	994,5	100	99,5
70	<i>Npcb-Nprg-Npcb-Npcb</i>	1080,5	50	54
71	<i>Npcb-Nprg-Npcb-Mys</i>	1027,5	100	102,8
72	<i>Npcb-Nprg-Npcb-Nphe</i>	1046,5	6,3	6,5
73	<i>Npcb-Nprg-Mys-Nprg</i>	941,5	>200	>188,3
74	<i>Npcb-Nprg-Mys-Npcb</i>	1027,5	>200	>205,5
75	<i>Npcb-Nprg-Mys-Mys</i>	974,6	>200	>194,9
76	<i>Npcb-Nprg-Mys-Nphe</i>	993,6	200	198,7
77	<i>Npcb-Nprg-Nphe-Nprg</i>	960,5	25	24
78	<i>Npcb-Nprg-Nphe-Npcb</i>	1046,5	ND	ND

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
79	<i>Npcb-Nprg-Nphe-Mys</i>	993,6	>200	>198,7
80	<i>Npcb-Nprg-Nphe-Nphe</i>	1012,5	100	101,3
81	<i>Npcb-Npcb-Nprg-Nprg</i>	994,5	25	24,9
82	<i>Npcb-Npcb-Nprg-Npcb</i>	1080,5	12,5	13,5
83	<i>Npcb-Npcb-Nprg-Mys</i>	1027,5	ND	ND
84	<i>Npcb-Npcb-Nprg-Nphe</i>	1046,5	50	52,3
85	<i>Npcb-Npcb-Npcb-Nprg</i>	1080,5	100	108
86	<i>Npcb-Npcb-Npcb-Npcb</i>	1166,5	100	116,7
87	<i>Npcb-Npcb-Npcb-Mys</i>	1113,5	100	111,4
88	<i>Npcb-Npcb-Npcb-Nphe</i>	1132,5	100	113,3
89	<i>Npcb-Npcb-Mys-Nprg</i>	1027,5	100	102,8
90	<i>Npcb-Npcb-Mys-Npcb</i>	1113,5	100	111,4
91	<i>Npcb-Npcb-Mys-Mys</i>	1060,6	ND	ND
92	<i>Npcb-Npcb-Mys-Nphe</i>	1079,6	25	27
93	<i>Npcb-Npcb-Nphe-Nprg</i>	1046,5	25	26,2
94	<i>Npcb-Npcb-Nphe-Npcb</i>	1132,5	100	113,25
95	<i>Npcb-Npcb-Nphe-Mys</i>	1079,5	>200	>215,9
96	<i>Npcb-Npcb-Nphe-Nphe</i>	1098,5	100	109,9
97	<i>Npcb-Mys-Nprg-Nprg</i>	941,5	ND	ND
98	<i>Npcb-Mys-Nprg-Npcb</i>	1027,5	>200	>205,4
99	<i>Npcb-Mys-Nprg-Mys</i>	974,6	>200	>194,9
100	<i>Npcb-Mys-Nprg-Nphe</i>	993,6	>200	>198,7
101	<i>Npcb-Mys-Npcb-Nprg</i>	1027,5	100	102,8
102	<i>Npcb-Mys-Npcb-Npcb</i>	1113,5	50	55,7
103	<i>Npcb-Mys-Npcb-Mys</i>	1060,6	100	106
104	<i>Npcb-Mys-Npcb-Nphe</i>	1079,6	100	108
105	<i>Npcb-Mys-Mys-Nprg</i>	974,6	200	194,9
106	<i>Npcb-Mys-Mys-Npcb</i>	1060,6	200	212,1
107	<i>Npcb-Mys-Mys-Mys</i>	1007,6	>200	>201,4
108	<i>Npcb-Mys-Mys-Nphe</i>	1026,6	ND	ND
109	<i>Npcb-Mys-Nphe-Nprg</i>	993,6	200	198,7
110	<i>Npcb-Mys-Nphe-Npcb</i>	1079,6	100	108
111	<i>Npcb-Mys-Nphe-Mys</i>	1026,6	>200	>205,32
112	<i>Npcb-Mys-Nphe-Nphe</i>	1045,6	50	52,3
113	<i>Npcb-Nphe-Nprg-Nprg</i>	960,5	100	96

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
114	<i>Npcb-Nphe-Nprg-Npcb</i>	1046,5	50	52,3
115	<i>Npcb-Nphe-Nprg-Mys</i>	993,6	100	99,4
116	<i>Npcb-Nphe-Nprg-Nphe</i>	1012,5	100	101,3
117	<i>Npcb-Nphe-Npcb-Nprg</i>	1046,5	>200	>209,3
118	<i>Npcb-Nphe-Npcb-Npcb</i>	1132,5	50	56,6
119	<i>Npcb-Nphe-Npcb-Mys</i>	1079,6	100	108
120	<i>Npcb-Nphe-Npcb-Nphe</i>	1098,5	25/50	55/27
121	<i>Npcb-Nphe-Mys-Nprg</i>	993,5	>200	>198,7
122	<i>Npcb-Nphe-Mys-Npcb</i>	1079,6	25	27
123	<i>Npcb-Nphe-Mys-Mys</i>	1026,6	>200	>205,2
124	<i>Npcb-Nphe-Mys-Nphe</i>	1045,6	100	104,6
125	<i>Npcb-Nphe-Nphe-Nprg</i>	1012,5	100	101,3
126	<i>Npcb-Nphe-Nphe-Npcb</i>	1098,5	100	109,9
127	<i>Npcb-Nphe-Nphe-Mys</i>	1045,6	>200	>209,1
128	<i>Npcb-Nphe-Nphe-Nphe</i>	1064,6	25	26,6
129	<i>Mys-Nprg-Nprg-Nprg</i>	855,5	>200	>171,1
130	<i>Mys-Nprg-Nprg-Npcb</i>	941,5	>200	>188,3
131	<i>Mys-Nprg-Nprg-Mys</i>	888,6	>200	>177,7
132	<i>Mys-Nprg-Nprg-Nphe</i>	907,6	>200	>181,5
133	<i>Mys-Nprg-Npcb-Nprg</i>	941,5	>200	>188,3
134	<i>Mys-Nprg-Npcb-Npcb</i>	1027,5	ND	ND
135	<i>Mys-Nprg-Npcb-Mys</i>	974,6	>200	>194,9
136	<i>Mys-Nprg-Npcb-Nphe</i>	993,6	200	198,7
137	<i>Mys-Nprg-Mys-Nprg</i>	888,6	>200	>177,7
138	<i>Mys-Nprg-Mys-Npcb</i>	974,6	>200	>194,9
139	<i>Mys-Nprg-Mys-Mys</i>	921,6	>200	>184,3
140	<i>Mys-Nprg-Mys-Nphe</i>	940,6	>200	>188,7
141	<i>Mys-Nprg-Nphe-Nprg</i>	907,6	>200	>181,5
142	<i>Mys-Nprg-Nphe-Npcb</i>	993,6	>200	>198,7
143	<i>Mys-Nprg-Nphe-Mys</i>	940,6	ND	ND
144	<i>Mys-Nprg-Nphe-Nphe</i>	959,6	200	191,9
145	<i>Mys-Npcb-Nprg-Nprg</i>	941,5	200	188,3
146	<i>Mys-Npcb-Nprg-Npcb</i>	1027,5	50	51,4
147	<i>Mys-Npcb-Nprg-Mys</i>	974,6	>200	>194,9
148	<i>Mys-Npcb-Nprg-Nphe</i>	993,6	50	49,7

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
149	<i>Mys-Npcb-Npcb-Nprg</i>	1027,5	100	102,8
150	<i>Mys-Npcb-Npcb-Npcb</i>	1113,5	50	55,7
151	<i>Mys-Npcb-Npcb-Mys</i>	1060,6	200	212,1
152	<i>Mys-Npcb-Npcb-Nphe</i>	1079,5	50	54
153	<i>Mys-Npcb-Mys-Nprg</i>	974,6	>200	>194,9
154	<i>Mys-Npcb-Mys-Npcb</i>	1060,5	>200	>212,1
155	<i>Mys-Npcb-Mys-Mys</i>	1007,6	>200	>201,5
156	<i>Mys-Npcb-Mys-Nphe</i>	1026,6	200	205,3
157	<i>Mys-Npcb-Nphe-Nprg</i>	993,6	200	198,7
158	<i>Mys-Npcb-Nphe-Npcb</i>	1079,6	100	108
159	<i>Mys-Npcb-Nphe-Mys</i>	1026,6	>200	>205,3
160	<i>Mys-Npcb-Nphe-Nphe</i>	1045,6	200	209,1
161	<i>Mys-Mys-Nprg-Nprg</i>	888,6	>200	>177,7
162	<i>Mys-Mys-Nprg-Npcb</i>	997,5	200	199,5
163	<i>Mys-Mys-Nprg-Mys</i>	921,6	>200	>184,2
164	<i>Mys-Mys-Nprg-Nphe</i>	940,6	ND	ND
165	<i>Mys-Mys-Npcb-Nprg</i>	974,6	>200	>194,9
166	<i>Mys-Mys-Npcb-Npcb</i>	1060,57	100	107
167	<i>Mys-Mys-Npcb-Mys</i>	1007,6	>200	>201,5
168	<i>Mys-Mys-Npcb-Nphe</i>	1026,6	>200	>205,3
169	<i>Mys-Mys-Mys-Nprg</i>	921,6	>200	>184,3
170	<i>Mys-Mys-Mys-Npcb</i>	1007,6	>200	>201,5
171	<i>Mys-Mys-Mys-Mys</i>	954,7	>200	>190,9
172	<i>Mys-Mys-Mys-Nphe</i>	973,7	>200	>194,7
173	<i>Mys-Mys-Nphe-Nprg</i>	940,6	ND	ND
174	<i>Mys-Mys-Nphe-Npcb</i>	1026,6	200	205,3
175	<i>Mys-Mys-Nphe-Mys</i>	973,7	>200	>194,7
176	<i>Mys-Mys-Nphe-Nphe</i>	992,7	>200	>198,5
177	<i>Mys-Nphe-Nprg-Nprg</i>	907,6	>200	>181,5
178	<i>Mys-Nphe-Nprg-Npcb</i>	993,6	200	198,7
179	<i>Mys-Nphe-Nprg-Mys</i>	940,6	>200	>188,1
180	<i>Mys-Nphe-Nprg-Nphe</i>	959,6	200	191,9
181	<i>Mys-Nphe-Npcb-Nprg</i>	993,6	50	49,7
182	<i>Mys-Nphe-Npcb-Npcb</i>	1079,6	50	46,3
183	<i>Mys-Nphe-Npcb-Mys</i>	1026,6	>200	>205,3

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
184	<i>Mys-Nphe-Npcb-Nphe</i>	1045,6	100	104,5
185	<i>Mys-Nphe-Mys-Nprg</i>	940,6	ND	ND
186	<i>Mys-Nphe-Mys-Npcb</i>	1026,6	>200	>205,3
187	<i>Mys-Nphe-Mys-Mys</i>	973,7	>200	>194,7
188	<i>Mys-Nphe-Mys-Nphe</i>	992,7	>200	>198,5
189	<i>Mys-Nphe-Nphe-Nprg</i>	959,6	200	191,9
190	<i>Mys-Nphe-Nphe-Npcb</i>	1045,6	50	52,3
191	<i>Mys-Nphe-Nphe-Mys</i>	992,7	>200	>198,5
192	<i>Mys-Nphe-Nphe-Nphe</i>	1011,6	200	202,3
193	<i>Nphe-Nprg-Nprg-Nprg</i>	874,5	200	174,9
194	<i>Nphe-Nprg-Nprg-Npcb</i>	960,5	100	96
195	<i>Nphe-Nprg-Nprg-Mys</i>	907,6	>200	>181,5
196	<i>Nphe-Nprg-Nprg-Nphe</i>	926,6	25	23,2
197	<i>Nphe-Nprg-Npcb-Nprg</i>	960,5	50	48
198	<i>Nphe-Nprg-Npcb-Npcb</i>	1046,5	6,3	6,5
199	<i>Nphe-Nprg-Npcb-Mys</i>	993,6	200	198,7
200	<i>Nphe-Nprg-Npcb-Nphe</i>	1012,6	6,3	6,3
201	<i>Nphe-Nprg-Mys-Nprg</i>	907,6	200	181,5
202	<i>Nphe-Nprg-Mys-Npcb</i>	993,6	200	198,7
203	<i>Nphe-Nprg-Mys-Mys</i>	940,6	>200	>188,1
204	<i>Nphe-Nprg-Mys-Nphe</i>	959,6	200	191,9
205	<i>Nphe-Nprg-Nphe-Nprg</i>	926,6	100	92,7
206	<i>Nphe-Nprg-Nphe-Npcb</i>	1012,5	100	101,3
207	<i>Nphe-Nprg-Nphe-Mys</i>	959,6	>200	>191,9
208	<i>Nphe-Nprg-Nphe-Nphe</i>	978,6	50	48,9
209	<i>Nphe-Npcb-Nprg-Nprg</i>	960,5	ND	ND
210	<i>Nphe-Npcb-Nprg-Npcb</i>	1046,5	50	52,3
211	<i>Nphe-Npcb-Nprg-Mys</i>	993,6	200	198,7
212	<i>Nphe-Npcb-Nprg-Nphe</i>	1012,5	100	101,3
213	<i>Nphe-Npcb-Npcb-Nprg</i>	1046,5	ND	ND
214	<i>Nphe-Npcb-Npcb-Npcb</i>	1132,5	100	113,2
215	<i>Nphe-Npcb-Npcb-Mys</i>	1079,6	100	108
216	<i>Nphe-Npcb-Npcb-Nphe</i>	1098,5	25	27,5
217	<i>Nphe-Npcb-Mys-Nprg</i>	993,6	200	198,7
218	<i>Nphe-Npcb-Mys-Npcb</i>	1079,6	100	108

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
219	Nphe-Npcb-Mys-Mys	1026,6	>200	>205,3
220	Nphe-Npcb-Mys-Nphe	1045,6	100	104,6
221	Nphe-Npcb-Nphe-Nprg	1012,5	50	50,6
222	Nphe-Npcb-Nphe-Npcb	1098,5	ND	ND
223	Nphe-Npcb-Nphe-Mys	1045,6	200	209,1
224	Nphe-Npcb-Nphe-Nphe	1064,6	100	106,5
225	Nphe-Mys-Nprg-Nprg	907,6	>200	>181,5
226	Nphe-Mys-Nprg-Npcb	993,56	200	198,7
227	Nphe-Mys-Nprg-Mys	940,6	>200	>188,1
228	Nphe-Mys-Nprg-Nphe	959,6	200	191,9
229	Nphe-Mys-Npcb-Nprg	993,6	200	198,7
230	Nphe-Mys-Npcb-Npcb	1079,6	50	54
231	Nphe-Mys-Npcb-Mys	1026,6	>200	>205,3
232	Nphe-Mys-Npcb-Nphe	1045,6	200	209,1
233	Nphe-Mys-Mys-Nprg	940,6	>200	>188,1
234	Nphe-Mys-Mys-Npcb	1026,6	200	205,3
235	Nphe-Mys-Mys-Mys	973,7	>200	>194,7
236	Nphe-Mys-Mys-Nphe	992,6	>200	>198,5
237	Nphe-Mys-Nphe-Nprg	959,6	200	191,9
238	Nphe-Mys-Nphe-Npcb	1045,6	100	104,6
239	Nphe-Mys-Nphe-Mys	992,6	>200	>198,5
240	Nphe-Mys-Nphe-Nphe	1011,6	200	202,3
241	Nphe-Nphe-Nprg-Nprg	926,6	100	92,7
242	Nphe-Nphe-Nprg-Npcb	1012,5	100	101,3
243	Nphe-Nphe-Nprg-Mys	959,6	>200	>191,92
244	Nphe-Nphe-Nprg-Nphe	978,6	100	97,9
245	Nphe-Nphe-Npcb-Nprg	1012,5	100	101,2
246	Nphe-Nphe-Npcb-Npcb	1098,5	25	27,5
247	Nphe-Nphe-Npcb-Mys	1045,6	200	209,1
248	Nphe-Nphe-Npcb-Nphe	1064,6	50	53,2
249	Nphe-Nphe-Mys-Nprg	959,6	>200	>191,9
250	Nphe-Nphe-Mys-Npcb	1045,6	200	209,1
251	Nphe-Nphe-Mys-Mys	992,7	>200	>198,5
252	Nphe-Nphe-Mys-Nphe	1011,6	>200	>202,3
253	Nphe-Nphe-Nphe-Nprg	978,6	100	97,9

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[ $\mu$ M]	[ $\mu$ g/ml]
254	Nphe-Nphe-Nphe-Npcb	1064,5	ND	ND
255	Nphe-Nphe-Nphe-Mys	1011,6	>200	>202,3
256	Nphe-Nphe-Nphe-Nphe	1030,6	100	103
Vancomycin	C <sub>66</sub> H <sub>75</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>24</sub>	1449,3	1,4	2
Tobramycin	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	467,5	0,6	0,3
Ciprofloxacin	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	331,3	0,3	0,1
Imipenem	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	317,4	0,3	0,1

<sup>a</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 22.

<sup>b</sup> MW, Molekulargewicht.

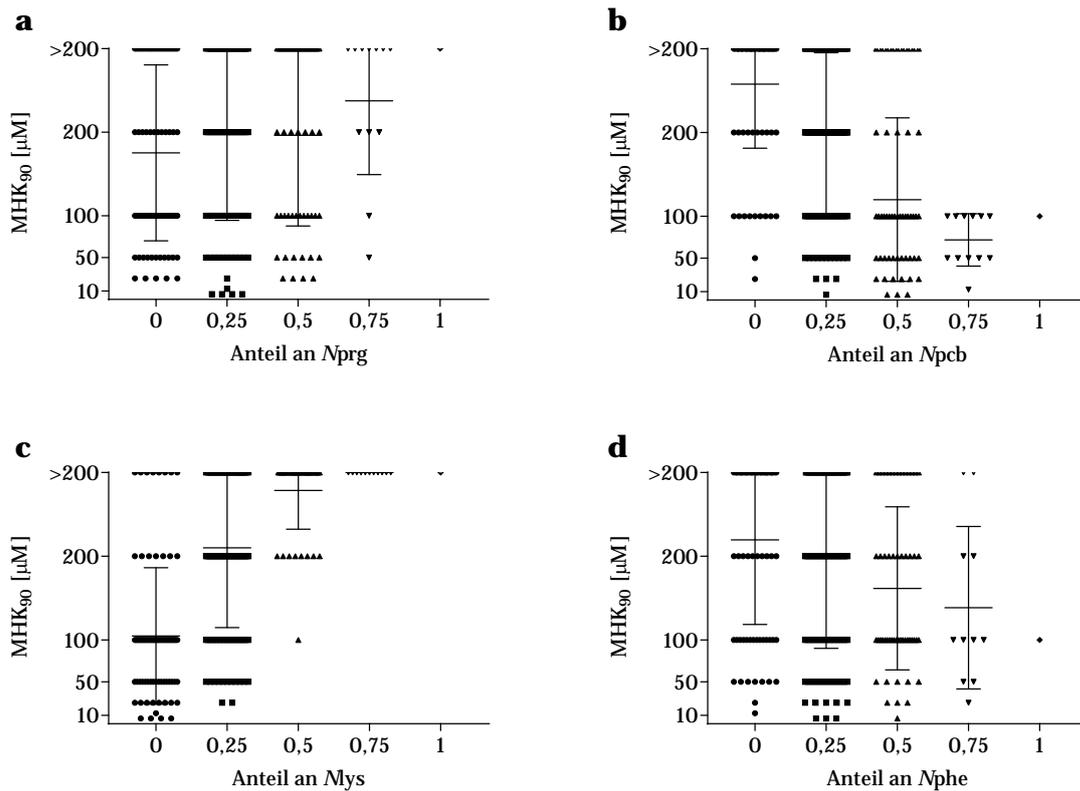
<sup>c</sup> MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

<sup>d</sup> ND, Nicht determiniert, da Synthese nicht erfolgreich.

Peptide mit einem MHK<sub>90</sub>-Wert  $\leq 6,3$  sind grau markiert.

100 von 234 Peptoiden zeigen keine antimikrobielle Aktivität (MHK<sub>90</sub> >200  $\mu$ M) gegen *S. aureus* 29737. Bei 96 Peptide konnte eine schwache antimikrobielle Aktivität bei 200  $\mu$ M festgestellt werden. Für 52 Peptide konnte eine antimikrobielle Wirkung bei 100  $\mu$ M identifiziert werden. Eine antimikrobielle Aktivität von 50  $\mu$ M konnte bei 26 Peptoiden bestimmt werden. Bei 15 Peptoiden konnte eine antimikrobielle Aktivität bei 25  $\mu$ M festgestellt werden. Das Peptoid 82 wies eine antimikrobielle Wirkung von 12,5  $\mu$ M auf. 4 von 234 Peptoiden hatten eine starke antimikrobielle Wirkung von 6,3  $\mu$ M. Insgesamt konnten bei 2% der Peptide in Peptoidbibliothek 2 eine antimikrobiell aktive Wirkung gegen *S. aureus* ATCC 29737 von  $\leq 12,5$   $\mu$ M festgestellt werden. Im Vergleich zu den Kontrollantibiotika Vancomycin, Tobramycin, Ciprofloxacin und Imipenem liegt die antimikrobielle Aktivität bzw. der MHK<sub>90</sub> Wert der untersuchten Peptide zwar immer noch über denen der Antibiotika, dennoch stellt ein MHK<sub>90</sub>-Wert von unter 25  $\mu$ M eine geeignete Basis für weitere Untersuchungen dar. Um die Verteilung der Seitenketten der Peptide in Bezug auf die antimikrobielle Aktivität beurteilen zu können, wurde die Aktivität in Bezug auf die Anteile der Seitenketten in Box Plots dargestellt (Abbildung 18).

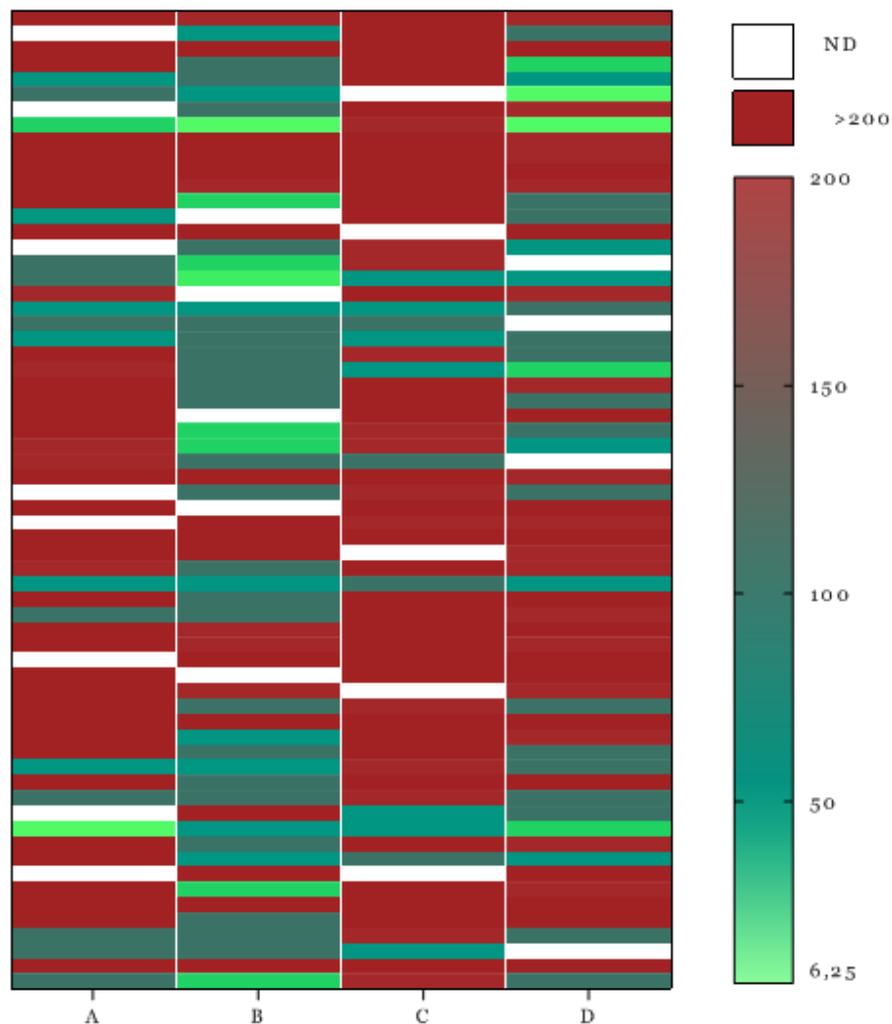
## 2. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 18:** Anteile der einzelnen Seitenketten Nprg (a), Npcb (b), Mys (c), Nphe (d) in Bezug auf ihre antimikrobielle Aktivität durch die Darstellung eines Box-Plots.

Die Seitenkette Nprg (Abbildung 18 a) besaß vereinzelt eine starke antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 2937 bei einem Anteil von 25%. Ab einem Gehalt von mehr als 75% verlor das Peptoid an antimikrobieller Wirkung. Der Baustein Npcb (Abbildung 18 b) zeigte eine antimikrobielle Aktivität bei einem Anteil von 25-50%. Nur ein Peptoid mit einem Npcb Gehalt von 75% wies eine antimikrobielle Wirkung von 6,3  $\mu\text{M}$  auf. Dabei war bei einem Npcb Anteil von 75% der MHK<sub>90</sub> Wert bei keinem dieser Peptoide über 100  $\mu\text{M}$ . Obwohl in der Regel amphiphile Peptoide antimikrobielle Eigenschaften besitzen, zeigten Peptoide mit der Seitenketten Mys (Abbildung 18 c) keine antimikrobielle Wirkung. Bei einem Gehalt von 0% war die antimikrobielle Aktivität am höchsten. Die Seitenkette Nphe (Abbildung 18 d) zeigte keine eindeutige Verteilung in Bezug auf die antimikrobielle Wirkung. Sowohl bei einem Anteil von 0%, 25%, 50% und 75% sind starke antimikrobielle Aktiven Peptoide eingruppiert. Zusammenfassend ließ sich schließen, dass die lipophilen Seitenketten Nprg, Npcb und Nphe zur antimikrobiellen Aktivität beitragen. Hingegen besaß Mys keine signifikante Relevanz in Bezug zur antimikrobiellen Wirkung.

Die Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 29737 wurde in Form einer Heatmap erfasst (Abbildung 19). Dabei stellte die Farbe Hellgrün eine starke antimikrobielle Aktivität dar. Je dunkler und roter das Feld desto weniger ist das Peptoid antimikrobiell aktiv. Die Aufschlüsselung der Heatmap ist im Appendix in Abbildung 45 dargestellt. Auch hier zeigte sich, dass Peptoide mit den Seitenketten *Nprg*, *Npcb* und *Nphe* antimikrobiell wirken. Die Seitenkette *Mys* trug nicht zur antimikrobiellen Aktivität bei.



**Abbildung 19:** Heatmap der antimikrobiellen Aktivität der Peptoidbibliothek 1. Helles Grün beschreibt eine starke antimikrobielle Aktivität. Dunkles Grün bis hin zu Dunkelrot beschreibt eine schwache bis keine antimikrobielle Aktivität. Weiße Felder stellen Peptoide dar, die nicht determiniert wurden. Reihe A: Peptoide 1-64, Spalte B: Peptoide 65-128, Spalte C: Peptoide 129-192, Spalte D: Peptoide 193-256. Aufschlüsselung der Sequenzen ist im Appendix in Abbildung 45 zusammengefasst.

### 2.2.2 Antimikrobielle Aktivität der Peptoidbibliothek 2 gegen *Staphylococcus aureus*

In Peptoidbibliothek 2 konnten 67 Peptide erfolgreich synthetisiert werden (siehe Kapitel 2.1.2) und wurden auf ihre antimikrobielle Aktivität gegen den gram-positiven Erreger *S. aureus* ATCC 29737 überprüft. Dafür wurden Bakterienkulturen mit dem jeweiligen Peptoid behandelt und anschließend wurde die OD bei 600 nm gemessen. Die antimikrobielle Aktivität ist in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6:** Peptoidnummer, Sequenz, Molekulargewicht und antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 29737 der Peptide in Peptoidbibliothek 2.

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
257	Ntetradec-Nphe-Nphe-Nphe-RhodB	1137,5	ND <sup>d</sup>	ND
258	Ntetradec-Nphe-Nphe-Npfb-RhodB	1155,5	ND	ND
259	Ntetradec-Nphe-Nphe-Nphb-RhodB	1153,5	25	28,84
260	Ntetradec-Nphe-Npfb-Nphe-RhodB	1155,5	ND	ND
261	Ntetradec-Nphe-Npfb-Npfb-RhodB	1173,5	ND	ND
262	Ntetradec-Nphe-Npfb-Nphb-RhodB	1171,5	ND	ND
263	Ntetradec-Nphe-Nphb-Nphe-RhodB	1153,5	50	57,7
264	Ntetradec-Nphe-Nphb-Npfb-RhodB	1171,5	25	29,2
265	Ntetradec-Nphe-Nphb-Nphb-RhodB	1169,5	ND	ND
266	Ntetradec-Npfb-Nphe-Nphe-RhodB	1155,5	ND	ND
267	Ntetradec-Npfb-Nphe-Npfb-RhodB	1173,5	25	29,3
268	Ntetradec-Npfb-Nphe-Nphb-RhodB	1171,5	ND	ND
269	Ntetradec-Npfb-Npfb-Nphe-RhodB	1173,5	ND	ND
270	Ntetradec-Npfb-Npfb-Npfb-RhodB	1191,5	ND	ND
271	Ntetradec-Npfb-Npfb-Nphb-RhodB	1189,5	ND	ND
272	Ntetradec-Npfb-Nphb-Nhe-RhodB	1171,5	ND	ND
273	Ntetradec-Npfb-Nphb-Npfb-RhodB	1189,5	50	59,5
274	Ntetradec-Npfb-Nphb-Nphb-RhodB	1187,5	>100	>118,8
275	Ntetradec-Nphb-Nphe-Nphe-RhodB	1153,5	>100	>115,4
276	Ntetradec-Nphb-Nphe-Npfb-RhodB	1171,5	>100	>117,2
277	Ntetradec-Nphb-Nphe-Nphb-RhodB	1169,5	>100	>116,6
278	Ntetradec-Nphb-Npfb-Nhe-RhodB	1171,5	>100	>117,2
279	Ntetradec-Nphb-Npfb-Npfb-RhodB	1189,5	>100	119
280	Ntetradec-Nphb-Npfb-Nphb-RhodB	1187,5	>100	>118,8

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
281	<i>N</i> tetradec- <i>N</i> phb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phe-RhodB	1169,5	25	29,2
282	<i>N</i> tetradec- <i>N</i> phb- <i>N</i> phb- <i>N</i> pfb-RhodB	1187,5	>100	>118,8
283	<i>N</i> tetradec- <i>N</i> phb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phb-RhodB	1185,5	>100	>118,6
284	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phe- <i>N</i> phe-RhodB	1049,3	3,1	3,3
285	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phe- <i>N</i> pfb-RhodB	1067,3	3,1	3,3
286	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phe- <i>N</i> phb-RhodB	1065,3	12,5	13,3
287	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phe-RhodB	1067,3	3,1	3,34
288	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb-RhodB	1085,3	3,1	3,4
289	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phb-RhodB	1083,3	3,1	3,4
290	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phb- <i>N</i> phe-RhodB	1065,3	6,3	6,7
291	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phb- <i>N</i> pfb-RhodB	1083,3	6,3	6,8
292	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phb- <i>N</i> phb-RhodB	1081,3	6,3	6,8
293	<i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phe-RhodB	1067,3	1,6	1,7
294	<i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> pfb-RhodB	1085,3	3,1	3,4
295	<i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phb-RhodB	1083,3	3,1	3,4
296	<i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phe-RhodB	1085,3	3,1	3,4
297	<i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb-RhodB	1103,3	1,6	1,7
298	<i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phb-RhodB	1101,3	12,5	13,8
299	<i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phe-RhodB	1083,3	12,5	13,5
300	<i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phb- <i>N</i> pfb-RhodB	1101,3	12,5	13,8
301	<i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phb-RhodB	1099,3	ND	ND
302	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phe-RhodB	1065,3	6,3	6,7
303	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phe- <i>N</i> pfb-RhodB	1083,3	3,1	3,4
304	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phb-RhodB	1081,3	6,3	6,8
305	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phe-RhodB	1083,3	6,3	6,8
306	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb-RhodB	1101,26	3,1	3,45
307	<i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phb-RhodB	1099,3	12,5	13,7
308	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phe-RhodB	1081,3	6,3	6,8
309	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phb- <i>N</i> pfb-RhodB	1099,3	25	27,5
310	<i>N</i> pfb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phb- <i>N</i> phb-RhodB	1097,3	12,5	13,7
311	<i>N</i> phb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phe- <i>N</i> phe-RhodB	1047,3	6,3	6,6
312	<i>N</i> phb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phe- <i>N</i> pfb-RhodB	1065,3	6,3	6,7
313	<i>N</i> phb- <i>N</i> phe- <i>N</i> phe- <i>N</i> phb-RhodB	1063,3	12,5	13,3
314	<i>N</i> phb- <i>N</i> phe- <i>N</i> pfb- <i>N</i> phe-RhodB	1065,3	3,1	3,3
315	<i>N</i> phb- <i>N</i> phe- <i>N</i> pfb- <i>N</i> pfb-RhodB	1083,3	3,1	3,4

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
316	Nphb-Nphe-Npfb-Nphb-RhodB	1081,3	6,3	6,8
317	Nphb-Nphe-Nphb-Nphe-RhodB	1063,3	6,3	6,7
318	Nphb-Nphe-Nphb-Npfb-RhodB	1081,3	3,1	3,4
319	Nphb-Nphe-Nphb-Nphb-RhodB	1079,3	25	27
320	Nphb-Npfb-Nphe-Nphe-RhodB	1065,3	3,1	3,3
321	Nphb-Npfb-Nphe-Npfb-RhodB	1083,3	1,6/0,8	1,7/0,8
322	Nphb-Npfb-Nphe-Nphb-RhodB	1081,3	6,3/3,1	6,8/3
323	Nphb-Npfb-Npfb-Nphe-RhodB	1083,3	3,1	3,4
324	Nphb-Npfb-Npfb-Npfb-RhodB	1101,3	1,6	1,7
325	Nphb-Npfb-Npfb-Nphb-RhodB	1099,3	6,3	6,9
326	Nphb-Npfb-Nphb-Nphe-RhodB	1081,3	6,3	6,8
327	Nphb-Npfb-Nphb-Npfb-RhodB	1099,3	6,3	6,87
328	Nphb-Npfb-Nphb-Nphb-RhodB	1063,3	12,5	13,3
329	Nphb-Nphb-Nphe-Nphe-RhodB	1097,3	6,3	6,9
330	Nphb-Nphb-Nphe-Npfb-RhodB	1081,3	3,1	3,4
331	Nphb-Nphb-Nphe-Nphb-RhodB	1079,3	6,3	6,8
332	Nphb-Nphb-Npfb-Nphe-RhodB	1081,3	1,6/0,8	1,7/0,8
333	Nphb-Nphb-Npfb-Npfb-RhodB	1099,3	>100	110
334	Nphb-Nphb-Npfb-Nphb-RhodB	1097,3	ND	ND
335	Nphb-Nphb-Nphb-Nphe-RhodB	1079,3	>100	107,9
336	Nphb-Nphb-Nphb-Npfb-RhodB	1097,3	>100	109,7
337	Nphb-Nphb-Nphb-Nphb-RhodB	1095,3	>100	109,5
Vancomycin	C <sub>66</sub> H <sub>75</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>24</sub>	1449,3	1,4	2
Tobramycin	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	467,5	0,6	0,3
Ciprofloxacin	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	331,3	0,3	0,1
Imipenem	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	317,4	0,3	0,1

<sup>a</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 1.

<sup>b</sup> MW, Molekulargewicht.

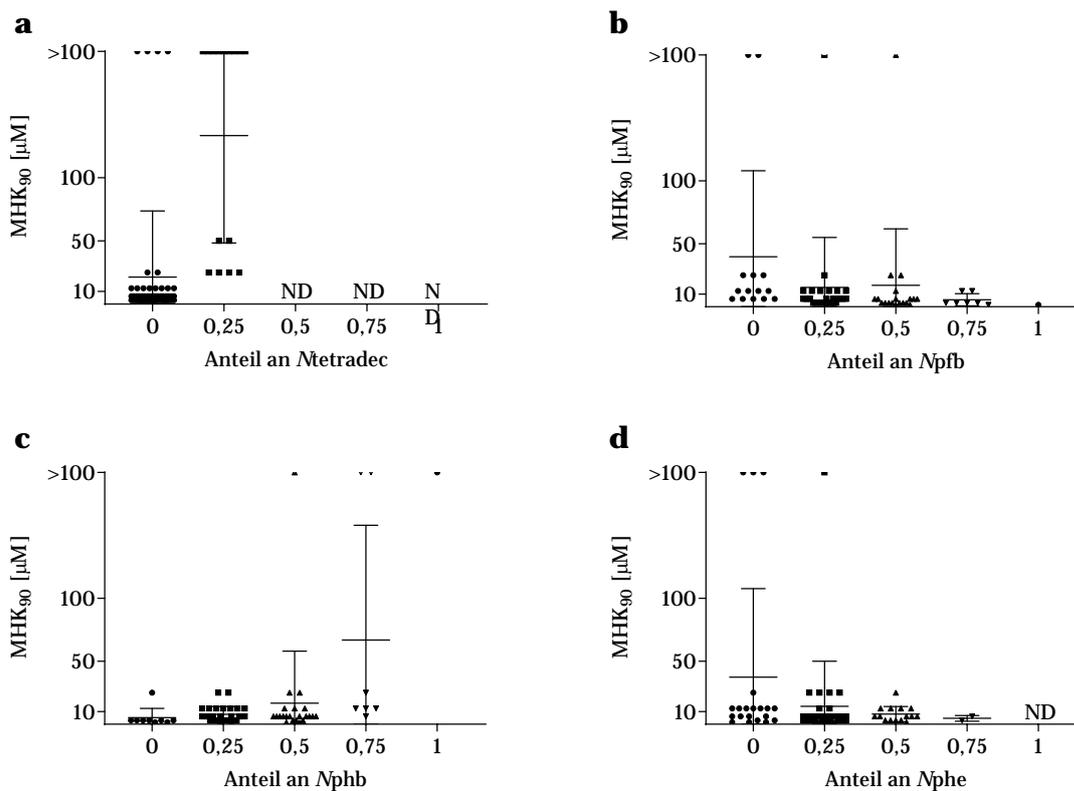
<sup>c</sup> MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

<sup>d</sup> ND, Nicht determiniert, da zu wenig Peptoid.

Peptide mit einem MHK<sub>90</sub>-Wert ≤1,6 sind grau markiert.

14 von 67 Peptoiden zeigten keine antimikrobielle Aktivität (MHK<sub>90</sub> >100 μM) gegen *S. aureus* 29737. Bei vier Peptoiden konnte eine schwache antimikrobielle Aktivität von

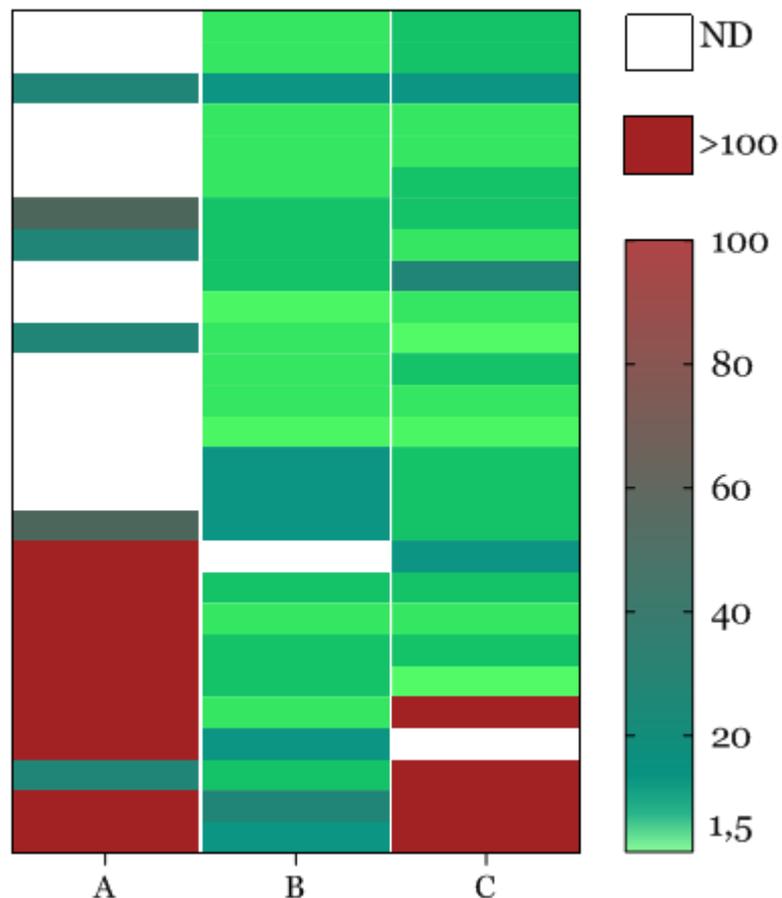
100  $\mu\text{M}$  festgestellt werden. Sechs Peptide konnte eine antimikrobielle Wirkung bei 25  $\mu\text{M}$  identifiziert werden. Eine antimikrobielle Aktivität von 12,5  $\mu\text{M}$  konnte bei 13 Peptoiden bestimmt werden. Bei 21 Peptoiden konnte eine antimikrobielle Aktivität bei 6,3  $\mu\text{M}$  festgestellt werden. Für 17 von 67 Peptoiden konnte eine starke antimikrobielle Wirkung von 3,1  $\mu\text{M}$  und sechs Peptide waren besonders stark antimikrobiell aktiv mit einem MHK<sub>90</sub>-Wert von 1,6  $\mu\text{M}$ . Insgesamt konnten bei 66% der Peptide in Peptoidbibliothek 2 eine antimikrobiell aktive Wirkung gegen *S. aureus* ATCC 29737 von  $\leq 6,3 \mu\text{M}$  festgestellt werden. Damit ist Peptoidbibliothek 2 deutlich antimikrobiell aktiver als Peptoidbibliothek 1 (2%). Um die Verteilung der Seitenketten der Peptide in Bezug auf die antimikrobielle Aktivität beurteilen zu können, wurde die Aktivität in Bezug auf die die Anteile der Seitenketten in Box Plots dargestellt (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Anteile der einzelnen Seitenketten Ntetradec (a), Npfb (b), Nphb (c), Nphe (d) in Bezug auf ihre antimikrobielle Aktivität durch die Darstellung eines Box-Plots.

Die Seitenkette *Ntetradec* (Abbildung 20 a) verfügte bei einem Anteil von 25% kaum über eine antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 2937. Peptoide ohne den Baustein *Ntetradec* waren hingegen deutlich antimikrobiell aktiver. Der Baustein *Npfb* (Abbildung 20 b) zeigte eine starke antimikrobielle Aktivität bei einem Anteil von 25-100%. Nur wenige Peptoide mit einem *Npfb* Gehalt von 0%, 25% und 75% besaßen eine schwache antimikrobielle Aktivität von  $>100 \mu\text{M}$ . Die Seitenkette *Nphb* (Abbildung 20 c) zeigte eine Tendenz, dass das Peptoid mit steigendem Anteil an *Nphb* an antimikrobieller Wirkung verliert. Dennoch besaßen Peptoide mit *Nphb* über eine gute antimikrobielle Wirkung. Bei einem *Nphb* Gehalt von 25% war die antimikrobielle Aktivität am höchsten. Die Seitenkette *Nphe* (Abbildung 20 d) zeigte wie bereits in Peptoidbibliothek 1 eindeutige Verteilung in Bezug auf die antimikrobielle Wirkung. Sowohl bei einem Anteil von 0%, 25%, 50% und 75% konnten diese bei den starke antimikrobiellen Peptoide eingruppiert werden. Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die Seitenketten *Npfb*, *Nphb* und *Nphe* zur antimikrobiellen Aktivität beitragen. Hingegen besitzt *Ntetradec* keine signifikante Relevanz in Bezug zur antimikrobiellen Wirkung. Im Vergleich zu der antimikrobiellen Aktivität von Peptoidbibliothek 1 verfügt Peptoidbibliothek 2 über eine deutlich stärkere antimikrobielle Aktivität.

Die Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 29737 wurde in Form einer Heatmap erfasst (Abbildung 21). Dabei stellt die Farbe Hellgrün eine starke antimikrobielle Aktivität dar. Je dunkler und roter das Feld desto weniger ist das Peptoid antimikrobiell aktiv. Die Aufschlüsselung der Heatmap ist im Appendix in Abbildung 46 dargestellt. Auch hier zeigte sich, dass Peptoide mit den Seitenketten *Npfb*, *Nphe* und *Nphb* antimikrobiell wirken. Die Seitenkette *Ntetradec* trägt nicht zur antimikrobiellen Aktivität bei.



**Abbildung 21:** Heatmap der antimikrobiellen Aktivität der Peptoidbibliothek 2. Helles Grün beschreibt eine starke antimikrobielle Aktivität. Dunkles Grün bis hin zu Dunkelrot beschreibt eine schwache bis keine antimikrobielle Aktivität. Weiße Felder stellen Peptoide dar, die nicht determiniert wurden. Reihe A: Peptoide 1-27, Spalte B: Peptoide 28-54, Spalte C: Peptoide 55-81. Aufschlüsselung der Sequenzen ist im Appendix in Abbildung 46 zusammengefasst.

### 2.2.3 Antimikrobielle Aktivität der Peptoidbibliothek 3 gegen *Staphylococcus aureus*

In Peptoidbibliothek 3 konnten 64 Peptoide erfolgreich synthetisiert werden (siehe Kapitel 2.1.3) und wurden auf ihre antimikrobielle Aktivität gegen den gram-positiven Erreger *S. aureus* ATCC 29737 überprüft. Dafür wurden Bakterienkulturen mit dem jeweiligen Peptoid behandelt und anschließend wurde die OD bei 600 nm gemessen. Die antimikrobielle Aktivität ist in Tabelle 7 dargestellt.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 7:** Peptoidnummer, Sequenz, Molekulargewicht und antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 29737 der Peptoide in Peptoidbibliothek 3.

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
338	<i>Nhe-Nprg-Nprg-Nprg-RhodB</i>	869,1	50	43,5
339	<i>Nhe-Nprg-Nprg-Npcb-RhodB</i>	955,6	25	23,9
340	<i>Nhe-Nprg-Nprg-Nphe-RhodB</i>	915,2	50	45,8
341	<i>Nhe-Nprg-Nprg-Nphb-RhodB</i>	937,2	100	93,7
342	<i>Nhe-Nprg-Npcb-Nprg-RhodB</i>	955,6	25	23,9
343	<i>Nhe-Nprg-Npcb-Npcb-RhodB</i>	955,6	6,3	6
344	<i>Nhe-Nprg-Npcb-Nphe-RhodB</i>	1001,7	25	25
345	<i>Nhe-Nprg-Npcb-Nphb-RhodB</i>	1023,7	25	25,6
346	<i>Nhe-Nprg-Nphe-Nprg-RhodB</i>	915,2	100	91,5
347	<i>Nhe-Nprg-Nphe-Npcb-RhodB</i>	1001,7	50	50
348	<i>Nhe-Nprg-Nphe-Nphe-RhodB</i>	951,3	>100	>95,1
349	<i>Nhe-Nprg-Nphe-Nphb-RhodB</i>	983,3	25	24,58
350	<i>Nhe-Nprg-Nphb-Nprg-RhodB</i>	937,17	>100	>93,72
351	<i>Nhe-Nprg-Nphb-Npcb-RhodB</i>	1023,7	12,5	12,8
352	<i>Nhe-Nprg-Nphb-Nphe-RhodB</i>	983,3	12,5	12,3
353	<i>Nhe-Nprg-Nphb-Nphb-RhodB</i>	1005,3	>100	>100,5
354	<i>Nhe-Npcb-Nprg-Nprg-RhodB</i>	955,6	25	23,9
355	<i>Nhe-Npcb-Nprg-Npcb-RhodB</i>	955,6	100	95,6
356	<i>Nhe-Npcb-Nprg-Nphe-RhodB</i>	1001,7	25	25
357	<i>Nhe-Npcb-Nprg-Nphb-RhodB</i>	1023,7	25	25,6
358	<i>Nhe-Npcb-Npcb-Nprg-RhodB</i>	955,6	12,5	12
359	<i>Nhe-Npcb-Npcb-Npcb-RhodB</i>	1128,7	12,5	14,1
360	<i>Nhe-Npcb-Npcb-Nphe-RhodB</i>	1088,3	3,1	3,4
361	<i>Nhe-Npcb-Npcb-Nphb-RhodB</i>	1110,2	3,1	3,5
362	<i>Nhe-Npcb-Nphe-Nprg-RhodB</i>	1001,7	50	50
363	<i>Nhe-Npcb-Nphe-Npcb-RhodB</i>	1088,3	6,3	6,8
364	<i>Nhe-Npcb-Nphe-Nphe-RhodB</i>	1047,8	50	52,4
365	<i>Nhe-Npcb-Nphe-Nphb-RhodB</i>	1069,8	50	53,5
366	<i>Nhe-Npcb-Nphb-Nprg-RhodB</i>	1023,7	>100	>102,4
367	<i>Nhe-Npcb-Nphb-Npcb-RhodB</i>	1110,2	12,5	13,9
368	<i>Nhe-Npcb-Nphb-Nphe-RhodB</i>	1069,8	50	53,5
369	<i>Nhe-Npcb-Nphb-Nphb-RhodB</i>	1091,8	100	109,2

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
370	<i>Nhe-Nphe-Nprg-Nprg-RhodB</i>	915,2	12,5	11,4
371	<i>Nhe-Nphe-Nprg-Npcb-RhodB</i>	1001,7	50	50
372	<i>Nhe-Nphe-Nprg-Nphe-RhodB</i>	951,3	50	47,6
373	<i>Nhe-Nphe-Nprg-Nphb-RhodB</i>	983,3	>100	>98,3
374	<i>Nhe-Nphe-Npcb-Nprg-RhodB</i>	1001,7	1,6	1,6
375	<i>Nhe-Nphe-Npcb-Npcb-RhodB</i>	1088,3	6,3	6,8
376	<i>Nhe-Nphe-Npcb-Nphe-RhodB</i>	1047,8	12,5	13,1
377	<i>Nhe-Nphe-Npcb-Nphb-RhodB</i>	1069,8	12,5	13,4
378	<i>Nhe-Nphe-Nphe-Nprg-RhodB</i>	951,3	1,6	1,5
379	<i>Nhe-Nphe-Nphe-Npcb-RhodB</i>	1047,8	100	104,8
380	<i>Nhe-Nphe-Nphe-Nphe-RhodB</i>	1007,4	12,5	12,6
381	<i>Nhe-Nphe-Nphe-Nphb-RhodB</i>	1029,4	12,5	12,87
382	<i>Nhe-Nphe-Nphb-Nprg-RhodB</i>	983,3	6,3	6,15
383	<i>Nhe-Nphe-Nphb-Npcb-RhodB</i>	1069,8	6,3	6,69
384	<i>Nhe-Nphe-Nphb-Nphe-RhodB</i>	1029,4	12,5	12,9
385	<i>Nhe-Nphe-Nphb-Nphb-RhodB</i>	1051,4	50	52,6
386	<i>Nhe-Nphb-Nprg-Nprg-RhodB</i>	937,2	12,5	11,7
387	<i>Nhe-Nphb-Nprg-Npcb-RhodB</i>	1023,7	12,5	12,8
388	<i>Nhe-Nphb-Nprg-Nphe-RhodB</i>	983,3	12,5	12,3
389	<i>Nhe-Nphb-Nprg-Nphb-RhodB</i>	1005,3	25	25,1
390	<i>Nhe-Nphb-Npcb-Nprg-RhodB</i>	1023,7	>100	>102,4
391	<i>Nhe-Nphb-Npcb-Npcb-RhodB</i>	1110,2	>100	>111
392	<i>Nhe-Nphb-Npcb-Nphe-RhodB</i>	1069,8	6,3	6,7
393	<i>Nhe-Nphb-Npcb-Nphb-RhodB</i>	1091,8	>100	>109,2
394	<i>Nhe-Nphb-Nphe-Nprg-RhodB</i>	983,3	6,3	98,3
395	<i>Nhe-Nphb-Nphe-Npcb-RhodB</i>	1069,8	>100	>107
396	<i>Nhe-Nphb-Nphe-Nphe-RhodB</i>	1029,4	50	51,5
397	<i>Nhe-Nphb-Nphe-Nphb-RhodB</i>	1051,4	>100	>1051,3
398	<i>Nhe-Nphb-Nphb-Nprg-RhodB</i>	1005,3	6,3	6,3
399	<i>Nhe-Nphb-Nphb-Npcb-RhodB</i>	1091,8	>100	>109,2
400	<i>Nhe-Nphb-Nphb-Nphe-RhodB</i>	1051,4	>100	>105,1
401	<i>Nhe-Nphb-Nphb-Nphb-RhodB</i>	1073,3	>100	>107,3

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
Vancomycin	C <sub>66</sub> H <sub>75</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>24</sub>	1449,3	1,4	2
Tobramycin	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	467,5	0,6	0,3
Ciprofloxacin	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	331,3	0,3	0,1
Imipenem	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	317,4	0,3	0,1

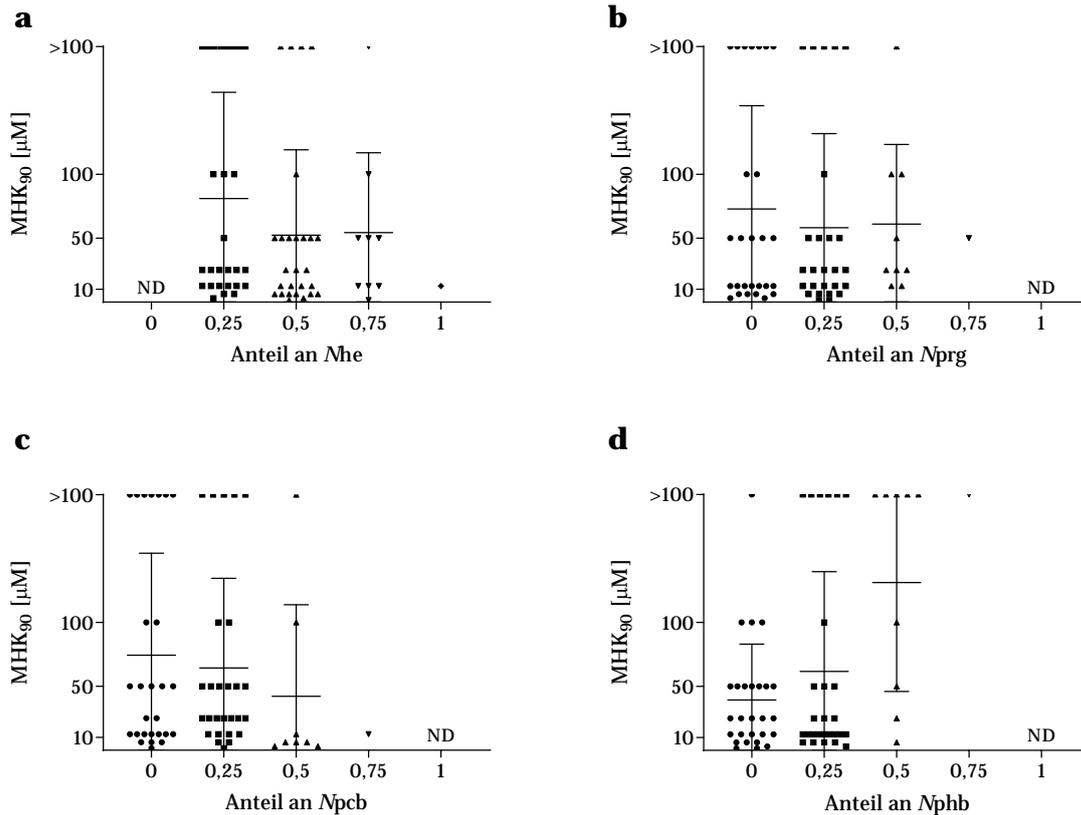
<sup>a</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 2.

<sup>b</sup> MW, Molekulargewicht.

<sup>c</sup> MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

Peptoide mit einem MHK<sub>90</sub>-Wert ≤3,1 sind grau markiert.

13 von 64 Peptoiden zeigten keine antimikrobielle Aktivität (MHK<sub>90</sub> >100 μM) gegen *S. aureus* 29737. Bei fünf Peptoide konnte eine schwache antimikrobielle Aktivität bei 100 μM festgestellt werden. Für neun Peptoide konnte eine antimikrobielle Wirkung bei 25 μM identifiziert werden. Eine antimikrobielle Aktivität von 12,5 μM konnte bei 14 Peptoide bestimmt werden. Bei acht Peptoiden konnte eine antimikrobielle Aktivität bei 6,3 μM festgestellt werden. Bei zwei von 67 Peptoiden konnte eine starke antimikrobielle Wirkung von 3,1 μM und ein Peptoid ist besonders stark antimikrobiell aktiv mit einem MHK<sub>90</sub>-Wert von 1,6 μM. Insgesamt konnten bei 19% der Peptoide in Peptoidbibliothek 3 eine antimikrobiell aktive Wirkung gegen *S. aureus* ATCC 29737 von ≤6,3 μM festgestellt werden. Damit ist die Peptoidbibliothek 3 deutlich antimikrobiell aktiver als die Peptoidbibliothek 1 (2%). Um die Verteilung der Monomere der Peptoide in Bezug auf die antimikrobielle Aktivität beurteilen zu können, wurde die Aktivität in Bezug auf die Anteile der Seitenketten in Box Plots dargestellt (Abbildung 22).

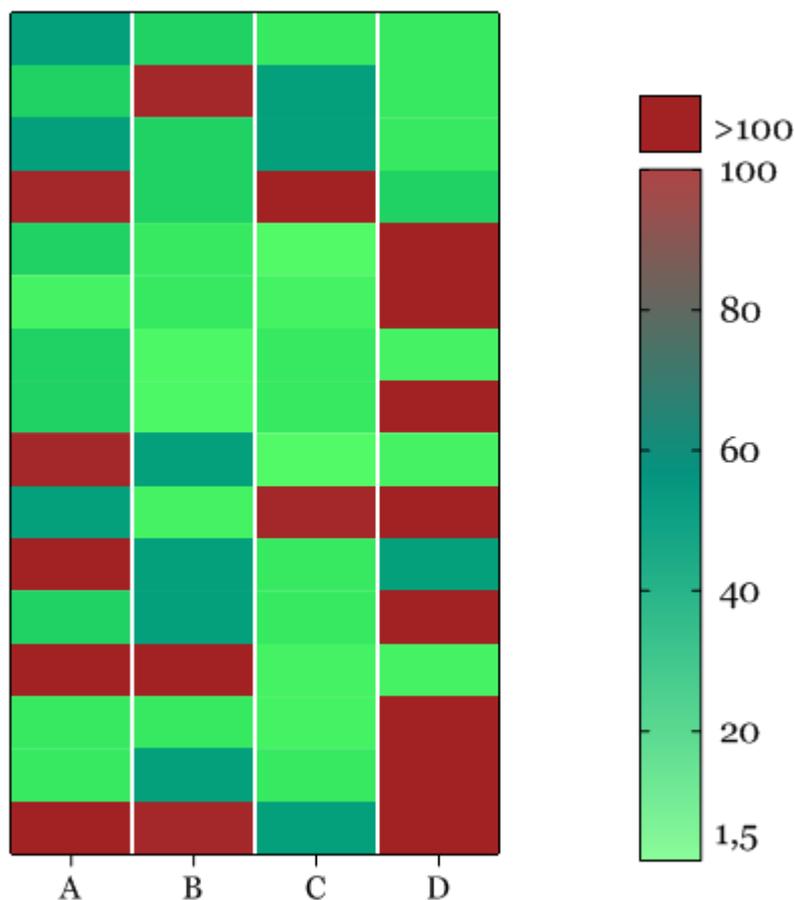


**Abbildung 22:** Anteile der einzelnen Seitenketten Nhe (a), Nprg (b), Npcb (c), Nphb (d) in Bezug auf ihre antimikrobielle Aktivität durch die Darstellung eines Box-Plots.

Die Seitenkette Nhe (Abbildung 22 a) besaß vereinzelt eine starke antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 2937 bei einem Anteil von 50%-100%. Der Baustein Nprg (Abbildung 22 b) zeigte eine antimikrobielle Aktivität bei einem Anteil von 25-50%. Der Box-Plot von der Seitenkette Npcb (Abbildung 22 c) zeigt, dass diese Seitenkette mit steigendem Anteil zur antimikrobiellen Wirkung beiträgt. Bei einem Gehalt von 0% ist die Varianz der antimikrobiellen Aktivität weit gestreut. Der Box-Plot von Monomer Nphb (Abbildung 22 d) zeigte, dass mit steigendem Anteil die antimikrobielle Wirkung abnimmt. Dennoch waren bei einem Nphb Anteil von 0%, 25% und 50% stark antimikrobiell aktive Peptoide eingruppiert. Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die Seitenketten Nhe, Nprg, Npcb und Nphb zur antimikrobiellen Aktivität beitragen.

Die Darstellung der antimikrobiellen Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 2937 wurde in Form einer Heatmap erfasst (Abbildung 23). Dabei stellt die Farbe Hellgrün eine starke antimikrobielle Aktivität dar. Je dunkler und roter das Feld desto weniger ist das Peptoid antimikrobiell aktiv. Die Aufschlüsselung der Heatmap ist im Appendix in

Abbildung 47 dargestellt. Es zeigte sich keine erkennbare Tendenz in der Verteilung der Seitenketten in Bezug auf die antimikrobielle Wirkung.



**Abbildung 23:** Heatmap der antimikrobiellen Aktivität der Peptoidbibliothek 3. Helles Grün beschreibt eine starke antimikrobielle Aktivität. Dunkles Grün bis hin zu Dunkelrot beschreibt eine schwache bis keine antimikrobielle Aktivität. Weiße Felder stellen Peptoide dar, die nicht determiniert wurden. Reihe A: Peptoide 1-16, Spalte B: Peptoide 17-32, Spalte C: Peptoide 33-48, Spalte D: Peptoide 49-64. Aufschlüsselung der Sequenzen ist im Appendix in Abbildung 47 zusammengefasst.

### 2.2.4 Antimikrobielle Aktivität der Peptoidbibliothek Oktamere gegen *Staphylococcus aureus*

In Peptoidbibliothek 1 konnten 16 Peptoidtetramere erfolgreich als antimikrobiell gegen *S. aureus* ATCC 29738 mit einem  $MHK_{90}$ -Wert von  $\leq 25 \mu\text{M}$  identifiziert werden (siehe Kapitel 2.2.1). Um zu analysieren, ob die Peptoidlänge eine wesentliche Rolle in der antimikrobiellen Aktivität spielt, wurde in Kollaboration mit Dr. Stephan Münch (Institut für organische Chemie, KIT, Karlsruhe) alle Peptoide mit einem  $MHK_{90}$ -Wert

$\leq 25 \mu\text{M}$  in der Länge verdoppelt, sodass 16 Oktamere entstanden. Für die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität wurden Bakterienkulturen mit dem jeweiligen Peptoid behandelt und anschließend wurde die OD bei 600 nm gemessen. Die antimikrobielle Aktivität ist in Tabelle 8 dargestellt.

Lediglich die Peptide 414 und 415 ( $\text{MHK}_{90}$  3,1), welche Verdoppelungen der Peptide 198 und 200 ( $\text{MHK}_{90}$  6,3) aus Peptoidbibliothek 1 darstellen, zeigten eine höhere antimikrobielle Wirkung gegen *S. aureus* als die Monomere selbst. Alle anderen Oktamere wiesen im Vergleich zu ihren Tetrameren eine geringere antimikrobielle Aktivität auf. Daher ist davon auszugehen, dass die Peptoidlänge keine Rolle bei der antimikrobiellen Aktivität spielt.

**Tabelle 8:** Peptoidnummer, Sequenz, Molekulargewicht und antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 29737 der Peptide in Peptoidbibliothek Oktamere.

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[ $\mu\text{M}$ ]	[ $\mu\text{g/ml}$ ]
402	Nprg-Nprg-Npcb-Nphe-Nprg-Nprg-Npcb-Nphe	1446,1	25	36,2
403	Nprg-Nphe-Npcb-Npcs-Nprg-Nphe-Npcb-Npcb	1653,6	12,5	20,7
404	Npcb-Nprg-Npcb-Nphe-Npcb-Nprg-Npcb-Nphe	1653,6	12,5	20,7
405	Npcb-Nprg-Nphe-Nprg-Npcb-Nprg-Nphe-Nprg	1480,6	25	37
406	Npcb-Npcb-Nprg-Nprg-Npcb-Npcb-Nprg-Nprg	1549,5	25	38,7
407	Npcb-Npcb-Nprg-Npcb-Npcb-Npcb-Nprg-Npcb	1722,5	25	43
408	Npcb-Npcb-Mys-Nphe-Npcb-Npcb-Mys-Nphe	1719,8	>25	43
409	Npcb-Npcb-Mys-Nprg-Npcb-Npcb-Mys-Nprg	1653,61	25	41,3
410	Npcb-Nphe-Npcb-Nphe-Npcb-Nphe-Npcb-Nphe	1757,8	25	43,9
411	Npcb-Nphe-Mys-Npcb-Npcb-Nphe-Mys-Npcb	1719,8	25	43
412	Npcb-Nphe-Nphe-Nphe-Npcb-Nphe-Nphe-Nphe	1688,9	25	42,2
413	Nphe-Nprg-Nprg-Nphe-Nphe-Nprg-Nprg-Nphe	1411,7	12,5	17,7
414	Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb	1653,6	3,1	5,17
415	Nphe-Nprg-Npcb-Nphe-Nphe-Nprg-Npcb-Nphe	1584,7	3,1	5
416	Nphe-Npcb-Npcb-Nphe-Nphe-Npcb-Npcb-Nphe	1757,8	25	43,9
417	Nphe-Nphe-Npcb-Npcb-Nphe-Nphe-Npcb-Npcb	1757,8	12,5	21,9

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
Vancomycin	C <sub>66</sub> H <sub>75</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>24</sub>	1449,3	1,4	2
Tobramycin	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	467,5	0,6	0,3
Ciprofloxacin	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	331,3	0,3	0,1
Imipenem	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	317,4	0,3	0,1

<sup>a</sup> Sequenz, Farb -und Zahlencode in Tabelle 3.

<sup>b</sup> MW, Molekulargewicht.

<sup>c</sup> MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

Peptoide mit einem MHK<sub>90</sub>-Wert ≤12,5 sind grau markiert.

### 2.2.5 Antimikrobielle Aktivität der Peptoidbibliothek Pentamer, Nonamere, Undekamere und Dodekamere gegen *Staphylococcus aureus*

Neben drei verschiedenen Tetramerbibliotheken und einer Oktamerbibliothek, wurde auch Peptoide mit 5, 9, 11 und 12 Seitenketten gegen *S. aureus* ATCC 29737 auf ihre antimikrobielle Aktivität getestet. Die Peptoide 422 und 423 waren dabei Verdreifachungen aus den antimikrobiell aktiven Tetrameren 198 und 200 aus Peptoidbibliothek 1. Die Peptoide 418, 419, 421 und 424 waren Peptoide aus einer Kollaboration mit Prof. Dr. Annelise Barron (Stanford University, USA). Für die antimikrobielle Bestimmung wurden Bakterienkulturen mit dem jeweiligen Peptoid für 16 h behandelt und anschließend wurde die OD bei 600 nm gemessen. Die antimikrobielle Aktivität ist in Tabelle 9 dargestellt.

Peptoid 420 ist ein tryptophanreiches Nonamer und besaß eine gute antimikrobielle Wirkung gegen *S. aureus* von 5 μM. Hingegen wiesen die Peptoide 419 und 422 kaum bis keine antimikrobielle Aktivität auf (25 μM und >100 μM). Das Dodekamer 423, welches eine Verdreifachung des stark antimikrobiell aktiven Tetramers 200 aus Peptoidbibliothek 1 ist, ist hingegen nicht antimikrobiell aktiv. Das chirale Dodekamer 424 ist stark antimikrobiell aktiv gegen *S. aureus* (MHK<sub>90</sub> 1 μM). Mit steigender Peptoidlänge und Chiralität und somit stärkerer Strukturierung lag demnach keine Korrelation mit der antimikrobiellen Aktivität vor.

**Tabelle 9:** Peptoidnummer, Sequenz, Molekulargewicht und antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 29737 der Peptoide in der Peptoidbibliothek mit Multimeren.

Peptoid	Sequenz <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup> g/mol	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737	
			[μM]	[μg/ml]
<b>Pentamer</b>				
418	H-Ntridec-NLys-Nspe-Nspe-NLys-NH <sub>2</sub>	835,2	100	120
<b>Nonamere</b>				
419	H-Mys-Mys-Mys-Mys-Ntrp-Ntrp-Ntrp-Ntrp-Nile-NH <sub>2</sub>	1443,9	44 <sup>e</sup>	64 <sup>e</sup>
420	H-Mys-Ntrp-Mys-Mys-Ntrp-Ntrp-Mys-Ntrp-Nphe-NH <sub>2</sub>	1477,9	5 <sup>e</sup>	8 <sup>e</sup>
<b>Undekamere</b>				
421	H-(NLys-Nspe-Nspe) <sub>3</sub> -NLys-Nspe NH <sub>2</sub>	1658,2	ND <sup>d</sup>	ND
<b>Dodekamere</b>				
422	H-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-NH <sub>2</sub>	1833,6	25	46
423	H-Nphe-Nprg-Nprg-Nphe-Nphe-Nprg-Nprg-Nphe-Nphe-Nprg-Nprg-NH <sub>2</sub>	1730,3	>100	>173
424	H-(NLys-Nspe-Nspe) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	1819,4	1	2
Vancomycin		1449,3	1,4	2
Tobramycin		467,5	0,6	0,3
Ciprofloxacin		331,3	0,3	0,1
Imipenem		317,4	0,3	0,1

<sup>a</sup>Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 4.

<sup>b</sup>MW, Molekulargewicht.

<sup>c</sup>MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

<sup>d</sup>ND, Nicht determiniert, da zu wenig Peptoid.

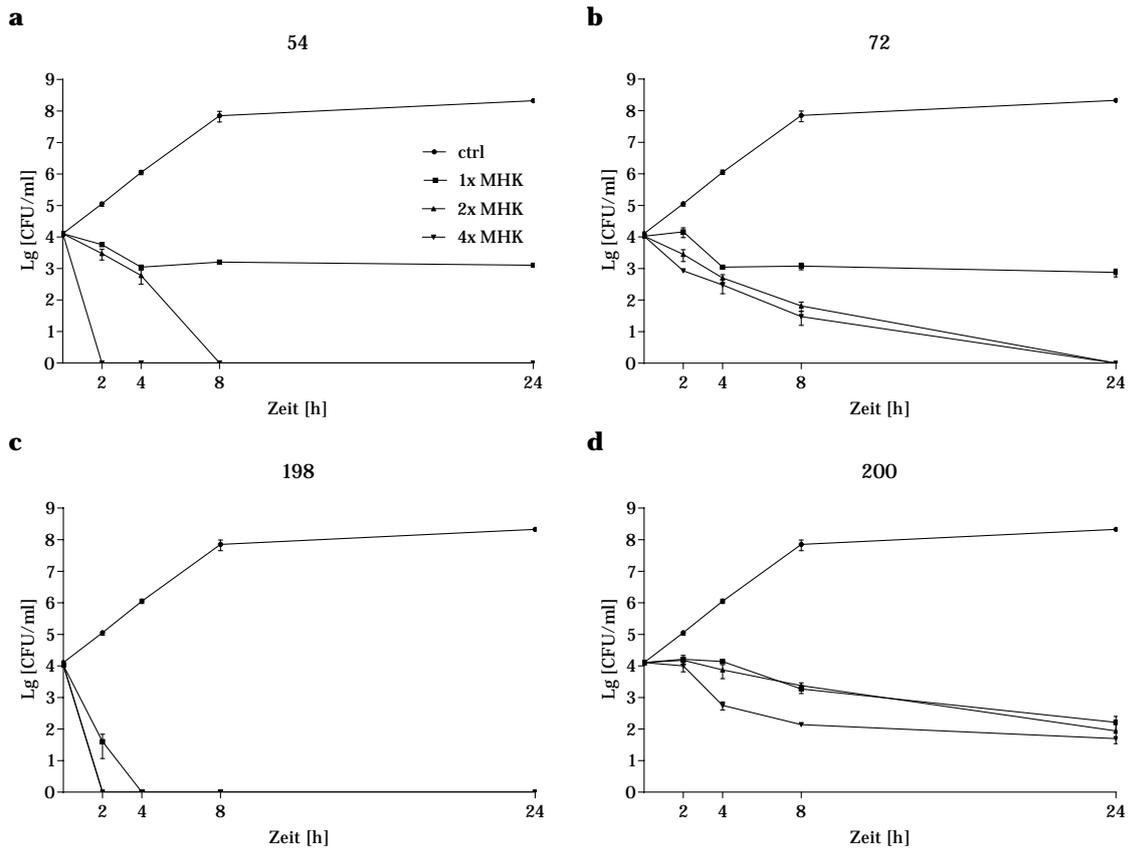
<sup>e</sup>*S. aureus* ATCC 29213.

### **2.3 Zeitliche Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* ATCC 29737**

Um die antimikrobiell determinierten Peptoide aus den untersuchten Peptoidbibliotheken in der bakterizide und bakteriostatische Wirkungsweise zu differenzieren, wurden die antimikrobiell aktiven Peptoide in ihren Hemmmustern analysiert. Eine bakterizide Wirkung ist tödlich für das Bakterium, eine bakteriostatische Wirkung wirkt hingegen nur hemmend auf das Bakterienwachstum. Für die Determinierung der bakteriziden bzw. bakteriostatischen Wirkung wurde die peptoidbehandelten Bakterien in den Konzentrationen 1x  $MHK_{90}$ , 2x  $MHK_{90}$  und 4x  $MHK_{90}$  auf Agarplatten ausplattiert und nach 24 h ausgewertet.

#### Peptoidbibliothek 1

Die Peptoide 54, 72 und 200 wiesen eine bakteriostatische Wirkung bei 1x  $MHK_{90}$  auf. Das Peptoid 54 wirkte nach Inkubation mit 2x und 4x-facher antimikrobieller Dosis nach 2 bzw. 8 h bakterizid (Abbildung 24 a). Dagegen wirkt Peptoid 72 erst nach 24 h bakterizid (Abbildung 24 b). Das Peptoid 198 wirkt bereits nach 4 h bakterizid bei einer Konzentration von 1x  $MHK_{90}$  (6,3  $\mu M$ ). Bei einer Inkubation mit 2x und 4x  $MHK_{90}$  ist bereits nach 2 h kein Kolonienwachstum nachzuweisen (Abbildung 24 c). Peptoid 200 bleibt auch nach Behandlung mit der 4-fachen Konzentration des  $MHK_{90}$ -Werts nur bakteriostatisch (Abbildung 24 d). Zusammenfassend wirken die untersuchten Peptoide aus Peptoidbibliothek 1 deutlich schneller als das Reserveantibiotikum Vancomycin (Abbildung 25 d).

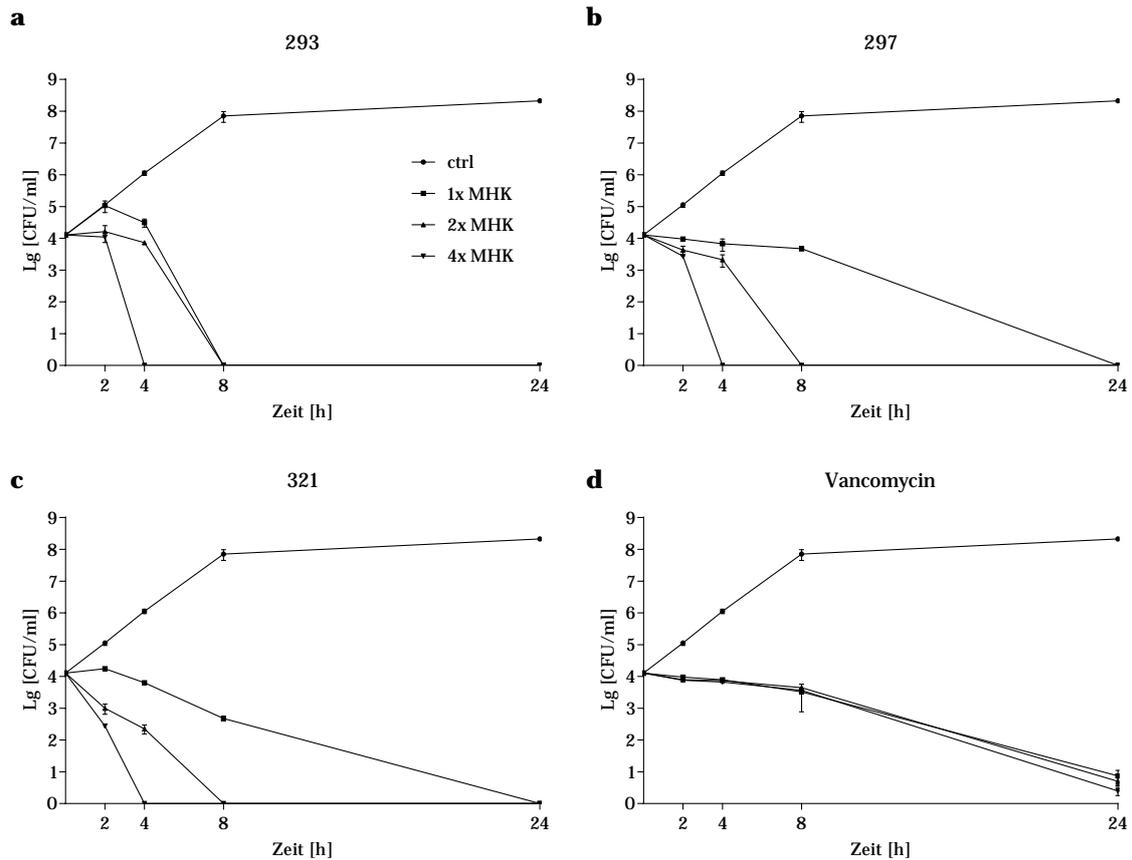


**Abbildung 24:** Kolonieformende Units (CFU) von *S. aureus* ATCC29737 nach Inkubation mit den antimikrobiell aktiven Peptoiden 54, 72, 198 und 200 aus Peptoidbibliothek 1. Bakterien wurden mit 1x, 2x und 4x  $MHK_{90}$  Konzentration behandelt. Das Experiment wurde in dreifacher Ausfertigung durchgeführt und die bakteriziden bzw. bakteriostatische Wirkung wurden als Mittelwert  $Lg$  (CFU/ml)  $\pm$  Standardabweichungen ausgedrückt.

### Peptoidbibliothek 2

Alle untersuchten Peptoide der Peptoidbibliothek 2 sind bakterizid nach 8 h (293) (Abbildung 25 a) bzw. 24 h. (297, 321) (Abbildung 25 b und c) bei einer Inkubation mit 1x  $MHK_{90}$  auf. Bei einer Inkubation mit der 4-fachen Menge des  $MHK_{90}$ -Werts wirken die untersuchten Peptoide bereits nach 4 h bakterizid. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die untersuchten Peptoide aus Peptoidbibliothek 2 deutlich schneller wirkten als die der Peptoidbibliothek 1, sowie wesentlich schneller als das Reserveantibiotikum Vancomycin (Abbildung 25 d).

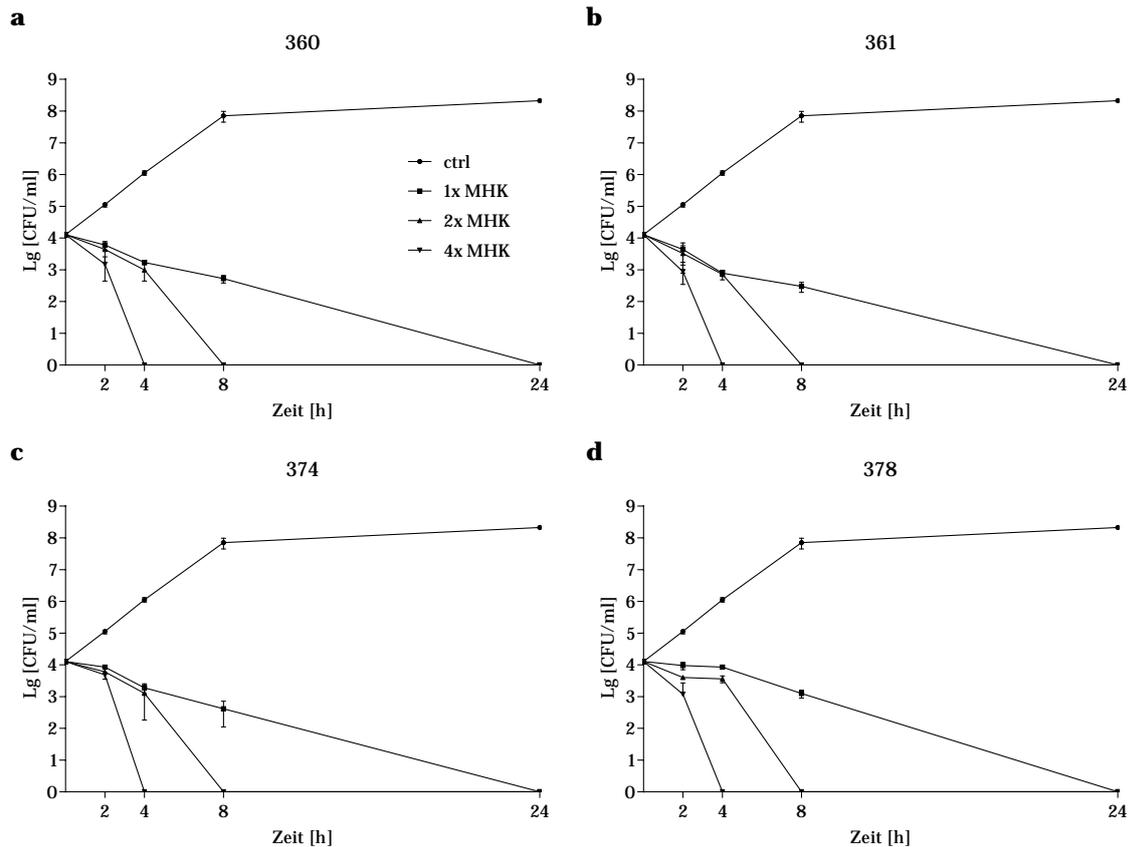
## 2. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 25:** Kolonieformende Units (CFU) von *S. aureus* ATCC29737 nach Inkubation mit den antimikrobiell aktiven Peptoiden 293 (a), 297 (b) und 321 (c) aus Peptoidbibliothek 2, sowie mit dem Antibiotikum Vancomycin (d). Bakterien wurden mit 1x, 2x und 4x  $MHK_{90}$  Konzentration behandelt. Das Experiment wurde in dreifacher Ausfertigung durchgeführt und die bakteriziden bzw. bakteriostatische Wirkung wurden als Mittelwert Lg (CFU/ml)  $\pm$  Standardabweichungen ausgedrückt.

### Peptoidbibliothek 3

Eine bakterizide Wirkung wiesen die Peptide 360,361, 374 und 378 bei 1x  $MHK_{90}$  nach 24 h auf (Abbildung 26). Dabei verhalten sich alle getesteten Peptide aus dieser Peptoidbibliothek ähnlich. Eine bakterizide Wirkung konnte bei 4x  $MHK_{90}$  nach 4 h festgestellt werden. Bei Inkubation mit 2x  $MHK_{90}$  wirken die getesteten Peptide nach 8 h. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die untersuchten Peptide aus Peptoidbibliothek 3 deutlich schneller wirkten als die der Peptoidbibliothek 1 und ähnlich wie die der Peptoidbibliothek 2, sowie wesentlich schneller als das Reserveantibiotikum Vancomycin (Abbildung 25 d).



**Abbildung 26:** Kolonieformende Units (CFU) von *S. aureus* ATCC29737 nach Inkubation mit den antimikrobiell aktiven Peptoiden 360, 361, 374 und 378 aus Peptoidbibliothek 3. Bakterien wurden mit 1x, 2x und 4x  $MHK_{90}$  Konzentration behandelt. Das Experiment wurde in dreifacher Ausfertigung durchgeführt und die bakteriziden bzw. bakteriostatische Wirkung wurden als Mittelwert  $Lg$  (CFU/ml)  $\pm$  Standardabweichungen ausgedrückt.

## 2.4 Antimikrobielle Aktivität gegen MRSA

Schätzungen des Europäischen Zentrums für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten nach erkrankten jedes Jahr etwa 3,2 Millionen in Krankenhäusern in der Europäischen Union (EU) aufgenommene Patienten an einer Infektion (van Hauwermeiren et al. 2019). Der am häufigsten vorkommende gram-positive Organismus war *S. aureus*, bei dem 41 Prozent der Patientenisolate antibiotikaresistent waren. Besonders problematisch sind arzneimittelresistente Organismen, unter denen Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) als die Hauptursache für gesundheitsbedingte Infektionen in der Europäischen Union gilt (Köck et al. 2010).

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Alle potenten Peptoide mit einem  $MHK_{90}$ -Wert gegen *S. aureus* ATCC 29373 von  $\leq 6,3 \mu M$  wurden auf die antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene multiresistente *S. aureus* (MRSA) untersucht. Die Zusammenstellung der untersuchten Peptoide ist in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10:** Peptoidnummer, Sequenz, Molekulargewicht und antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ATCC 29737 der Peptoide aller in Kapitel 2.1 vorgestellten Peptoidbibliotheken.

Verbindung/ Bibliothek	$MHK_{90}^a$ , $\mu M$ <i>S. aureus</i>				
	ATCC 29737	DM 4299	DM 0004583R	DM 21455	DR 09808R
<b>Peptoidbibliothek 1<sup>b</sup></b>					
198	6,3	1,6	<1,6	<1,6	6,3
200	6,3	12,5	6,3	6,3	12,5
<b>Peptoidbibliothek 2<sup>c</sup></b>					
293	1,6	6,25	3,1	3,1	6,3
297	1,6	3,1	3,1	3,1	3,1
321	1,6	6,3	<1,6	3,1	3,1
322	3,13	12,5	6,3	12,5	12,5
324	1,6	12,5	3,1	6,3	6,3
<b>Peptoidbibliothek 3<sup>d</sup></b>					
360	3,1	6,3	3,1	3,1	6,3
361	3,1	12,5	6,5	6,3	6,3
374	1,6	3,1	<1,6	<1,6	3,1
378	1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6
<b>Peptoidbibliothek Oktamere<sup>e</sup></b>					
414	3,1	6,3	6,3	6,3	6,3
415	3,1	6,3	3,1	3,1	6,3
<b>Peptoidbibliothek Dodekamere<sup>e</sup></b>					
422	25	25	25	100	25
423	>100	>100	>100	>100	>100

<sup>a</sup>  $MHK_{90}$ , 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

<sup>b</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 22.

<sup>c</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 1.

<sup>d</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 2.

<sup>e</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 3.

Die untersuchten Peptoide der Peptoidbibliothek 1 zeigen eine starke antimikrobielle Wirkung gegen die verwendeten MRSA Bakterien ( $<12,5 \mu\text{M}$ ). Besonders Peptoid 198 zeigte eine verstärkte antimikrobielle Wirkung gegen MRSA gegenüber *S. aureus* ATCC 29737. Ebenfalls eine stark hemmende Wirkung konnte bei Peptoidbibliothek 2 festgestellt werden. Allerdings lagen alle MRSA  $\text{MHK}_{90}$ -Werte über den  $\text{MHK}_{90}$ -Werten von *S. aureus*. Dieser Effekt konnte auch bei Peptoidbibliothek 3 detektiert werden. Lediglich bei Peptoid 378 ist eine starke antimikrobielle Wirkung von  $<1,6 \mu\text{M}$  feststellbar. MRSA-Erreger sprechen ebenfalls auf Peptoide mit 8 Seitenketten an ( $3,1 \mu\text{M}$  und  $6,3 \mu\text{M}$ ). Dodekamere wirken kaum oder gar nicht antimikrobiell gegen MRSA ( $25 \mu\text{M}$  und  $>100 \mu\text{M}$ ).

### **2.5 Antimikrobielle Aktivität gegen gram-negative Bakterien**

Alle Peptoidbibliotheken wurden auf die antimikrobielle Aktivität gegen die gram-negativen Bakterien *E. coli* ATCC 35218 und *P. aeruginosa* PAO1, sowie *K. pneumoniae* untersucht.

#### **2.5.1 Antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa***

Extraintestinale pathogene Stämme von *E. coli* (ExPEC) sind häufige Krankheitserreger und verursachen Infektionen mit unterschiedlichem Schweregrad (Russo und Johnson 2000). Sie sind für 70 bis 90% der akuten ambulant erworbenen unkomplizierten Harnwegsinfektionen, 85% der Fälle von asymptomatischer Bakteriämie und  $>60\%$  der rezidivierenden Blasenentzündungsinfektionen verantwortlich (Foxman und Brown 2003). Die erfolgreiche Behandlung wird zudem durch eine Zunahme von antibiotikaresistenten Stämmen erschwert. Neben *E. coli* wurden bei Patienten mit urologischen Erkrankungen auch andere Enterobacteriaceae, Enterococcus spp. und *Pseudomonas aeruginosa* diagnostiziert. Die Resistenz gegen Mikroben entwickelt sich alarmierend schnell, wobei länderspezifische Resistenzraten im Verhältnis zur Menge der verwendeten Antibiotika stehen. Daher wurden alle Peptoidbibliotheken auf die antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* ATCC 35218 und *P. aeruginosa* PAO1 untersucht.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 11:** Peptoidnummer, Sequenz, Molekulargewicht und antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* ATCC 35218 und *P. aeruginosa* PAO1 aller in Kapitel 2.1 vorgestellten Peptoidbibliotheken.

Peptoid/ Bibliothek	Sequenz	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>E. coli</i> ATCC 35218		MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>P. aeruginosa</i> PAO1	
			[μM]	[μg/ml]	[μM]	[μg/ml]
<b>Peptoidbibliothek 1</b>						
	Keine antimikrobielle Aktivität gegen <i>E. coli</i>	-	>200	>200	>200	>200
<b>Peptoidbibliothek 2</b>						
	Keine antimikrobielle Aktivität gegen <i>E. coli</i>	-	>200	>200	>200	>200
<b>Peptoidbibliothek 3</b>						
	Keine antimikrobielle Aktivität gegen <i>E. coli</i>	-	>200	>200	>200	>200
<b>Peptoidbibliothek Oktamere</b>						
	Keine antimikrobielle Aktivität gegen <i>E. coli</i>	-	>200	>200	>200	>200
<b>Pentamer<sup>a</sup></b>						
418	H-Ntridec-NLys-Nspe-Nspe-NLys-NH <sub>2</sub>	835,19	12,5	10,4	25	20,9
<b>Nonamere<sup>a</sup></b>						
419	H-Mys-Mys-Mys-Mys-Ntrp- Ntrp-Ntrp-Ntrp-Mile-NH <sub>2</sub>	1443,86	22,2	32	22,2	32
420	H-Mys-Ntrp-Mys-Mys-Ntrp- Ntrp-Mys-Ntrp-Nphe-NH <sub>2</sub>	1477,87	10,8	16	10,8	16
<b>Undekamere<sup>a</sup></b>						
421	H-(NLys-Nspe-Nspe) <sub>3</sub> -NLys-Nspe-NH <sub>2</sub>	1658,16	6,3	10,4	25	41,5
<b>Dodekamere<sup>a</sup></b>						
422	H-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-Nphe-Nprg- Npcb-Npcb-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-NH <sub>2</sub>	1833,58	25	45,84	>100	>183,4
423	H-Nphe-Nprg-Nprg-Nphe-Nphe-Nprg- Nprg-Nphe-Nphe-Nprg-Nprg-NH <sub>2</sub>	1730,25	>100	>173	>100	>173
424	H-(NLys-Nspe-Nspe) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	1819,36	3,13/ 6,3	2,8/ 5,7	12,5	22,7
Tobramycin	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	467,51	1,6	0,75	1,6	0,75
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	2846,7	12,5	35,6	ND <sup>d</sup>	ND
Magainin-2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	2467,1	12,5	56,2	25/ 50	112/ 225

Peptoid/ Bibliothek	Sequenz	MW <sup>b</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>E. coli</i> ATCC 35218		MHK <sub>90</sub> <sup>c</sup> <i>P. aeruginosa</i> PAO1	
			[μM]	[μg/ml]	[μM]	[μg/ml]
LL-37	KRIVQRIKDFLRNLPRTES	4493,6	3,1/ 6,3	7,7/ 15,5	ND	ND
Indolicidin	ILPWKWPWWPWRR	1906,33	16	32	16	32

<sup>a</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 3.

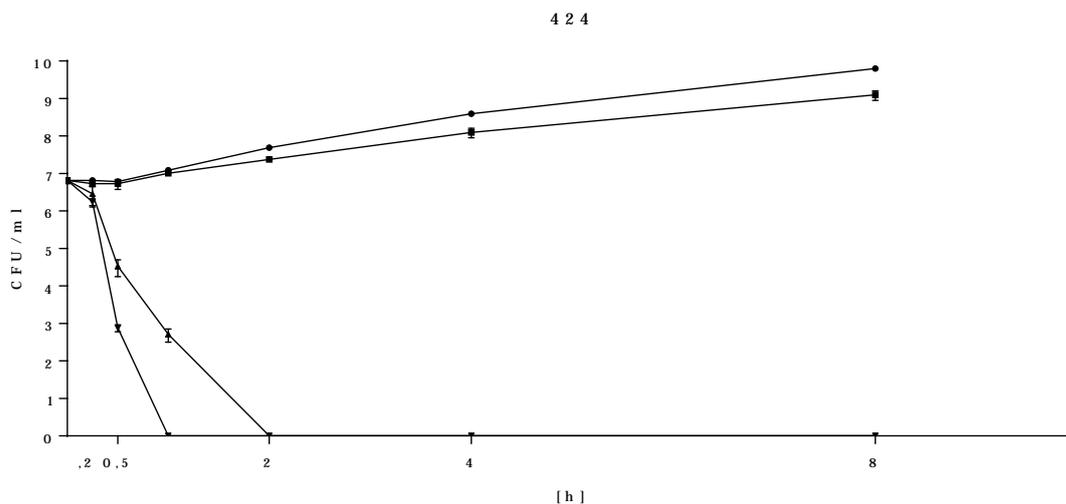
<sup>b</sup> MW, Molekulargewicht.

<sup>c</sup> MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

<sup>d</sup> ND, Nicht determiniert.

Die Peptide aus Peptoidbibliothek 1, 2 und 3, sowie alle Oktamere zeigten keine hemmende Wirkung gegen *E. coli* ATCC 35218 und *P. aeruginosa* PAO1. Lediglich die Peptide 421 und 424 zeigte eine antimikrobielle Wirkung gegen *E. coli* ATCC 35218 mit einer MHK<sub>90</sub> <10 μM. Gegen *P. aeruginosa* PAO1 konnte eine antimikrobielle Wirkung bei den Peptoiden 420 (10,8 μM) und 424 (12,5 μM) festgestellt werden.

Da Peptoid 424 besonders stark antimikrobiell gegen *E. coli* wirkte, wurde untersucht, wann dieses Peptoid seine hemmende Wirkung vollzieht. Dabei konnte festgestellt werden, dass dieses Dodekamere nach Inkubation ≤2 h mit dem Peptoid das Bakterium tötet und somit stark bakterizid wirkt (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Kolonieformende Units (CFU) von *E. coli* ATCC 35218 nach Inkubation mit dem antimikrobiell aktiven Peptoiden 424. Bakterien wurden mit 1x, 2x und 4x MHK<sub>90</sub> Konzentration behandelt. Das Experiment wurde in dreifacher Ausfertigung durchgeführt und die bakteriziden bzw. bakteriostatische Wirkung wurden als Mittelwert Lg (CFU/ml) ± Standardabweichungen ausgedrückt.

### **2.5.2 Antimikrobielle Aktivität gegen *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella* verursacht eine Vielzahl von Infektionen, einschließlich Lungenentzündungen, Harnwegsinfektionen, Bakteriämie und Leberabszessen. In der Vergangenheit hat *K. pneumoniae* vor allem bei immungeschwächten Personen schwere Infektionen verursacht, aber das Auftauchen und die Ausbreitung hypervirulenter Stämme in jüngster Zeit haben die Zahl der anfälligen Personen auf gesunde und immunschwache Personen ausgeweitet. Darüber hinaus sind *K. pneumoniae*-Stämme zunehmend resistenter gegen Antibiotika geworden, was eine Infektion durch diese Stämme für die Behandlung schwierig macht. Vor allem die Resistenz bei *Klebsiella* gegen Carbapenem stellt eine große Herausforderung dar, da es bisher keine Alternative zur Behandlung Carbapenem-resistenter Erreger gibt und solche Infektionen zwangsläufig zum Tod führen.

Die antimikrobiell aktiven Peptoide 198, 293 und 418 wurden auf die antimikrobielle Aktivität gegen *K. pneumoniae* untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche *Klebsiella* Stämme verwendet: Zum einen der Carbapenem sensitive Stamm NIH-1  $\psi$ kp14 und zum anderen der pan-resistente Stamm AR-0666  $\psi$ kp12. Die verwendeten waren dabei neuartige biolumineszente Stämme, die eine *in vivo* Detektion bei späteren Experimenten möglich machen würden. Die Ergebnisse der antimikrobiellen Aktivität gegen die zwei genannten Stämme sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12:** Antimikrobielle Aktivität gegen *Klebsiella* NIH-1  $\Psi_{kp14}$  und *Klebsiella* AR-0666  $\Psi_{kp12}$  der Peptoidbibliothek 1, 2, 3, Pentamer und Dodekamer.

Peptoid/ Bibliothek	Sequenz	MW <sup>a</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>b</sup> <i>K. pneumoniae</i> NIH-1 <sup>c</sup> $\Psi_{kp14}$		MHK <sub>90</sub> <sup>b</sup> <i>K. pneumoniae</i> AR-0666 <sup>d</sup> $\Psi_{kp12}$	
			[ $\mu$ M]	[ $\mu$ g/ml]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ g/ml]
<b>Peptoidbibliothek 1<sup>e</sup></b>						
198	Nphe-Nprg-Npcb-Npcb	1046,5	>244,6	>256	>244,6	>256
<b>Peptoidbibliothek 2<sup>f</sup></b>						
293	Npfb-Npfb-Nphe-Nphe	1067,27	239,9	256	239,9	256
<b>Pentamer<sup>g</sup></b>						
418	Ntridec-NLys-Nspe-Nspe-NLys	835,19	>306,5	>256	>306,5	>256
<b>Dodekamer<sup>g</sup></b>						
424	H-(NLys-Nspe-Nspe) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	1819,36	17,6	32	17,6	32
Vancomycin	C <sub>66</sub> H <sub>75</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>24</sub>	1449,3	0,04	0,06	11	16
Meropenem	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	437,51	>292,6	>128	>292,6	>128

<sup>a</sup>MW, Molekulargewicht.

<sup>b</sup>MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

<sup>c</sup>*K. pneumoniae* NIH-1, nicht Carbapenemase produzierend (KPC negative), antibiotisch sensibler Stamm erhalten von NIH.

<sup>d</sup>*K. pneumoniae* AR-0666, Carbapenemase produzierend (KPC positive), extensiver multiresistenter Stamm erhalten von CDC.

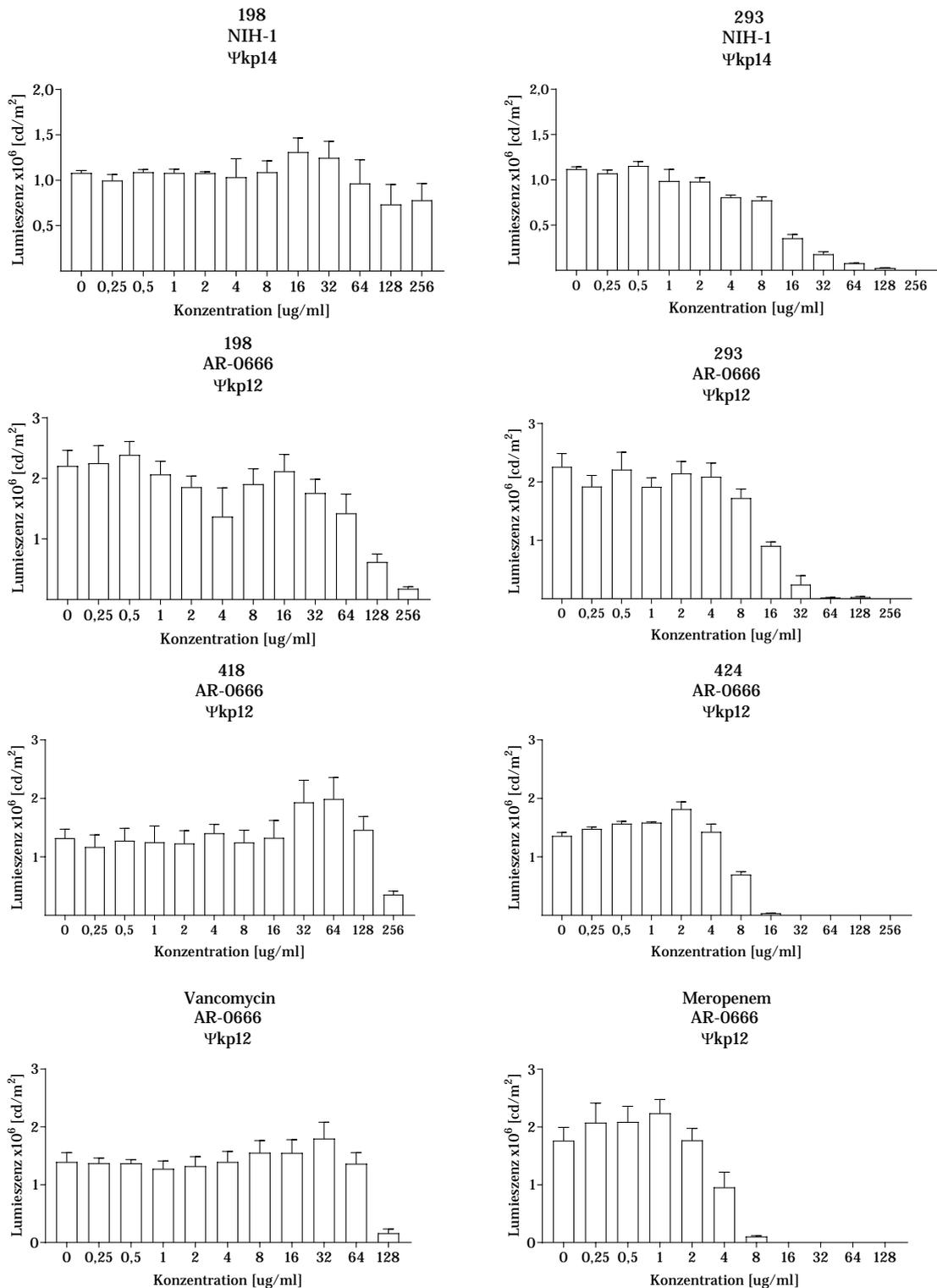
<sup>e</sup>Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 22.

<sup>f</sup>Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 1.

<sup>g</sup>Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 4.

Das chirale Dodekamer 424 besaß von den untersuchten Peptoiden die höchste antimikrobielle Wirkung (17,6  $\mu$ M) gegen den pan-resistenten *Klebsiella* Stamm AR-0666. Alle anderen untersuchten Peptide verfügen über eine schwache bis keine hemmende Wirkung. Auffallend war zudem, dass bei allen untersuchten Peptoiden und Stämmen das Bakterienwachstum zunächst nicht hemmend wirkte, sondern zuerst ein Wachstumsanstieg zu verzeichnen war (Abbildung 28).

## 2. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 28:** Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität der Peptide 198, 293 418 und 424 gegen Carbapenem-sensitive Klebsiella NIH-1  $\Psi\text{kp14}$  und Carbapenem-resistente Klebsiella AR-0666  $\Psi\text{kp12}$ .

## 2.6 Ampetoids gegen *Mycobacteria*

Ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit TB infiziert. Dabei ist TB eine schwer kontrollierbare und eine tödlich endende Krankheit. Die Behandlung von TB wird durch das Auftreten von Arzneimittelresistenzen erschwert. Multiresistente Tuberkulose (MDR-TB) ist zunehmend verbreitet. Muster der Arzneimittelresistenz unterscheiden sich zudem je nach Mykobakterium Stamm. Angesichts der geringen Erfolgsraten in der klinischen Entwicklung neuer TB-Medikamente ist es dringend erforderlich, strukturell neuartige antimikrobielle Mittel gegen TB zu identifizieren. Daher wurden die antimikrobiell aktiven Peptide gegen *S. aureus* ATCC 29737 auf antimikrobielle Aktivität gegen *M. bovis*, *M. chelonae*, *M. abscessus* und *M. intracellulare* untersucht (Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Antimikrobielle Aktivität gegen *Mycobacterium* der Peptoidbibliothek 1, 2, 3, Oktamere, Nonamer, Undekamer und Dodekamere.

Peptoid/ Bibliothek	MHK <sub>90</sub> <sup>a</sup> , µg/ml			
	<i>M. bovis</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. intracellulare</i>
<b>Peptoidbibliothek 1<sup>b</sup></b>				
54	10	20	>150	>150
72	20	37,5	>150	>150
198	10	20	>150	>150
200	37,5	>150	>150	>150
<b>Peptoidbibliothek 2<sup>c</sup></b>				
293	20	75	>150	>150
297	20	37,5	>150	120
321	10	37,5	>150	120
322	10	75	>150	150
324	20	75	>150	150
<b>Peptoidbibliothek 3<sup>d</sup></b>				
360	20	75	150	80
361	20	75	>150	150
374	20	20	150	40
378	20	20	150	40
<b>Peptoidbibliothek Oktamere<sup>e</sup></b>				
403	>75	37,5	75	ND <sup>g</sup>
404	37,5	37,5	37,5	ND
414	>75	37,5	37,5	ND

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid/ Bibliothek	MHK <sub>90</sub> <sup>a</sup> , µg/ml			
	<i>M. bovis</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. intracellulare</i>
415	37,5	37,5	75	ND
<b>Nonamer<sup>f</sup></b>				
420	>125	ND	ND	ND
<b>Undecamer<sup>f</sup></b>				
421	>125	ND	ND	ND
<b>Dodecamer<sup>f</sup></b>				
424	>125	ND	ND	ND
<b>Antibiotika</b>				
Rifampicin	2,3	ND	ND	1,1
Isoniazid	2,3	ND	ND	ND
Clarithromycin	ND	4,6	75	ND

<sup>a</sup> MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006)

<sup>b</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 22.

<sup>c</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 1.

<sup>d</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 2.

<sup>e</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 3.

<sup>f</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 4.

<sup>g</sup> ND, Nicht determiniert

*M. bovis* ist Erreger der TB bei Rindern und kann auch auf andere Haustiere sowie den Menschen übertragen werden (Morris et al. 1994). Das Peptoid 198 aus Peptoidbibliothek 1 und die Peptoide 293 und 321 aus Peptoidbibliothek 2, sowie die Peptoide 374 und 378 aus Peptoidbibliothek 3 wiesen eine antimikrobielle Aktivität gegen *M. bovis* (MHK<sub>90</sub> 10-20 µg/ml) auf. Oktamere und langkettige Peptoide waren kaum bis nicht antimikrobiell aktiv. Zu den atypischen Mykobakterien gehören *M. chelonae* und *M. intracellulare*, welche ubiquitär vorkommen und zu Krankheiten führen, die oft ähnlich wie TB verlaufen und deshalb als atypisch bezeichnet werden. *M. chelonae* und *M. intracellulare* führen vor allem zu Haut- und Weichteilmanifestationen. Im Vergleich zu den typischen Mykobakterien können sich atypische zum einen schneller vermehren, zum anderen zeigen sie eine stärkere Resistenz gegenüber Antibiotika (Rosenzweig 1979, Brown et al. 1992). Lediglich die Peptoide 54 und 198 zeigten eine sehr schwache antimikrobielle Aktivität gegen *M. chelonae* mit 20 µg/ml. Gegen *M. intracellulare* waren hingegen die Peptoide 374

und 378 antimikrobiell mit einem  $\text{MHK}_{90}$  Wert von  $40 \mu\text{M}$  aktiv. Das schnell wachsende Mykobakterium *M. abscessus* gewann Anfang der 90er Jahre als Krankheitserreger an Bedeutung. *M. abscessus* verursacht hauptsächlich Lungeninfektionen in gefährdeten Bevölkerungsgruppen, wie beispielsweise Patienten mit Mukoviszidose, aber auch Haut-, Weichteil- sowie Augeninfektionen (Mukherjee et al. 2017). Gegen *M. abscessus* waren alle getesteten Peptoide nur bei sehr hohen Konzentrationen  $>37,5 \mu\text{g/ml}$  aktiv.

### **2.6.1 Synergistischer Effekt von antimikrobiellen Peptoiden, Isoniazid und Rifampicin gegen *Mycobacterium bovis***

Interaktive Effekte zwischen Molekülen können einen Krankheitsverlauf stark beeinflussen. Oft werden Infektionen mit multiresistenten Bakterien mit Kombinationen von Antibiotika behandelt, um die Infektionen schneller und effizienter zu bekämpfen. Dabei wurde im Vorfeld durch *in vitro* Tests die positive Wechselwirkung von zwei antimikrobiell agierenden Substanzen untersucht. Es gibt viele experimentelle Modelle, um solche Kombinationseffekte zu messen. Eine der bekanntesten und einfachsten Formen solcher Tests ist das "Schachbrett"-Experiment, bei dem eine zweidimensionale Anordnung von Konzentrationsserien der Testverbindungen als Grundlage für die Berechnung eines fraktionellen Hemmkonzentrationsindex (FICI) verwendet wird (Odds 2003). Einen FICI-Wert von  $\leq 0,5$  belegt, dass zwei gepaarte Wirkstoffkombinationen eine synergistische Hemmwirkung ausüben, die größer ist, als die Summe ihrer Wirkungen allein. Ab einem FICI-Wert zwischen 0,6 und 1,9 wird von einem additiven Effekt gesprochen. FICI-Werte  $\geq 2,0$  zeigen, dass die Wirkstoffkombination antagonistisch wirkt.

5 potente Peptoide konnten gegen *M. bovis* in Kapitel 2.6 identifiziert werden und wurden auf einen synergistischen Effekt mit den Antibiotika Rifampicin und Isoniazid getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargelegt.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 14:** Synergistischer Effekt der antimikrobiell aktiven Peptide gegen *M. bovis*.

Nr.	MHK <sub>90</sub> <sup>b</sup> , µg/ml			Kombination Peptoid	Kombination ISO	Kombination RIF	ISO FICI <sup>e</sup>	RIF FICI <sup>f</sup>
	<i>M. bovis</i>							
	Peptoid <sup>b</sup>	ISO <sup>c</sup>	RIF <sup>d</sup>					
<b>Peptoidbibliothek 1<sup>g</sup></b>								
198	20	3,2	0,00125	10	1,6	0,0009	1	1,25
<b>Peptoidbibliothek 2<sup>h</sup></b>								
293	20	3,2	0,003	0,15	1,6	0,0019	0,5	0,64
321	20	3,2	0,00125	0,15	1,6	0,0019	0,5	1,5
<b>Peptoidbibliothek 3<sup>i</sup></b>								
374	20	3,2	0,00125	10	1,6	0,0019	1	2
378	10	3,2	0,00125	10	1,6	0,0019	1,5	2,5

<sup>a</sup> MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

<sup>b</sup> MHK<sub>90</sub> Peptoid allein.

<sup>c</sup> ISO, Isoniazid, MHK<sub>90</sub> Isoniazid allein.

<sup>d</sup> RIF, Rifampicin, MHK<sub>90</sub> Rifampicin allein.

<sup>e</sup> Fractional inhibitory concentration Peptoid und Isoniazid.

<sup>f</sup> Fractional inhibitory concentration Peptoid und Rifampicin.

<sup>g</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 22.

<sup>h</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 1.

<sup>i</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 2.

Einen synergistischen Effekt besitzen die Peptide 293 und 321 in Kombination mit dem Antibiotikum Isoniazid (FICI 0,5). Einen additiven Effekt wiesen die Peptide 198, 374 und 378 in Kombination mit Isoniazid auf (FICI 1-1,5). Ebenfalls einen additiven Effekt in Kombination mit Rifampicin konnte bei den Peptoiden 198, 293, und 321 festgestellt werden (FICI 0,6-1,5). Einen antagonistischen Effekt konnte bei einer Kombination aus Rifampicin und den Peptoiden 374 und 378 bestimmt werden (FICI 2-2,5).

### 2.7 Antimikrobielle Aktivität gegen *Candida albicans*

Neben den bakteriellen Infektionen stellen uns auch immer wieder Pilzinfektionen vor großen Herausforderungen. In der Theorie sind alle Menschen mit dem Pilz *C. albicans* besiedelt, der bei manchen Menschen zu einem ernsten, lebensbedrohlichen Krankheitserreger werden kann. *C. albicans* besitzt ein ganzes Arsenal von Merkmalen, die seine Pathogenität fördern, einschließlich des

Phänotypwechsels (Alby und Bennett 2009), des Hefe-Hyphen-Übergangs (Kumamoto und Vines 2005) und der Sekretion von Molekülen, die die Adhäsion an abiotische Oberflächen fördern (Chandra et al. 2001). Dementsprechend besteht ein kompliziertes Gleichgewicht zwischen der Fähigkeit von *C. albicans*, in das Wirtsgewebe einzudringen, und den Abwehrmechanismen des Wirts (Kim und Sudbery 2011, Kumamoto und Pierce 2011). Eine Veränderung dieses empfindlichen Wirt-Pilz-Gleichgewichts kann zu einer hohen Patientensterblichkeit führen (Pittet et al. 1994, Charles et al. 2003). Systemische *C. albicans*-Infektionen sind in 42% der Fälle tödlich (Wisplinghoff et al. 2003). Trotz der Anwendung von Antimykotika ist *C. albicans* die vierthäufigste Infektion in Krankenhäusern (Gudlaugsson et al. 2003, Pappas et al. 2003). Daher wurden alle Peptoidbibliotheken auf die antimikrobielle Aktivität gegen *C. albicans* ATCC 10231 untersucht.

**Tabelle 15:** Peptoidnummer, Sequenz, Molekulargewicht und antimikrobielle Aktivität gegen *C. albicans* ATCC 10231 aller in Kapitel 2.1 vorgestellten Peptoidbibliotheken.

Peptoid/ Bibliothek	Sequenz	MW <sup>a</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>b</sup> <i>C. albicans</i> ATCC 10231	
			[μM]	[μg/ml]
<b>Peptoidbibliothek 1</b>				
Keine antimikrobielle Aktivität gegen <i>C. albicans</i>		-	>200	>200
<b>Peptoidbibliothek 2</b>				
Keine antimikrobielle Aktivität gegen <i>C. albicans</i>		-	>200	>200
<b>Peptoidbibliothek 3</b>				
Keine antimikrobielle Aktivität gegen <i>C. albicans</i>		-	>200	>200
<b>Peptoidbibliothek Oktamere</b>				
Keine antimikrobielle Aktivität gegen <i>C. albicans</i>		-	>200	>200
<b>Pentamer<sup>c</sup></b>				
418	H-Ntridec-NLys-Nspe-Nspe-NLys-NH <sub>2</sub>	835,19	16,8	14
<b>Nonamere<sup>c</sup></b>				
419	H-Mys-Mys-Mys-Mys-Ntrp-Ntrp-Ntrp-Ntrp-Nile-NH <sub>2</sub>	1443,86	ND <sup>d</sup>	ND
420	H-Mys-Ntrp-Mys-Mys-Ntrp-Ntrp-Mys-Ntrp-Nphe-NH <sub>2</sub>	1477,87	ND	ND
<b>Undekamere<sup>c</sup></b>				
421	H-(NLys-Nspe-Nspe) <sub>3</sub> -NLys-Nspe NH <sub>2</sub>	1658,16	ND	ND

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Peptoid/ Bibliothek	Sequenz	MW <sup>a</sup> [g/mol]	MHK <sub>90</sub> <sup>b</sup> <i>C. albicans</i> ATCC 10231	
			[μM]	[μg/ml]
<b>Dodekamere<sup>c</sup></b>				
422	H-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-Nphe-Nprg- Npcb-Npcb-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-NH <sub>2</sub>	1833,58	>200	>200
423	H-Nphe-Nprg-Nprg-Nphe-Nphe-Nprg- Nprg-Nphe-Nphe-Nprg-Nprg-NH <sub>2</sub>	1730,25	>200	>200
424	H-(Nlys-Nspe-Nspe) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	1819,36	8,1	14,7
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH <sub>2</sub>	2846,7	1,5	4,5

<sup>a</sup>MW, Molekulargewicht.

<sup>b</sup>MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

<sup>c</sup>Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 4.

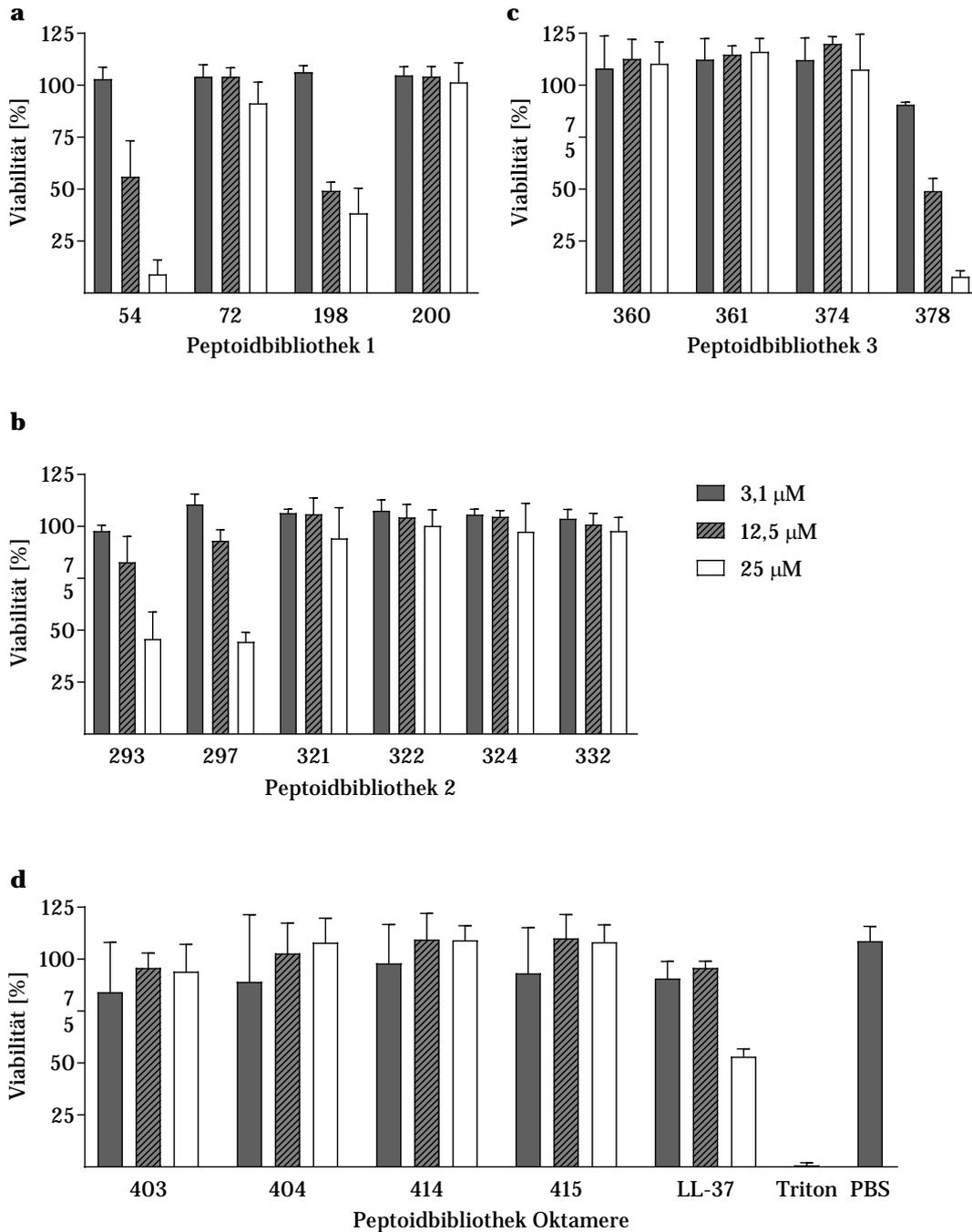
<sup>d</sup>ND, Nicht determiniert.

Die Peptide aus Peptoidbibliothek 1, 2 und 3, sowie alle Oktamere zeigte keine hemmende Wirkung gegen *C. albicans*. Lediglich Peptoid 418 und 424 zeigte eine antimikrobielle Wirkung gegen *C. albicans* bei 16,8 μM und 8,1 μM.

## 2.8 Zytotoxizität von antimikrobiellen Peptoiden

Eine geringe zytotoxische Wirkung ist für Arzneimittel von großer Bedeutung, um das Ausmaß an Nebenwirkungen auf einem Minimum zu halten. Insbesondere neuere Antibiotika, wie das Fluorchinolon Ciprofloxacin, besitzen eine nachgewiesene Neur- und Hepatozytotoxizität (Schwartz und Calvert 1990, Polson 2007). Um zu untersuchen, ob die ausgewählten antimikrobiell aktiven Peptoide eine zytotoxische Aktivität besitzen, wurden HepG2 Zellen mit verschiedenen Peptoidkonzentrationen behandelt. HepG2 Zellen sind Leberkarzinomzellen und eignen sich für die Bestimmung der Zytotoxizität von antimikrobiell wirkenden Substanzen, da diese im humanen Körper über die Leber verstoffwechselt werden. Die Viabilität ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Bestimmung der letalen Dosis bei 50% ( $LD_{50}$ ) wurde mit Hilfe des MTS-Assays durchgeführt. Dafür wurden  $2 \times 10^4$  Zellen mit verschiedenen Peptoidkonzentrationen für 24 h inkubiert. Lebende Zellen sind in der Lage den MTS Tetrazolium Farbstoff intrazellulär in den blauen Farbstoff Formazan zu reduzieren. Diese Umwandlung geschieht vermutlich durch NAD(P)H-abhängige Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen. Der von den lebensfähigen Zellen produzierte blaue Formazan-Farbstoff kann durch Messen der Absorption bei 490–500 nm quantifiziert werden. Peptoide 72 und 200 aus Peptoidbibliothek 1 zeigten keine zytotoxische Aktivität. Hingegen besaßen die Peptoide 54 und 198 einen zytotoxischen Wert ( $LD_{50}$ ) von  $12,5 \mu\text{M}$ . Der  $MHK_{90}$  Wert für diese Peptoide liegt bei  $6,3 \mu\text{M}$ . Bei dieser Konzentration hätten die Zellen immer noch eine Viabilität von  $>75\%$ . Die Peptoide 293 und 297 aus Peptoidbibliothek 2 hatten einen  $LD_{50}$ -Wert von  $12,5 \mu\text{M}$ . Der  $MHK_{90}$  Wert lag bei beiden Peptoiden bei  $1,6 \mu\text{M}$  und liegt somit unter dem  $LD_{50}$ -Wert und kann aufgrund dessen vernachlässigt werden. Die Peptoide 321, 322, 324 und 332, ebenfalls aus Peptoidbibliothek 2 zeigten keinen signifikanten zytotoxischen Effekt. In Peptoidbibliothek 3 zeigte das Peptoid 378 einen  $LD_{50}$  Wert bei einer Konzentration von  $25 \mu\text{M}$ . Hingegen wiesen die Peptoide 360, 361 und 374 keine messbare zytotoxische Aktivität bei  $\geq 25 \mu\text{M}$  auf. Ebenfalls zeigten Oktamere keine Zytotoxizität. Insgesamt hatten alle antimikrobiell aktiven Peptoide eine geringe bis keine zytotoxische Wirkung auf die Säugerzellen und stellen somit eine mögliche Alternative zu Antibiotika dar.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

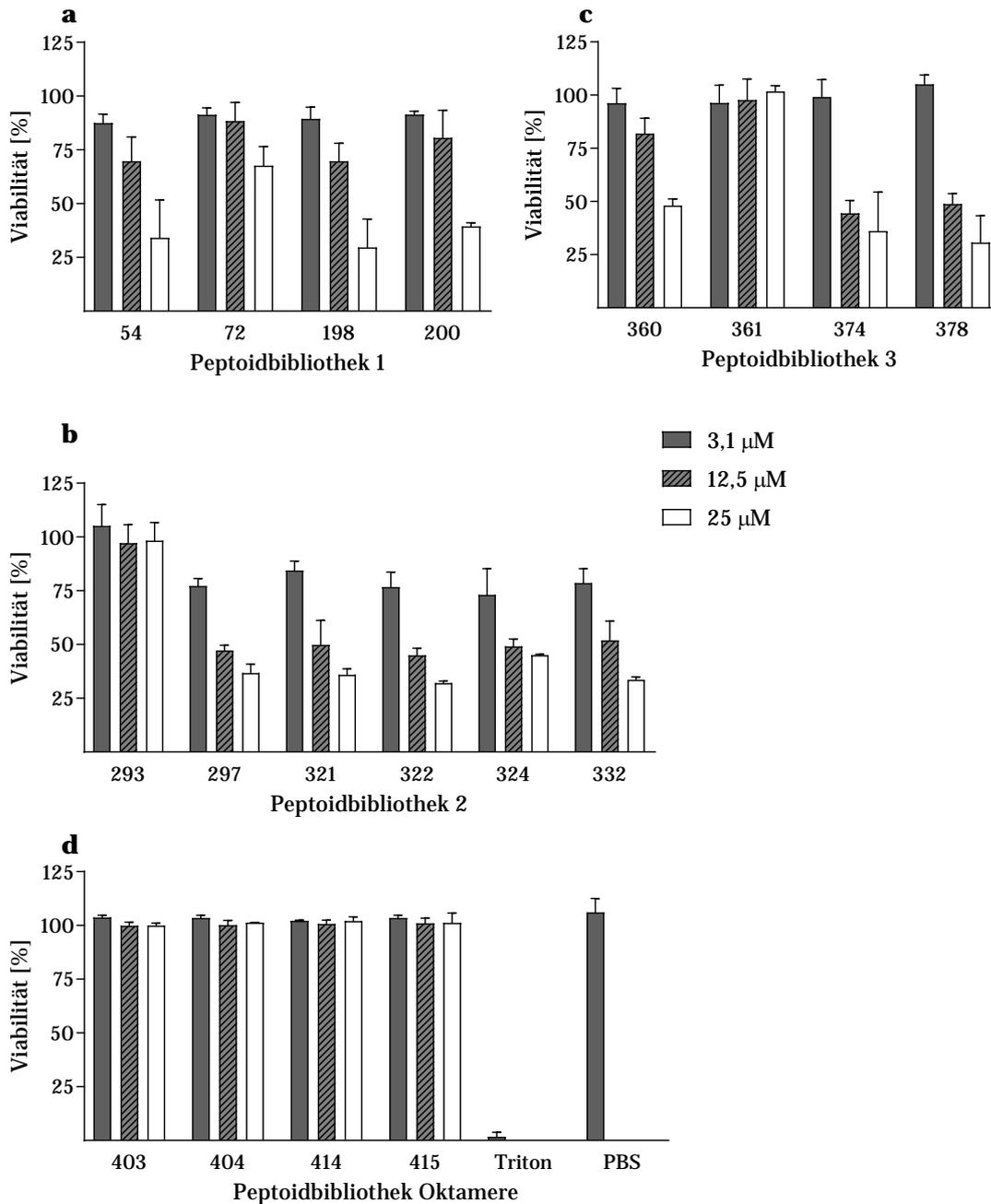


**Abbildung 29:** Zytotoxische Aktivität von antimikrobiell aktiven Peptoiden gegen *S. aureus*. HepG2 Zellen wurden mit antimikrobiell aktiven Peptoiden aus Peptoidbibliothek 1 (a), Peptoidbibliothek 2 (b), Peptoidbibliothek 3 (c) und Peptoidbibliothek Oktamere (d) behandelt und anschließend die Viabilität gemessen.

## 2.9 Hämolytische Aktivität von antimikrobiellen Peptoiden

Eine geringe hämolytische Wirkung für Arzneimittel ist von großer Bedeutung, um das Ausmaß an Nebenwirkungen im Körper auf ein Minimum zu halten. Zudem ist es wichtig, dass antimikrobiell aktive Peptoide bei einer drohenden Sepsis Erythrozyten im Blutkreislauf nicht zusätzlich beschädigen (Kempe et al. 2007). Um zu untersuchen, ob die ausgewählten antimikrobiell aktiven Peptoide eine hämolytische Aktivität besitzen, wurden humane Erythrozyten mit verschiedenen Peptoidkonzentrationen behandelt. Die Resultate des Hämolyse Assays ist in Abbildung 30. dargestellt. Für die Evaluierung der hämolytischen Aktivität wurden frische humane Erythrozyten für 24 h mit verschiedenen Peptoidkonzentrationen behandelt. Danach wurden die Erythrozyten abzentrifugiert und der Überstand wurde bei 540 nm photometrisch gemessen. Bei einer hämolytischen Aktivität platzen die Erythrozyten und das Hämoglobin färbt den Überstand rot. Die Peptoide 54, 72, 198 und 200 aus Peptoidbibliothek 1 hatten eine 50%-ige hämolytische Dosis ( $HD_{50}$ ) bei einer Behandlung mit  $12,5 \mu\text{M}$  Peptoid. Die  $MHK_{90}$  Werte dieser Peptoide lagen bei  $6,3 \mu\text{M}$  und würden demnach eine Viabilität der Erythrozyten bei  $>75\%$  aufweisen. Die Peptoide 297, 321, 322 und 324 aus Peptoidbibliothek 2 haben einen  $HD_{50}$ -Wert von ebenfalls  $12,5 \mu\text{M}$ . Die  $MHK_{90}$  Werte dieser Peptoide lagen zwischen  $1,6 \mu\text{M}$  und  $3,1 \mu\text{M}$  und würden demnach eine Viabilität der Erythrozyten bei  $>60\%$  aufweisen. Das Peptoid 293 aus Peptoidbibliothek 2 war nicht hämolytisch aktiv. Aus Peptoidbibliothek 3 ist das Peptoid 361 ebenfalls nicht hämolytisch aktiv. Hingegen sind die Peptoide 360 und 378 bei einer Behandlung mit  $12,5 \mu\text{M}$  Peptoid hämolytisch aktiv. Die  $MHK_{90}$  Werte dieser Peptoide lagen bei  $3,1 \mu\text{M}$  und  $1,6 \mu\text{M}$  und würden demnach eine Viabilität der Erythrozyten bei  $100\%$  aufweisen. Peptoid 374 hat einen  $HD_{50}$  Wert von  $3,1 \mu\text{M}$  und hat somit die stärkste gemessene hämolytische Aktivität. In Anbetracht des  $MHK_{90}$ -Werts von  $1,5 \mu\text{M}$  lag der  $HD_{50}$ -Wert bei Peptoid 374 immer noch über dem  $HD_{50}$  Wert. Die  $HD_{50}$ -Werte aller gemessenen antimikrobiell aktiven Peptoide lagen unter dem  $MHK_{90}$ -Wert des jeweiligen Peptoids.

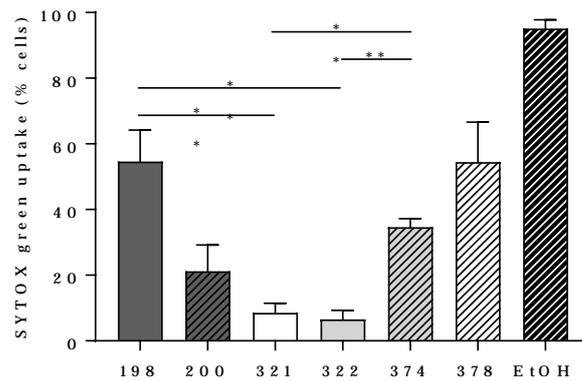
## 2. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 30:** Hämolytische Aktivität von antimikrobiell aktiven Peptoiden gegen *S. aureus*. Humane Erythrozyten wurden mit antimikrobiell aktiven Peptoiden aus Peptoidbibliothek 1 (a), Peptoidbibliothek 2 (b), Peptoidbibliothek 3 (c) und Peptoidbibliothek Oktamere (d) behandelt und anschließend die Viabilität gemessen.

### **2.10 Membranpermeabilisierung von *Ampetoids***

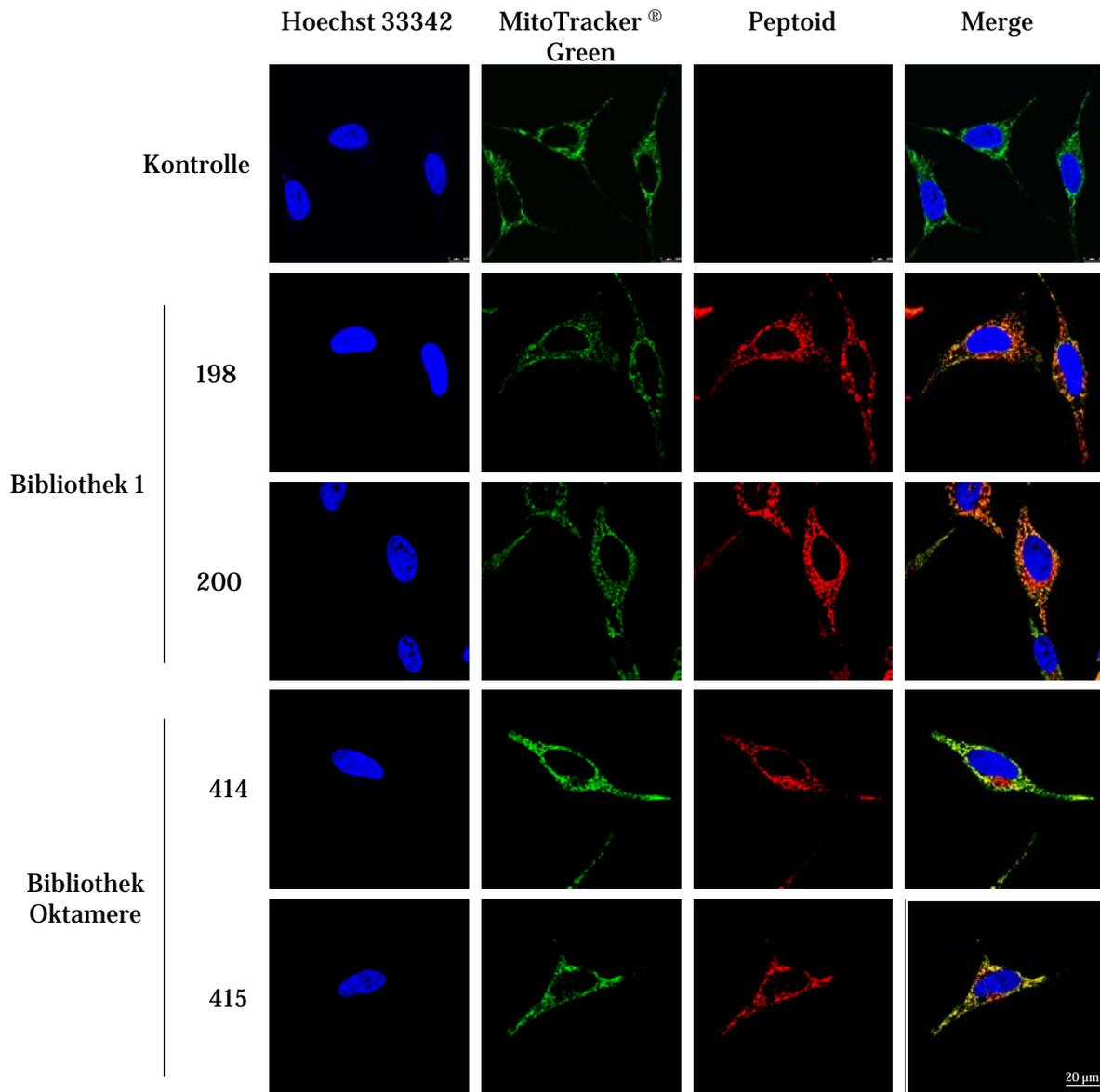
Um zu untersuchen, ob die ausgewählten antimikrobiell aktiven Peptide eine Membranpermeabilisierung von *S. aureus* ATCC 29737 bewirken, wurden verdünnte Übernachtskulturen mit 1xMHK der Peptide 2 Stunden lang inkubiert. Durchflusszytometrie wurde verwendet, um den Anteil der Bakterienpopulation zu messen, dessen Membran permeabilisiert wurde. Die Membranaktivität der Peptide zeigte sich in der erfolgreichen Aufnahme von SYTOX Green, einem fluoreszierenden Farbstoff, der nur mit eingeschränkter Membranintegrität in Zellen eindringen und intrazelluläre Nukleinsäuren anfärben kann. Während der durchflusszytometrischen Analyse konnte SYTOX Green einfach von den Rhodamin B markierten Peptidmolekülen unterschieden werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle führt die Behandlung mit allen ausgewählten Peptiden zu einer SYTOX Green Aufnahme eines Teils der Kulturen Abbildung 31. Der Prozentsatz der Zellen mit erfolgreicher Farbstoffaufnahme variierte jedoch zwischen den Peptiden. Während die Behandlung mit den Peptiden 198 und 378 die Membran von mehr als der Hälfte der Bakterienpopulation permeabilisierte (54,6% bzw. 54,4%), war die Membranaktivität der Peptide 200 und 374 weniger ausgeprägt (21,2% bzw. 34,7%). Die Peptide 321 und 322 beeinflussten die Membran kaum, wodurch weniger als 10% der Kultur für SYTOX Green durchlässig wurden. Die untersuchten Peptide besitzen alle eine starke antimikrobielle Aktivität, wirken allerdings nicht aufgrund von Membrandisruption, da nicht alle Peptide die Membran von *S. aureus* permeabilisieren.



**Abbildung 31:** Membranpermeabilisierung in *S. aureus* ATCC 29737 induziert durch antimikrobiell aktive Peptide. Darstellung des prozentualen Anteils an SYTOX Green gefärbten Zellen in der Kultur im Vergleich zu der Kontrolle. Flusszytometrie Histogramme befinden sich im Appendix in Abbildung 48.

### 2.11 Lokalisation von *Ampetoids* in Zellen

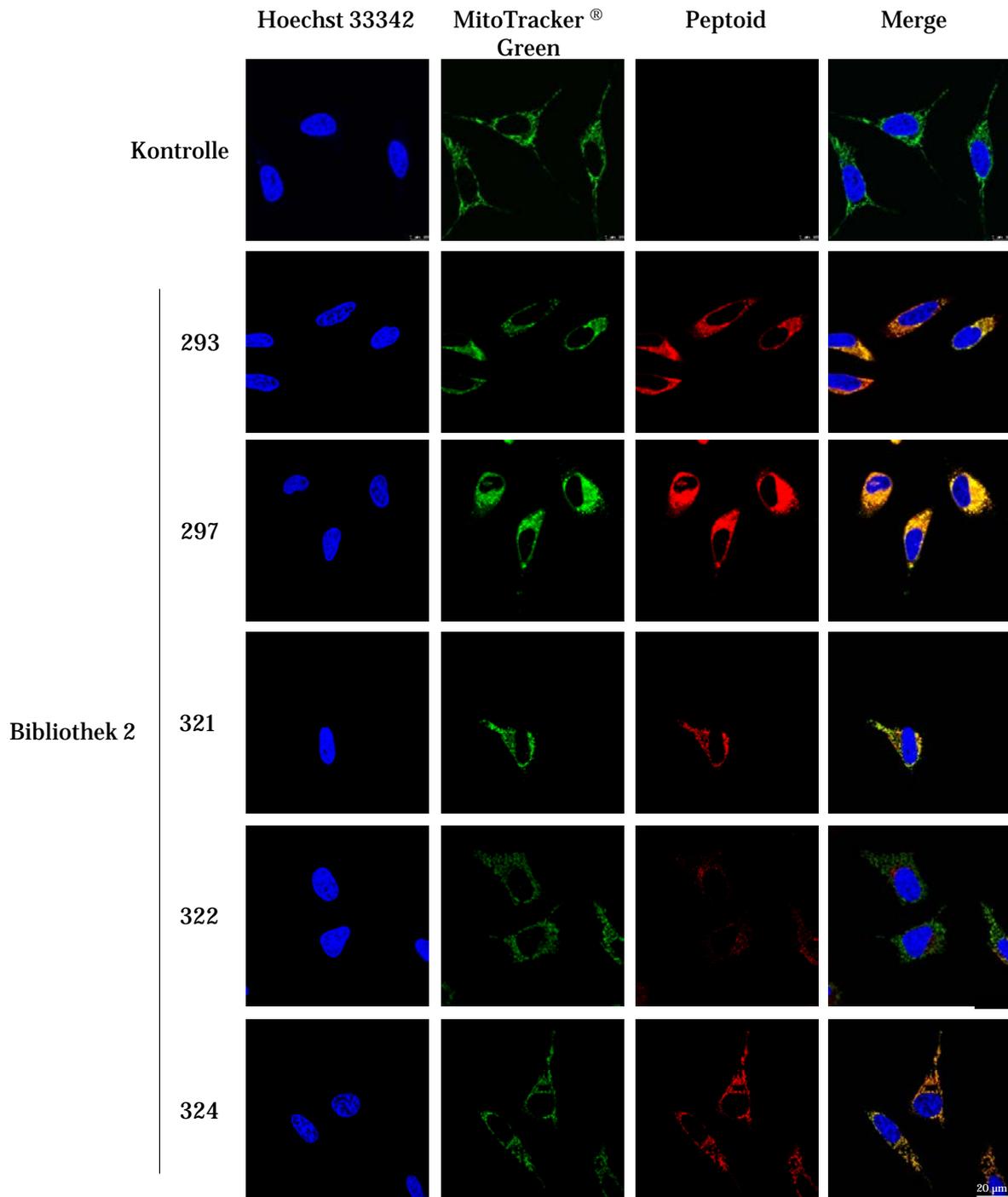
Ein Schlüssel für die pathogene Beständigkeit von Mtb ist die Überlebensfähigkeit in Wirtsmakrophagen. Obwohl mehrere für dieses Überleben erforderliche Faktoren identifiziert wurden, ist ein umfassendes Wissen über solche Faktoren und deren Zusammenwirken zur Manipulation der Wirtsumgebung zum Nutzen des Bakterienüberlebens nicht ausreichend erforscht (Barczak et al. 2017). Daher ist es besonders wichtig, dass der antimikrobielle Wirkstoff auch in infizierten Zellen penetrieren kann, um dort dessen Wirkung freizusetzen. Um die zellpenetrierende Eigenschaft der *Ampetoids* zu untersuchen, wurde die zelluläre Aufnahme in Hela und RAW Makrophagen untersucht. Für die Untersuchung wurde exemplarisch die gegen *S. aureus* ATCC 29737 antimikrobiell aktiven Peptide 198, 200, 414, 415, 293, 297, 321, 322, 324, 360, 361, 374 und 378 gewählt.



**Abbildung 32:** Zelluläre Aufnahme der antimikrobiell aktiven Peptoide 198, 200, 414 und 415 in HeLa Zellen.  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden mit  $10 \mu\text{M}$  Peptoid für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Mitochondrien wurden mit  $125 \text{ nM}$  MitoTracker<sup>®</sup> Green und Zellkerne wurden mit  $2 \mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 Fluoreszenz markiert. Die intrazelluläre Akkumulation der Peptoide wurde mittels Konfokalmikroskopie (Leica TCS-SPE, Objektiv: ACS APO 63x/1,3 OIL) bei folgenden Wellenlängen aufgenommen: Hoechst 33342: Ex.:  $405 \text{ nm}$ , Em.:  $417\text{-}468 \text{ nm}$ ; Mitotracker<sup>®</sup> Green: Ex.:  $488 \text{ nm}$ , Em.:  $499\text{-}552 \text{ nm}$ ; Peptoid: Ex.:  $561 \text{ nm}$ , Em.:  $593\text{-}696 \text{ nm}$ . Maßstab:  $20 \mu\text{m}$ .

Die Tetramere 198 und 200, sowie die Oktamere 414 und 415 penetrieren in HeLa Zellen (Abbildung 32). Dabei konnten Peptoide identifiziert werden, die in den Mitochondrien akkumulieren. Zusätzlich zu mitochondrialen Aufnahmen wurden die Oktamere 414 und 415 in den Endosomen lokalisiert. Dies könnte an dem geringen Anteil der Seitenketten Npcb liegen.

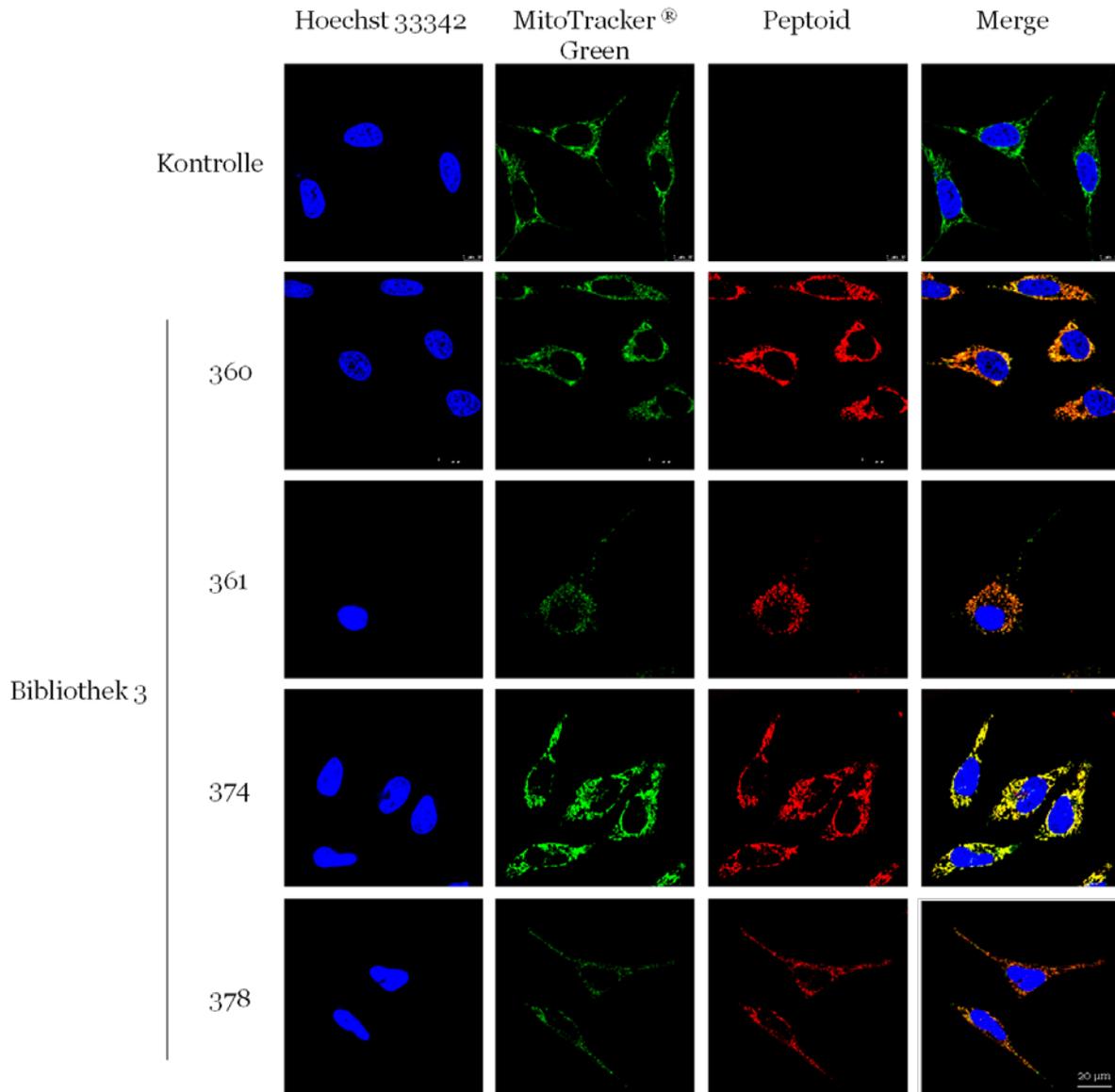
## 2. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 33:** Zelluläre Aufnahme der antimikrobiell aktiven Peptide aus Peptoidbibliothek 2 in HeLa Zellen.  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden mit  $10 \mu\text{M}$  Peptoid für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Mitochondrien wurden mit  $125 \text{ nM}$  MitoTracker® Green und Zellkerne wurden mit  $2 \mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 Fluoreszenz markiert. Die intrazelluläre Akkumulation der Peptide wurde mittels Konfokalmikroskopie (Leica TCS-SPE, Objektiv: ACS APO 63x/1,3 OIL) bei folgenden Wellenlängen aufgenommen: Hoechst 33342: Ex.:  $405 \text{ nm}$ , Em.:  $417\text{-}468 \text{ nm}$ ; Mitotracker® Green: Ex.:  $488 \text{ nm}$ , Em.:  $499\text{-}552 \text{ nm}$ ; Peptoid: Ex.:  $561 \text{ nm}$ , Em.:  $593\text{-}696 \text{ nm}$ . Maßstab:  $20 \mu\text{m}$ .

Die Tetramere 293,297,321,322 und 324 penetrierten in HeLa Zellen (Abbildung 33). Dabei waren die Peptide 293,297,321 und 324 ausschließlich in den Zellen innerhalb

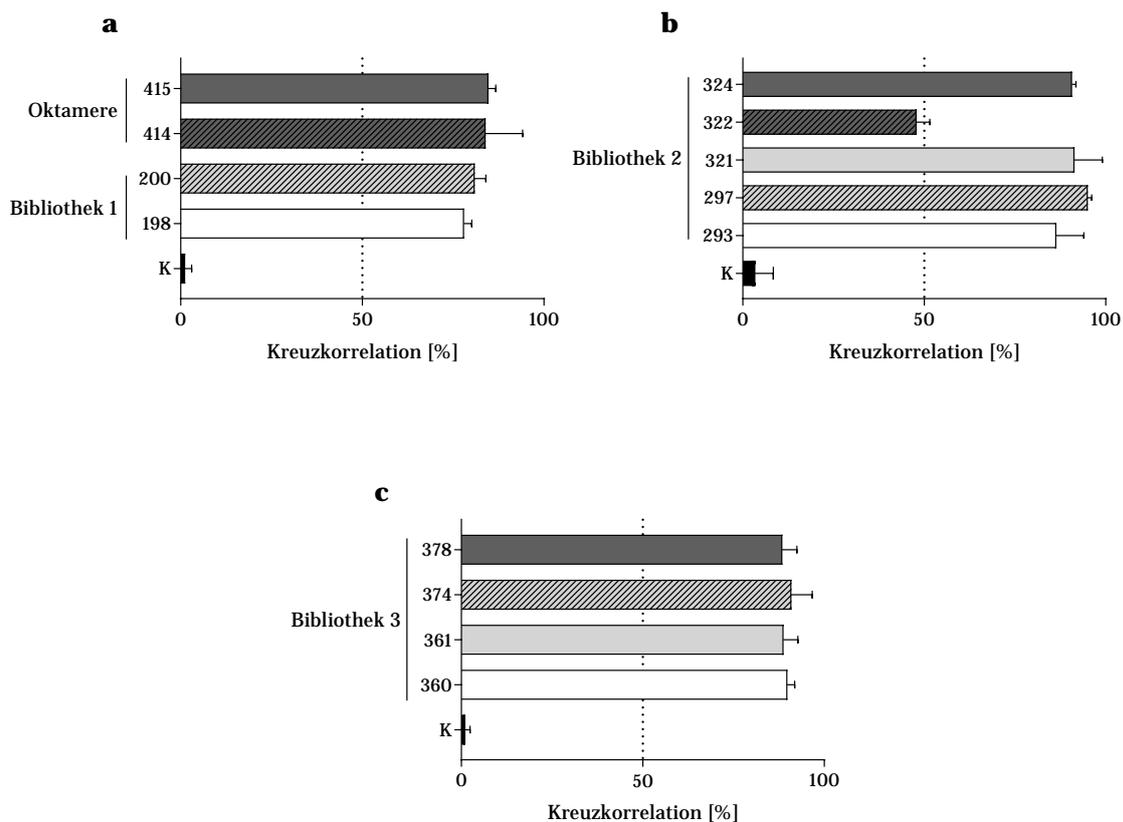
der Mitochondrien lokalisiert. Peptoid 322 hingegen reichte sich ausschließlich in den Endosomen an. Eine strukturelle Kongruenz in Bezug auf die Lokalisation der Peptide ist bei dieser Bibliothek nicht erkennbar.



**Abbildung 34:** Zelluläre Aufnahme der antimikrobiell aktiven Peptide aus Peptoidbibliothek 3 in HeLa Zellen.  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden mit  $10 \mu\text{M}$  Peptoid für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Mitochondrien wurden mit  $125 \text{ nM}$  MitoTracker® Green und Zellkerne wurden mit  $2 \mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 Fluoreszenz markiert. Die intrazelluläre Akkumulation der Peptide wurde mittels Konfokalmikroskopie (Leica TCS-SPE, Objektiv: ACS APO 63x/1,3 OIL) bei folgenden Wellenlängen aufgenommen: Hoechst 33342: Ex.:  $405 \text{ nm}$ , Em.:  $417\text{-}468 \text{ nm}$ ; Mitotracker® Green: Ex.:  $488 \text{ nm}$ , Em.:  $499\text{-}552 \text{ nm}$ ; Peptoid: Ex.:  $561 \text{ nm}$ , Em.:  $593\text{-}696 \text{ nm}$ . Maßstab:  $20 \mu\text{m}$ .

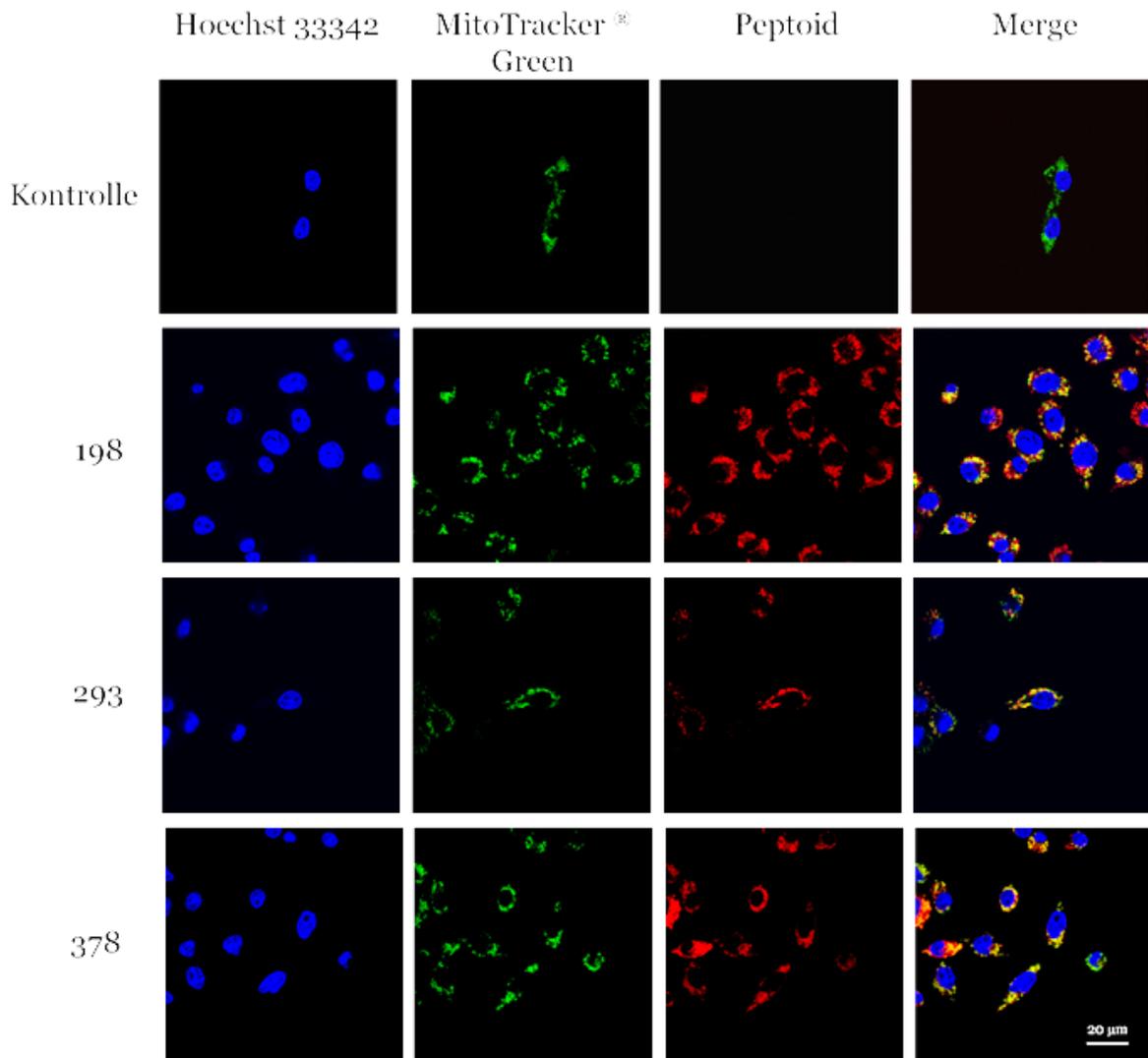
## 2. Ergebnisse und Diskussion

Die antimikrobiell aktiven Tetramere aus Peptoidbibliothek penetrierten in Hela Zellen (Abbildung 34). Dabei waren die Peptide 360, 361, 374 und 378 Peptide ausschließlich in den Zellen innerhalb der Mitochondrien lokalisiert. Peptoid 374 hingegen reichte sich neben den Mitochondrien auch in den Endosomen an. Es besteht aus den Aminen *Nhe*, *Npcb* und *Nprg*, wobei *Nhe* als Doppelabfolge vorkommt. Neben der visuellen Analyse wurden die Signale von Peptoid und Mitotracker® Green durch Kreuzkorrelation mit Hilfe der Software Matlab® überprüft (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Kreuzkorrelation des rot/grün Signals für die antimikrobiell aktiven Peptide der Peptoidbibliothek 1 (a), Oktamere (a), Peptoidbibliothek 2 (b) und Peptoidbibliothek 3 (c). Übereinstimmung der mitochondrialen Signale (grün) und der peptoidischen Signale (rot). Dafür wurden die Pixel jedes Signals der zwei Kanäle über die Kreuzkorrelation mit Hilfe von Matlab® überprüft.

Die Peptide 414, 415, 198, 200, 293, 297, 321, 322, und 324 waren in den Mitochondrien lokalisiert. Ausschließlich Peptoid 322 lokalisierte in den Endosomen. Neben der Lokalisierung in Hela Zellen wurde auch überprüft, ob sich die Peptide in Makrophagen anreichern (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Zelluläre Aufnahme der antimikrobiell aktiven Peptide 198, 293 und 278 in RAW264,7 Zellen.  $3 \times 10^4$  RAW 264,7 Zellen wurden mit  $10 \mu\text{M}$  Peptoidsuspension für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Mitochondrien wurden mit  $125 \text{ nM}$  MitoTracker<sup>®</sup> Green und Zellkerne wurden mit  $2 \mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 Fluoreszenz markiert. Die intrazelluläre Akkumulation der Peptide wurde mittels Konfokalmikroskopie (Leica TCS-SPE, Objektiv: ACS APO 63x/1,3 OIL) bei folgenden Wellenlängen aufgenommen: Hoechst 33342: Ex.:  $405 \text{ nm}$ , Em.:  $417\text{-}468 \text{ nm}$ ; Mitotracker<sup>®</sup> Green: Ex.:  $488 \text{ nm}$ , Em.:  $499\text{-}552 \text{ nm}$ ; Peptoid: Ex.:  $561 \text{ nm}$ , Em.:  $593\text{-}696 \text{ nm}$ . Maßstabbalken:  $20 \mu\text{m}$ .

Die Peptide 198, 293 und 378 akkumulieren ebenfalls in den Mitochondrien. Alle untersuchten Peptide sind zellpenetrierend und können somit ihre antimikrobielle Wirkung auch innerhalb der Zelle ausüben. Bakterien akkumulieren meist in den Phagosomen. Damit die in Phagosomen befindlichen Bakterien trotzdem von der antimikrobiellen Wirkung der Peptide gehemmt werden, könnte diese durch möglicherweise entstehende reaktive Sauerstoffspezies (ROS) inhibiert werden. Oxidativer Stress kann das Bakterienwachstum hemmen (Dharmaraja 2017).

Bakterien wie *E. coli* und lebensbedrohliche infektiöse Krankheitserreger wie *S. aureus* und *M. tuberculosis* sind gegenüber Veränderungen in der intrazellulären oxidativen Umgebung empfindlich. Daher könnten kleine Moleküle wie Peptide, die die Antioxidationsmittelkonzentrationen modulieren und / oder den intrazellulären ROS erhöhen, die zelluläre oxidative Umgebung stören und den Zelltod induzieren und somit als neuartige Therapeutika dienen.

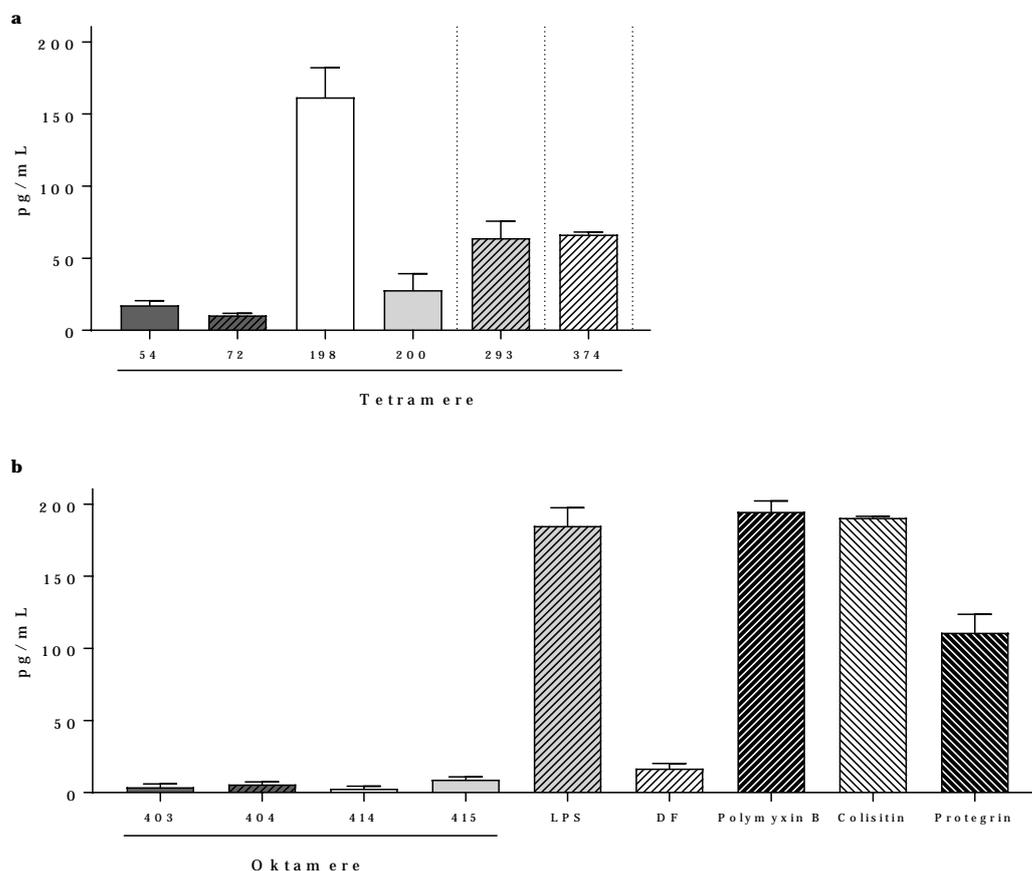
### **2.12 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ Stimulierung**

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ist ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems und somit ein wichtiger Faktor in der Immunabwehr gegen Bakterien. Er zählt zur Gruppe der Zytokine und ist ein zentraler Mediator bei der Immunantwort. TNF- $\alpha$  wird von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet und wirkt im Körper stark pyrogen. TNF- $\alpha$  zirkuliert im ganzen Körper als Reaktion auf Stimuli, wie Infektionserreger oder Gewebeverletzung, aktiviert Neutrophile, verändert die Eigenschaften vaskulärer Endothelzellen, reguliert die Stoffwechselaktivitäten in anderen Geweben und zeigt durch das Hervorrufen einer lokalisierten Blutgerinnung eine tumorizide Wirkung. TNF- $\alpha$  hemmt zudem die Lipoproteinlipaseaktivität, was zu Kachexie, einer physischen Erschöpfungserscheinung, führen kann. Die Aktivierung von B-Zellen durch das Epstein-Barr-Virus kann durch TNF- $\alpha$  inhibiert werden (Boussiotis et al. 1994, Morrison et al. 2004, Parameswaran und Patial 2010). Aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen im gesamten Immunsystem kann TNF- $\alpha$  eine Rolle bei der Pathogenese vieler Krankheitszustände spielen.

Patienten, die mit Anti-TNF- $\alpha$  Medikamenten, wie Infliximab, einem Arzneimittel gegen u. a. rheumatische Erkrankungen behandelt werden, sind besonders anfällig für schwerwiegende bakterielle und virale Infektionen (Salliot et al. 2007). Die am häufigsten befallenen Organe sind dabei die des Atmungssystems, Haut- und Weichgewebe sowie der Harnweg (den Broeder et al. 2002, Keystone et al. 2004).

Die Rolle von TNF- $\alpha$  in der menschlichen Immunantwort bei TB-infizierten Menschen ist bis heute unklar (Keane et al. 2001). Eine Hypothese ist, dass dieses Zytokin für einige Erscheinungsformen tuberkulöser Erkrankungen verantwortlich sein könnte, darunter Gewichtsabnahme, nächtliches Schwitzen und Gewebeerstörung (Rook et al. 1987, Tramontana et al. 1995). Im Gegensatz zu Interferon- $\gamma$  und Interleukin-12 ist bei TNF- $\alpha$  keine schützende Rolle bei der humanen Immunantwort auf Mykobakterien bekannt (Newport et al. 1996, de Jong et al. 1998). In Mausmodellen jedoch spielt

TNF- $\alpha$  eine zentrale Rolle in der Wirtsreaktion gegen Tuberkulose, insbesondere bei der Granulombildung und der Eindämmung der Krankheit (Kindler et al. 1989, Flynn et al. 1995, Senaldi et al. 1996, Turner et al. 2001). Antikörper gegen TNF- $\alpha$  bewirken sogar eine Reaktivierung von TB in einem Mausmodell bei latenten Infektionen (Mohan et al. 2001, Gerriets und Khaddour 2019). Daher ist es neben antimikrobieller Aktivität und geringer Toxizität, sowie niedriger hämolytischen Aktivität von *Ampetoids* auch die TNF- $\alpha$  Stimulierung für die Bekämpfung von multiresistenten Bakterien von großer Bedeutung. Für die Untersuchung der TNF- $\alpha$  Stimulierung wurden 10 antimikrobiell aktive Peptide ausgewählt und mit Hilfe des TNF-alpha ELISA Assay von Invitrogen analysiert. Als positive Kontrollen dienten LPS, Polymyxin B, Colistin und Protegrin (Abbildung 37).



**Abbildung 37:** TNF- $\alpha$  Stimulierung von antimikrobiell aktiven Peptiden.

Es wurden vier antimikrobiell aktive Tetramere aus der Peptoidbibliothek 1, ein antimikrobiell aktives Tetramer aus Peptoidbibliothek 2 und 3, sowie vier Oktamere zur Untersuchung der TNF- $\alpha$  Stimulierung ausgewählt. Hierbei handelt es sich um

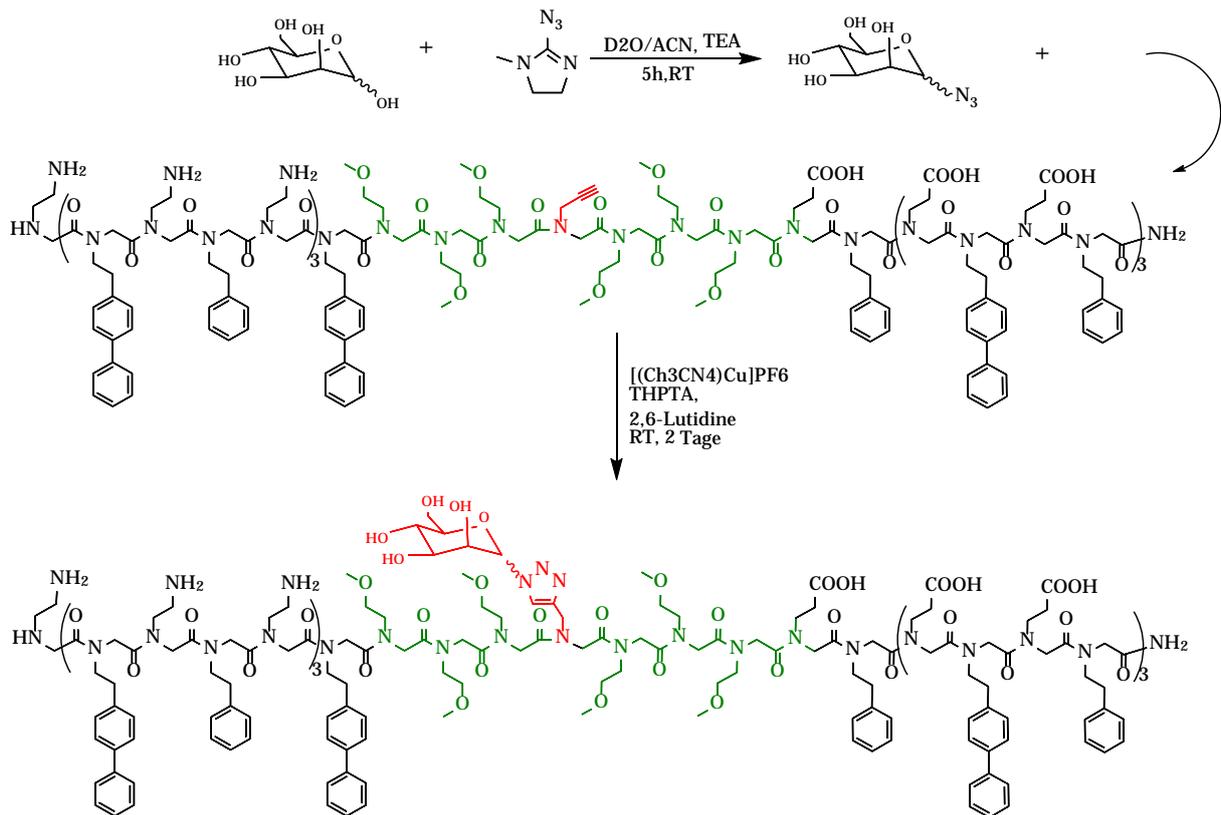
Peptide, die eine antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* zeigten (siehe Kapitel 2.2). Dabei zeigte Peptoid 198 eine sehr starke Stimulierung von über 150 pg/ml. Die Peptide 293 und 374 zeigten eine leichte Stimulierung von TNF- $\alpha$  mit etwa 70 pg/ml. Keines der Oktamere zeigte eine TNF- $\alpha$  Stimulierung. Dabei korrelierte diese Nicht-Stimulierung mit der sehr schwachen antimikrobiellen Aktivität der Oktamere (MHK<sub>90</sub> 3,1  $\mu$ M bis  $\geq 100$   $\mu$ M) gegen MRSA. Die Oktamere 403, 404 414 und 415 waren kaum antimikrobiell aktiv gegen MRSA. Peptoid 198 zeigte die stärkste antimikrobielle Aktivität mit durchschnittlich 3  $\mu$ M. Die Peptide 293 und 374 besaßen noch eine starke antimikrobielle Aktivität mit durchschnittlich 3 bzw. 6  $\mu$ M. Zudem zeigte Peptoid 198 eine schwache antimikrobielle Aktivität gegen pan resistente *Klebsiella*. Peptoid 293 waren hingegen nicht aktiv gegen pan resistente *Klebsiella*. Dies lässt darauf schließen, dass je antimikrobiell aktiver das Peptoid gegen eine große Bandbreite an gram-positiven und gram-negativen Bakterien, desto wahrscheinlicher ist eine TNF- $\alpha$  Stimulierung.

### 2.13 Glykosilierte Peptoidnanosheets

In der Natur ist Multivalenz eine wichtige Eigenschaft für die selektive Bindung für viele Rezeptoren zu ihren Zielmolekülen. Dieses Phänomen spielt eine wichtige Rolle bei signifikanten biologischen Schlüsselprozessen, wie beispielsweise bei der Signalweiterleitung oder bei der Zelladhäsion (Mammen et al. 1998, Fasting et al. 2012). Eines der bedeutungsvollsten Beispiele für Multivalenz ist die Bindung von multivalenten Proteinen an Membran-gebundenen Kohlenhydraten auf Zelloberflächen, wie beispielsweise bei Bakterien. Aber auch andere infektiöse Pathogene wie Viren erkennen ihren Wirt durch multivalente Interaktion mit dessen oberflächengebundenen Kohlenhydraten, um den Infektionsprozess zu initiieren (Pizarro-Cerda und Cossart 2006, Grove und Marsh 2011). Daher versuchen viele wissenschaftliche Gruppen die Zelloberfläche und dessen multivalente Liganden zu imitieren, um diese als Inhibitoren oder Detektoren gegen Pathogene zu nutzen (Gestwicki et al. 2002, Bonduelle und Lecommandoux 2013, Wittmann und Pieters 2013). Beispiele hierfür sind Dendrimere (Maier et al. 2003), Fullerene (Munoz et al. 2016), Rotaxane (Vincent et al. 2016), Polymere (Pati et al. 2012) und Peptosome (Huang et al. 2012). Eine weitere Möglichkeit zur Imitierung der Zelloberfläche bieten glykosilierte Peptoidnanosheets (Battigelli et al. 2018). Dabei wird eine alternierende

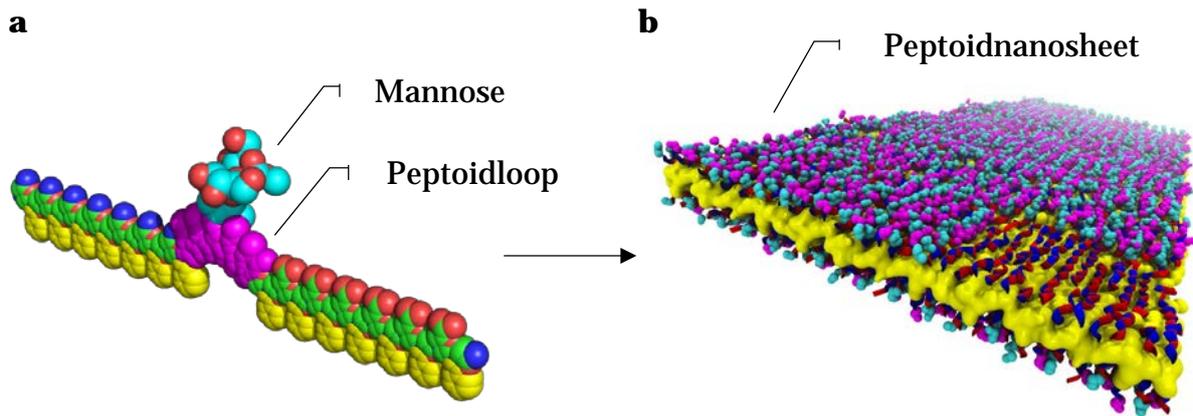
Sequenz aus einer Abfolge von polaren und unpolaren Peptoidmonomeren zu einer hochstabilen 2-D Nanostruktur durch Selbstassemblierung in Wasser geformt (Nam et al. 2010, Sanii et al. 2011, Robertson et al. 2016). Die Peptoidstränge, die solche supramolekularen Strukturen erzeugen, bestehen dabei aus der aromatischen Seitenkette *N*-(2-phenylethyl)glycin (*Npe*), sowie aus einer aromatischen, polaren, ionischen Seitenkette (*Npe<sub>R</sub>*). Die polaren Amine können in zwei Gruppen unterteilt werden: in die anionische Seitenkette *N*-(2-aminoxyethyl)glycin (*Nae*) und in die kationische Seitenkette *N*-(2-carboxyethyl)glycin (*Nce*). Werden in der Mitte der Peptoidstränge kurze Domänen der polaren Seitenkette *N*-(2-methoxyethyl)glycin (*Nme*) inseriert, entstehen auf der äußeren Seite des Peptoidnanosheets sogenannte Peptoidloops (Olivier et al. 2013, Battigelli et al. 2018). Die Strukturen hierfür sind in Tabelle 27 im Appendix zusammengestellt. Durch die Modularität der Peptide, wie bereits für die verschiedenen Peptoidbibliotheken beschrieben, ist es möglich ein clickbares Alkin wie *Nprg* in den Peptoidstrang zu inserieren. Dadurch kann ein Ligand, wie beispielsweise Mannose, spezifisch in den Peptoidloop eingefügt werden (Abbildung 38).

## 2. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 38:** Kupfer katalysierte azid-alkin-Cycloadditionreaktion von Mannose an die alkinhaltige Peptoidsequenz *Nprg*.

Neben der Glykosilierbarkeit besitzen Peptoidnanosheets noch weitere Merkmale, um eine Zelloberfläche zu imitieren. Sie verfügen über einen hydrophoben Kern, eine zwitterionische hydrophile Oberfläche, eine Dicke von 3 nm und eine Länge sowie Breite von hunderten Mikrometern. Die Struktur eines glykosilierten Peptoidnanosheets ist in Abbildung 39 dargestellt.



**Abbildung 39:** Struktur eines glykosilierten Peptoidnanosheets. Das Molekül Mannose ist in Türkis/Rot abgebildet. Der Peptoidloop ist in der Farbe Lila dargestellt. Peptoidnanosheets werden durch hierarchische Mechanismen durch Selbstassemblierung geformt. Zunächst erfolgt eine erste Formation der Peptoidstränge in einen geordneten Monolayer (a). Daraufhin erfolgt ein irreversibler Kollaps in eine Bilayerstruktur (b) (modifiziert nach Battigelli et al 2018).

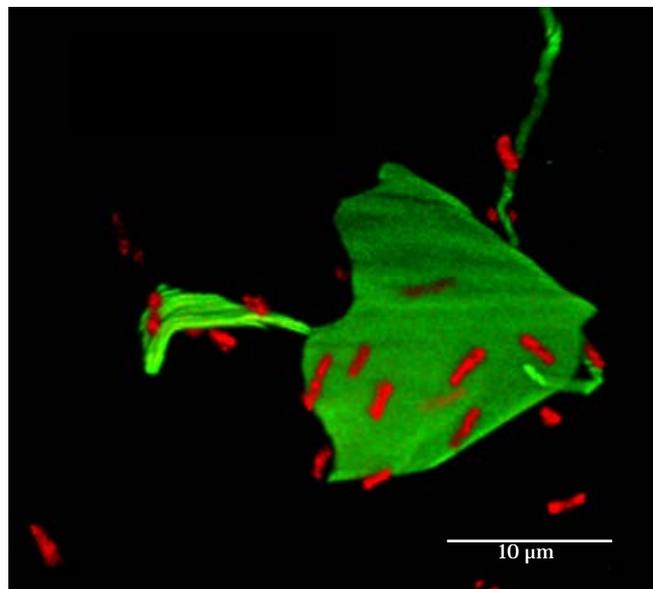
In Zusammenarbeit mit Ronald Zuckermann, Jaqueline Dang und Behzad Rad (LBNL, Berkeley, USA) wurde die Bindung von *E. coli* an mannosebeschichtete Peptoidnanosheets untersucht. Zudem wurde die antimikrobielle Aktivität von mannosebeschichteten und unbeschichteten Peptoidnanosheets untersucht. Dazu wurden *E. coli* ORN 178 Kulturen mit den jeweiligen mannosebeschichteten und unbeschichteten Peptoidnanosheets inkubiert und danach auf Agarplatten zur Koloniebestimmung ausplattiert. Zur Kontrolle wurden die mannosebeschichteten und unbeschichteten Peptoidnanosheets mit *E. coli* ORN 208 inkubiert. *E. coli* ORN 208 besitzt ein mutiertes *fimH* Gen, welches für das mannosebindendes Adhesin Fimbrin kodiert (Harris et al. 2001). Dadurch kann *E. coli* ORN 208 keine Mannose mehr binden. Einen Überblick über die Bindemöglichkeiten von *E. coli* ORN 178 und *E. coli* 208 mit Mannose beschichteten Peptoidnanosheets und unbeschichteten Peptoidnanosheets ist in Tabelle 16 zusammengestellt. Die Plasmidzusammensetzung der verwendeten Stämme ist im Appendix in Tabelle 24 zusammengestellt.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 16:** Übersicht über die Bindung von *E. coli* ORN 178 und *E. coli* ORN 208 zu Mannose beschichteten Peptoidnanosheets und unbeschichteten Peptoidnanosheets.

	Mannose beschichtete Peptoidnanosheets	Unbeschichtete Peptoidnanosheets
<i>E. coli</i> ORN 178 ( <i>fimH</i> Gen nicht mutiert)	Bindung	Keine Bindung
<i>E. coli</i> ORN 208 ( <i>fimH</i> Gen mutiert)	Keine Bindung	Keine Bindung

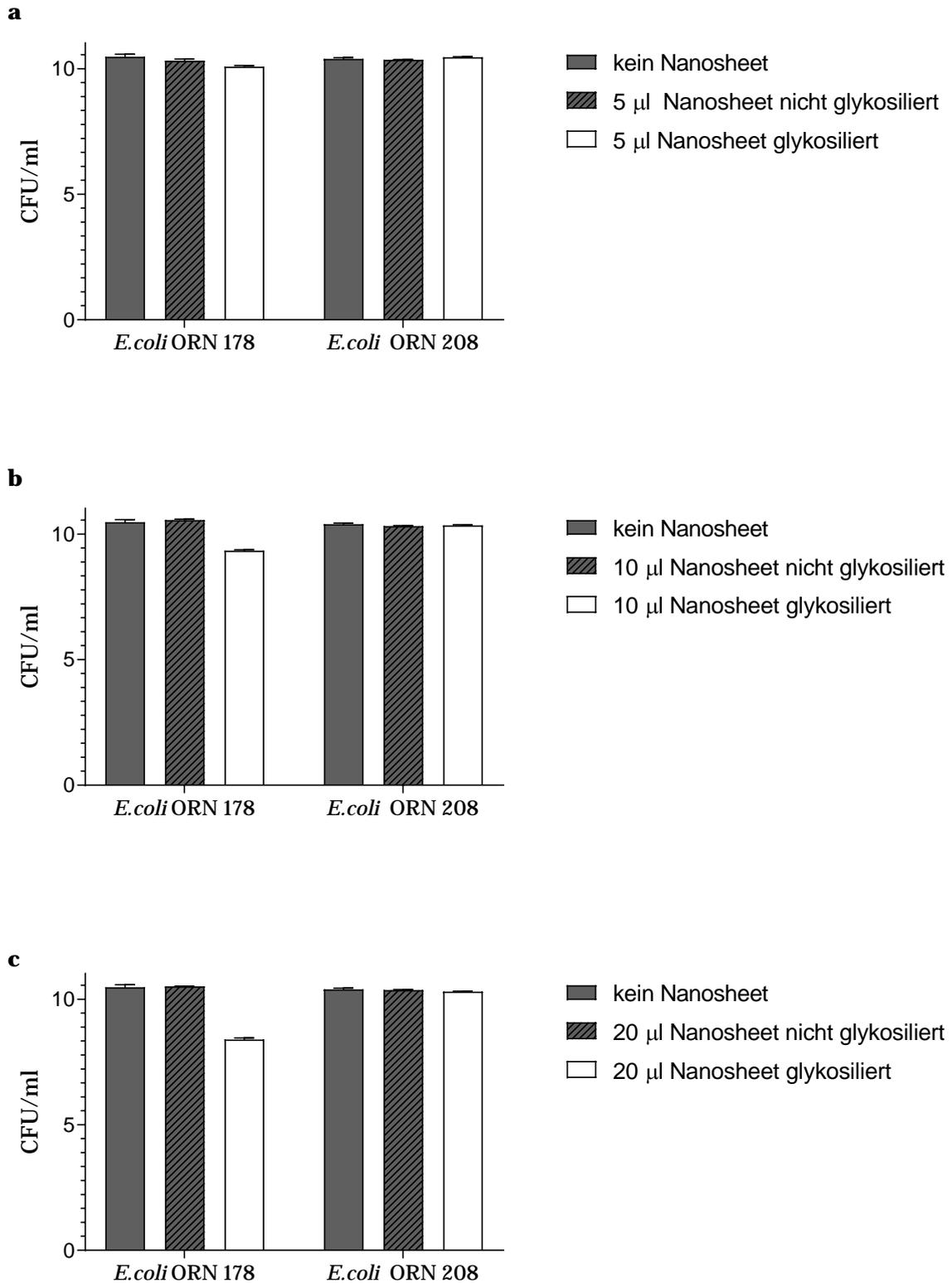
Zur Überprüfung, ob *E. coli* ORN 178 an die mannosebeschichteten Peptoidnanosheets gebunden haben, wurden die Nanosheets mit Flurescein (FITC) Concanavalin A (ConA) und *E. coli* ORN 178 mit SYTOX™ Red markiert. ConA ist ein Lektin Protein aus der Jackbohne *Canavalia ensiformis*, das an Kohlenhydrate, insbesondere Mannose, binden kann. Abbildung 40 zeigt in Grün das mannosebeschichtete Peptoidnanosheet und in Rot *E. coli* ORN 178 Bakterien. Es ist eine deutliche Affinität von *E. coli* ORN 178 an das mannosebeschichtete Peptoidnanosheet zu erkennen. Nur wenige ungebundene Bakterien waren in der Suspension feststellbar.



**Abbildung 40:** Glykosiliertes Peptoidnanosheet markiert mit FITC-ConA (grün) mit gebundenen *E. coli* ORN 178 Bakterien (rot). Bakterien wurden mit 125 nM SYTOX™ Red markiert. Visualisierung erfolgte durch ein Epifluoreszenzmikroskop (Olympus IX81 invertiertes Mikroskop mit Hamamatsu Orca CCD Kamera) bei folgenden Wellenlängen: SYTOX™ Red: Ex.: 633 nm, Em.: 640-658 nm; FITC-ConA: Ex.: 488 nm, Em.: 490-525 nm; Peptoid: Ex.: 561 nm, Em.: 593-696 nm. Maßstab: 10 μm.

Neben der Bindung von *E. coli* 178 wurde auch die antimikrobielle Aktivität der Peptoidnanosheets untersucht, da neben der peptoidischen antimikrobiellen Wirkung auch Mannose über eine bakterielle Inhibierung verfügt. Mannose wird seit geraumer Zeit zur Prävention gegen wiederkehrende Harnwegsinfekte (HWI) eingesetzt (Altarac und Papes 2014, Kranjčec et al. 2014). Dabei wird von der Hypothese ausgegangen, dass D-Mannose die Adhärenz von Bakterien an die Uroepithelialzellen inhibiert und somit mit dem Urin aus der Harnblase herausschwemmt (Schaeffer et al. 1980, Schaeffer et al. 1984, Bouckaert et al. 2005). Erste *in vivo* Studien haben bereits gezeigt, dass D-Mannose an *fimH* Adhäsine, welches am Ende von Typ 1 Fimbria von enteralen Bakterien positioniert ist, bindet und es blockiert. Während der Bakterienbesiedlung bindet *fimH* an kohlenhydrathaltige Glykoproteinrezeptoren an Epithelzellen im Harnweg. Da D-Mannose in ihrer Struktur der Bindungsstelle der Urothelialglykoproteinrezeptoren ähnelt, fungiert D-Mannose als kompetitiver Inhibitor der Bakterienhaftung. In ausreichender Konzentration im Urin bewirkt D-Mannose eine Sättigung der *fimH* Adhäsine und verhindert, dass sich Bakterien an Urothelialrezeptoren binden (Michaels et al. 1983, Altarac und Papes 2014). Mannose beschichtete Peptoidnanosheets könnten die präventive Wirkung gegen HWI von Mannose verstärken. Herkömmliche Präventionsmaßnahmen, wie antibiotische Langezeitprophylaxe, haben eine Rückfallquote von bis zu 60% und besitzen keinen Konsensus über Startpunkt der Einnahme, Einnahmedauer und Einnahmedosis (Gupta und Stamm 1999, Nickel 2005). Zudem sind Nebenwirkungen und Kosten der Antibiotika eine Belastung für die betroffene Person. Aufgrund dieser Problematik wurde die antimikrobielle Aktivität von mannosebeschichteten Peptoidnanosheets untersucht. Dafür wurden wie bei der Untersuchung der Bindefähigkeit von *E. coli* mannosebeschichtete Peptoidnanosheets und unbeschichtete Peptoidnanosheets mit den *E. coli* Stämmen ORN 178 und ORN 208 inkubiert und danach auf Agarplatten kultiviert. Für die Untersuchung des antimikrobiellen Effekts wurden 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l und 20  $\mu$ l Peptoidnanosheet zu den Bakterien hinzugegeben. Anschließend wurden die Kolonien gezählt (Abbildung 41).

## 2. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 41:** Antimikrobielle Wirkung von glykosilierten Peptoidnanosheets gegen *E. coli* ORN 178 und ORN 208. 5 µl (a), 10 µl (b) und 20 µl (c) einer Peptoidnanosheetlösung wurden mit dem *E. coli* Stämmen ORN 178 und ORN 208 inkubiert und danach auf Agaplaten ausgesät. Koloniezählung erfolgte nach 24h.

*E. coli* ORN 178 zeigte bei Inkubation mit mannosebeschichtete Peptoidnanosheets eine Reduktion der koloniebildenden Einheiten. Mit steigender Peptoidnanosheetmenge von 5  $\mu$ l (a), 10  $\mu$ l (b) und 20  $\mu$ l (c) steigt die inhibierende Wirkung von 10 CFU/ml zu 6 CFU/ml. Im Vergleich dazu gab es keine erkennbare Veränderung der koloniebildenden Einheiten von *E. coli* 208 mit mannosebeschichteten Peptoidnanosheets, da *E. coli* 208 aufgrund einer Mutation im *fimH* Gen den Ligand Mannose nicht binden konnte und somit ungehindert koloniebildende Einheiten bilden konnte. Es fand keine antimikrobielle Inhibierung statt. Die Behandlung mit unbeschichteten Peptoidnanosheets zeigte bei beiden *E. coli* Stämmen keine Inhibierung. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass mannosebeschichtete Peptoidnanosheets *E. coli* 178 binden und gleichzeitig durch den Ligand Mannose antimikrobiell aktiv sind. Die antimikrobielle Aktivität ist schwach ausgeprägt. Dies deutet auf eine bakterizide Wirkung der mannosebeschichteten Peptoidnanosheets hin.

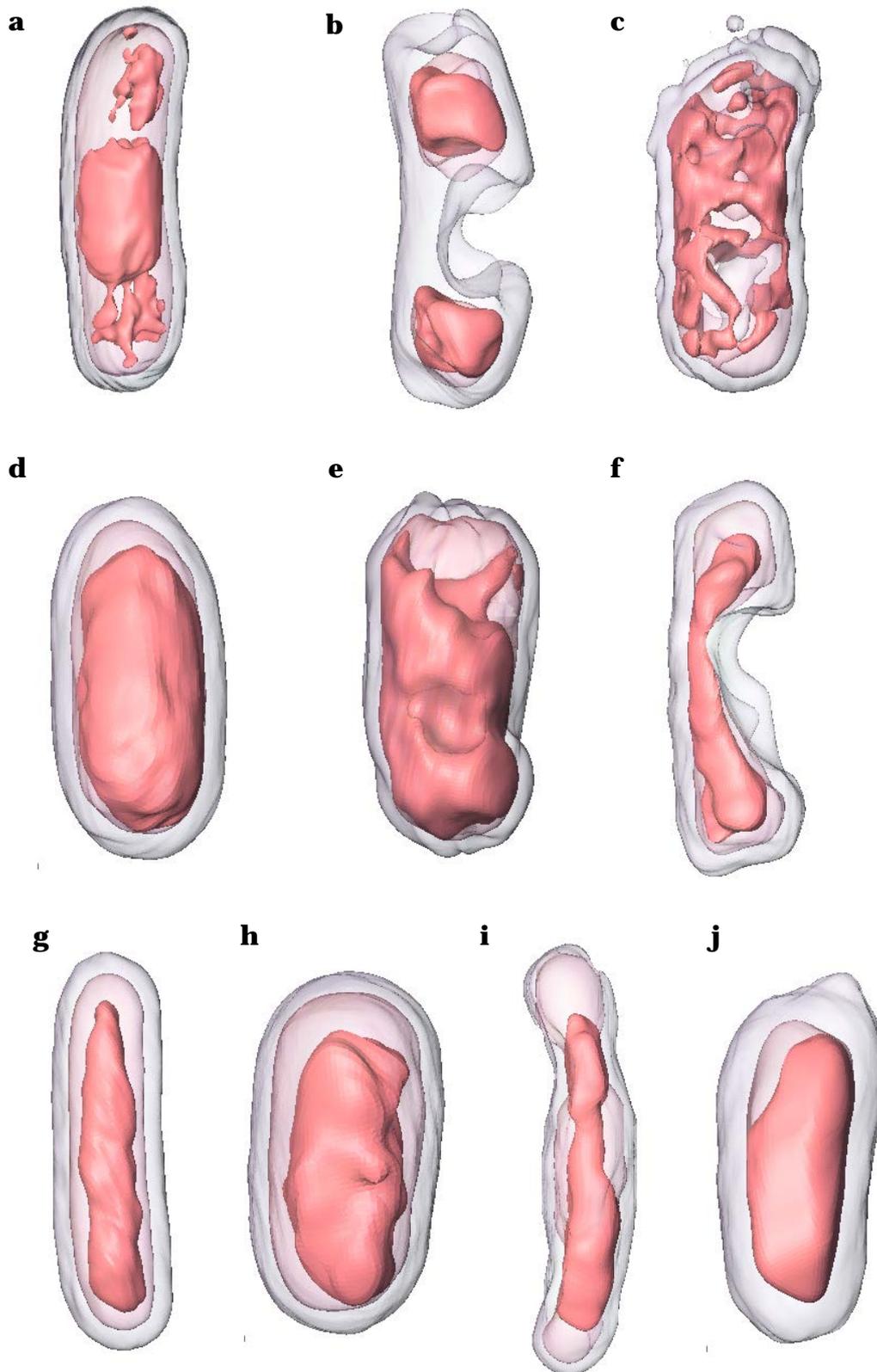
### **2.14 Morphometrie Analyse mit Hilfe von *soft* X-ray Tomographie**

Einige Antibiotikaklassen, wie beispielweise  $\beta$ -Laktame und Glykopeptide, greifen im Bakterium die Zellwand und die Zellmembran an (Bush 2012, Cho et al. 2014). Die daraus resultierenden morphologischen Veränderungen können durch *Imaging* Methoden untersucht werden. Morphometrische Messungen wie die Quantifizierung der Zellform und die Charakterisierung der subzellulären Organisation sind in der Zellbiologie und der klinischen Medizin von grundlegender Bedeutung. Bis vor kurzem waren licht- und elektronenbasierte Mikroskopbilder die Hauptquelle für morphometrische Daten von Zellen. Jedoch sind Hellfeld-Lichtmikroskope in ihrer räumlichen Auflösung durch die Wellenlänge des Lichts begrenzt. Fluoreszenzmikroskope können zwar Bilder über die durch die Wellenlänge der Beleuchtung festgelegte Beugungsgrenze hinweg aufnehmen, sie können jedoch nur fluoreszenzmarkierte zelluläre Strukturen oder Moleküle abbilden, so dass der Inhalt der anderen Zellen dunkel bleibt. Die Elektronenmikroskopie kann nur dünne Proben abbilden. Zellen, die größer als kleine Bakterien sind, müssen in Schnitte mit einer Dicke von weniger als 500 nm geschnitten werden. Röntgenstrahlung hat das Potenzial, diese Einschränkungen zu überwinden und alle Zellbestandteile in Zellen mit hoher räumlicher Auflösung abzubilden. Röntgenstrahlen haben eine lange Geschichte in der klinischen Medizin und in den Materialwissenschaften. Viele Jahre lang konnten Röntgenmikroskope jedoch nicht das frühe Versprechen erfüllen, zellgroße biologische Proben mit hoher räumlicher Auflösung abzubilden. Um dieses Ziel zu erreichen, waren Entwicklungen in den Bereichen der Nanofabrikation, der Detektoren, der Kryokonservierung und des Instrumentendesigns erforderlich. Diese technologischen Fortschritte sind nun erzielt, und die *soft* X-ray Röntgenmikroskopie gewinnt zunehmend an Einfluss und Anerkennung als Werkzeug für die Durchführung morphologischer Messungen an einzelnen Zellen, einschließlich großer eukaryotischer Zellen. Heutzutage gibt es diverse Familien von X-ray Mikroskopen. Dabei kann in zwei Untertypen unterscheiden werden: Zum einen in *soft* (unter 1 keV) X-ray Mikroskope und zum anderen in *hard* (1-100 keV) X-ray Mikroskope. Obwohl lebende Organismen eine geringe Toleranz gegenüber ionisierender Strahlung besitzen und durch Röntgenstrahlung schnell geschädigt werden können, ist es durch kryokonservierte Proben möglich, die Daten ohne Schädigung der Proben zu akquirieren. Aus zellbiologischer Sicht sind sowohl die *soft* als auch die *hard* X-ray

Mikroskopie für die Visualisierung der Morphologie und auch für die Analyse physiologischer Informationen geeignet (Kaulich et al. 2011, Weinhardt et al. 2019). Die bevorzugte Methode für morphologische Untersuchungen einzelner Zellen ist jedoch die *soft X-ray Tomographie*.

Die Stärke der *soft X-ray Tomographie* liegt in der tiefen Eindringtiefe von Photonen und dem Kontrast, der durch die Verwendung einer sogenannten *water window*-Beleuchtung erzeugt wird. Zusammen ermöglichen diese beiden Eigenschaften die Visualisierung und Quantifizierung sowohl der internen als auch der externen Morphologie von Zellen. Während bei der Elektronenmikroskopie das Schneiden der Zellen notwendig ist und die Lichtmikroskopie die Verwendung mehrerer fluoreszierender Markierungen erfordern würde, liefert die *soft X-ray Tomographie* einen natürlichen Kontrast, der auf dem linearen Röntgenschwächungskoeffizienten aller Organellen in einer Zelle basiert (Cole 2016). Zusammenfassend bietet die *soft X-ray Tomographie* eine hohe räumliche Auflösung und eine tiefe Penetration in ganze Zellen. Abbildungen im nativen Zustand und eine quantitative 3D-Analyse von Zellorganellen sind dabei Schlüsselmerkmale der *soft x-ray* Technologie. Dadurch ist es möglich, potenzielle Veränderungen in der Morphologie von peptoidbehandelten Bakterien sichtbar zu machen. Die folgenden Ergebnisse wurden im Arbeitskreis von Dr. Annelise Barron (Stanford University, USA) und in dem Arbeitskreis von Dr. Gerry McDermott (LBNL, Berkeley, USA) am *the Advanced Light Source Department* (LBNL, Berkeley, USA) generiert.

Für die morphologische Untersuchung wurden Bakterien mit den Peptoiden 198, 374, 418, 419 und 424 und mit den Peptiden Melittin, Mafainin-2 und LL-37, sowie mit dem Antibiotikum Tobramycin behandelt und in dünnwandige Glaskapillaren eingebettet. Danach wurden die kryokonservierten Proben durch *soft X-ray Tomographie* analysiert. Ein tomographisches Datenset für jede Probe wurde durch kollektive Aufnahmen von Projektionen bei 2° Abstufungen um die Drehachse gewonnen. Die Projektionsdaten wurden dann rechnerisch rekonstruiert, um 3D-Zellvolumen darstellen zu können. Anschließend wurde jede Zelle segmentiert und gerendert. Dabei wurde die Segmentierung manuell und die 3D-Rekonstruktion mit Hilfe des Amira Software Pakets (*Mercury Computer Systems*) erstellt. Infolgedessen wurde eine signifikante Anzahl an Zellen pro Peptoid und Peptid, sowie für das Antibiotikum tomographisch aufgenommen. Jeweils eine repräsentative Rekonstruktion ist in Abbildung 42 dargestellt.



**Abbildung 42:** Soft X-ray Tomographie von *E. coli* (a, d-j) und *B. subtilis* (b, c) nach Inkubation mit Peptoid 198 (b), Peptoid 374 (c), Peptoid 418 (d), Peptoid 419 (e), Peptoid 424 (f), LL-37 (g), Magainin-2 (h), Melittin (i) und Tobramycin (j), sowie unbehandelt (a). Segmentiert wurden die Membran, das Cytosol, sowie die DNA mit Hilfe der Software Amira. Rot: DNA. Abbildungen der peptoidbehandelten Bakterien aus der X-, Y- und Z-Achsenansicht sind in den Abbildungen 49-58 im Appendix zusammengestellt.

Die Segmentation von subzellulären Strukturen jeder Zelle, wie beispielsweise die DNA (in Rot dargestellt) wurde basierend auf der Kalkulation des linearen Absorption Koeffizienten (LAC) für jedes Voxel erstellt. Der gemessene LAC-Wert für jedes Voxel wird durch die biochemische Zusammensetzung an diesem Punkt in der Zelle determiniert. Regionen in der Zelle mit relativ ähnlicher biochemischer Zusammensetzung (auf der Ebene der beobachteten räumlichen Auflösung) weisen charakteristische LAC-Werte auf (Weiss et al. 2000, Le Gros et al. 2005). Beispielsweise weisen Strukturen wie die DNA konsistente LAC-Werte innerhalb derselben Zelle auf und können sogar zwischen verschiedenen Zelltypen konsistent sein. So wurde in X-ray Tomographiestudien gezeigt, dass eukaryotische Zellen, innerhalb eines bestimmten Organells, wie beispielsweise eines Kerns, variierende LAC-Werte in Übereinstimmung mit den inneren Strukturen und der molekularen Dichte verfügen (Uchida et al. 2009). In dieser Arbeit war es möglich, die Membran, das Cytosol und die DNA allein anhand ihrer gemessenen LAC-Werte zu segmentieren und anschließend die Identität basierend auf LAC- und Organellenform zuzuweisen. In dieser Hinsicht ist die Segmentierung von Strukturen in einer Zelle, die durch *soft* X-ray Tomographie erzeugt wird, analog zur Unterscheidung von Leber zu Niere, Fett zu Muskel oder normalem zu abnormalem Gewebe bei einem Patienten, der durch klinische Computertomographie (CAT) abgebildet wird.

Im Vergleich zu der Kontrolle (Abbildung 42 a) zeigten alle behandelten Bakterien eine auffallende morphologische Abweichung. Die Peptoide 198 (Abbildung 42 b) und 374 (Abbildung 42 c) zeigten eine besonders starke Zellverformung in der Membran der Bakterien. Die DNA war innerhalb der Zelle stark delokalisiert, als die DNA in der Kontrolle. Das Peptide 419 (Abbildung 42 e) und 424 (Abbildung 42 f), sowie das Peptid Melittin (Abbildung 42 i), zeigten ebenfalls eine Membranverformung. Dabei war die DNA in diesen Zellen nahezu im gesamten Cytosol verteilt und zeigte keine morphologische Übereinstimmung im Vergleich zu der Kontrolle. Das Peptoid 418 (Abbildung 42 d) und die Peptide LL-37 (Abbildung 42 g) und Magainin-2 (Abbildung 42 h), sowie das Antibiotikum Tobramycin (Abbildung 42 (j)) zeigten kaum bis keine Membranverformungen auf. Die DNA war im gesamten Cytosol verteilt und war im Vergleich zu der Kontrolle in keiner Ebene konzentriert. Zusammenfassend zeigten alle behandelten Bakterien eine klare Abweichung der Morphologie. Insbesondere die Peptoide 198, 374 und 424, sowie das Peptid Melittin zeigten die Fähigkeit, die Membran der Bakterienzellen stark zu beschädigen sowie zu verformen und sind vermutlich dadurch in der Lage, eine Austrocknung des Cytosols zu erreichen. Des

Weiteren verfügen die Peptoide 198, 374 und 424 über die Fähigkeit, die DNA zu fragmentieren und zu delokalisieren. Trotzdem kann keine klare Aussage über den Wirkmechanismus der untersuchten Peptoide getroffen werden. Viele antimikrobielle Peptide wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, über mehrere Mechanismen zu wirken, wie die Membranpermeabilisierung und die Hemmung von intrazellulären Prozesses, als "schmutzige Medikamente" bezeichnet (Fjell et al. 2011, Rokitskaya et al. 2011). Aufgrund der abgeleiteten Struktur der Peptoide von den Peptiden liegt die Hypothese nahe, dass auch Peptoide über mehr als nur einen Wirkmechanismus verfügen.

Die Kombination aus hoher räumlicher Auflösung und einem Kontrastmechanismus, der subtile Merkmale in Zellen beibehält und aufdeckt, macht die *soft X-ray Tomographie* geeignet um die Wirkweise und die Konsequenzen der Behandlung von Zellen mit Wirkstoffkandidatenmolekülen zu visualisieren. Der Nutzen der Technik wird in naher Zukunft zunehmen, da es nun möglich ist, die korrelierte kryogene Fluoreszenzmikroskopie mit hoher Apertur und die *soft X-ray Tomographie* an derselben Probe durchzuführen (Le Gros et al. 2009).

### **3. Zusammenfassende Diskussion und Schlussfolgerung**

---

Fünf verschiedene Peptoidbibliotheken aus Tetrameren, Pentameren, Oktameren, Nonameren, Undekameren und Dodekameren wurden auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften gegen gram-positive, gram-negative, Mykobakterien und Pilze untersucht. Dabei wurden Peptoide aus sowohl hydrophoben als auch hydrophilen Seitenketten entworfen. Dafür wurden die Seitenketten *N*-(4-aminobutyl)glycin (*Mlys*), *N*-(hexyl)glycin (*Nhe*), *N*-(tridecyl)glycin (*Ntridec*), *N*-(tetradecyl)glycin (*Ntetradec*), Amine *N*-(1-methylpropyl)glycin (*Nile*), *N*-(2-prop-2-yn-1-yl)glycin (*Nprg*), *N*-(benzyl)glycine (*Nphe*), *N*-(S)-(1-phenylethyl)glycin (*Nspe*), *N*-(4-hydroxybenzyl)glycin (*Nphb*), *N*-(4-chlorobenzyl)glycin (*Npcb*), *N*-(4-fluorobenzyl)glycin (*Npfb*) und *N*-(2-indolethyl)glycin (*Ntrp*) verwendet. Des Weiteren wurde untersucht, ob ein synergistischer Effekt zwischen den antimikrobiell aktiven Peptoiden 198, 293, 321, 374 und 378 gegen *Mycobacterium bovis* (MHK<sub>90</sub> zwischen 10 µM und 20 µM) und den Antibiotika Rifampicin und Isoniazid stattfindet. Neben der antimikrobiellen Aktivität wurden die antimikrobiell potenten Peptoide auch auf ihre zytotoxischen und hämolytischen Eigenschaften untersucht. Weiterhin wurde die Stimulierung von TNF-α analysiert, da TNF-α ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems und somit ein wichtiger Faktor in der Immunabwehr gegen Bakterien ist. Des Weiteren wurden die gegen gram-positive Bakterien stark antimikrobiell wirkenden Peptoide 198 und 374 (MHK<sub>90</sub> 6,3 µM und 1,6 µM), sowie die gegen gram-negative Bakterien stark antimikrobiell wirkenden Peptoide 418, 419 und 424 (MHK<sub>90</sub> 3,1-22,2 µM) durch *soft* X-ray Tomographie auf ihre Diskrepanzeigenschaft in der Morphometrie der Bakterien untersucht. Eine zusammenfassende Auflistung der potenten antimikrobiell wirkenden Peptoide ist in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17:** Zusammenfassende Auflistung aller potenten Peptide aus fünf verschiedenen Peptidbibliotheken.

Nr. <sup>a</sup>	MW <sup>b</sup>	MIC <sub>50</sub> <sup>c</sup> , µM für die Stämme:										SR <sup>f</sup>	LD <sub>50</sub> <sup>g</sup> [µM]					
		S. aureus		E. coli		P. aeruginosa		K. pneumoniae		Mycobacterium				C. albicans				
		DM	DM	DM	DM	DR	ATCC	PAO1	NIH-1 <sup>d</sup> Ψkp12	AR- 0606 <sup>e</sup> Ψkp14	bovis	chelonae	abscessus	intracellulare	ATCC	HD <sub>50</sub> <sup>h</sup> [µM]		
<b>Peptidbibliothek 1<sup>h</sup></b>																		
	29737	4299	0004583R	2145	09808R		35218								10231			
54	1046	6,3	ND <sup>f</sup>	ND	ND	ND	>100	>100	ND	ND	10	20	>150	ND	>100	12,5	2	12,5
72	1046	6,3	ND	ND	ND	ND	>100	>100	ND	ND	20	37,5	>150	ND	>100	>25	4	25
198	1046	6,3	1,5	<1,6	6,3	6,3	>100	>100	>245	>245	10	20	>150	ND	>100	12,5	2	12,5
200	1012	6,3	12,5	6,3	12,5	12,5	>100	>100	ND	ND	20	>150	>150	ND	>100	12,5	2	>100
<b>Peptidbibliothek 2<sup>i</sup></b>																		
293	1007	1,6	6,3	3,1	3,1	6,3	>100	>100	240	240	20	75	>150	>150	>100	>25	17	25
297	1103	1,6	3,1	3,1	3,1	3,1	>100	>100	ND	ND	20	37,5	>150	120	>100	6,3	4	12,5
321	1083	1,6	6,3	<1,6	3,1	3,1	>100	>100	ND	ND	10	37,5	>150	120	>100	12,5	8	50
322	1081	3,1	12,5	6,3	12,5	12,5	>100	>100	ND	ND	10	75	>150	150	>100	6,3	2	>100
324	1101	1,6	12,5	3,1	6,3	6,3	>100	>100	ND	ND	20	75	>150	150	>100	12,5	8	50
332	1081	1,6	ND	ND	ND	ND	>100	>100	ND	ND	20	75	>150	>150	>100	12,5	8	>25
<b>Peptidbibliothek 3<sup>j</sup></b>																		
360	1088	3,1	6,3	3,1	3,1	6,3	>100	>100	ND	ND	20	75	150	80	>100	12,5	4	25
361	1101	3,1	12,5	6,3	6,3	6,3	>100	>100	ND	ND	20	75	>150	150	>100	>25	8	25
374	1081	1,6	3,1	<1,6	3,1	3,1	>100	>100	ND	ND	20	20	150	40	>100	6,3	4	25
378	951	1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	>100	>100	ND	ND	20	20	150	40	>100	6,3	4	12,5
<b>Peptidbibliothek Oktamer<sup>k</sup></b>																		
403	1654	12,5	ND	ND	ND	ND	>100	>100	ND	ND	>75	37,5	75	ND	>100	>25	2	12,5
404	1654	12,5	ND	ND	ND	ND	>100	>100	ND	ND	37,5	37,5	37,5	ND	>100	>25	2	12,5
414	1654	3,1	6,3	6,3	6,3	6,3	>100	>100	ND	ND	>75	37,5	37,5	ND	>100	>25	4	>25
415	1585	3,1	6,3	3,1	6,3	6,3	>100	>100	ND	ND	37,5	37,5	75	ND	>100	>25	4	>25
<b>Peptidbibliothek Pentamer, Nonamer, Undekamer, Dodekamer<sup>l</sup></b>																		
418	835	100	ND	ND	ND	ND	12,5	25	>306	>306	ND	ND	ND	ND	16,8	>200	10 <sup>m</sup>	ND
419	1443	44	ND	ND	ND	ND	22,2	22,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25	1 <sup>m</sup>	159
420	1477	5	ND	ND	ND	ND	10,8	10,8	ND	ND	>125	ND	ND	ND	ND	25	2 <sup>m</sup>	153
421	1658	ND	ND	ND	ND	ND	6,3	25	ND	ND	>125	ND	ND	ND	ND	>200	3 <sup>m</sup>	12,5
422	1833	25	25	100	25	25	>100	>100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>100	ND	ND	ND
423	1730	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>100	ND	ND	ND
424	1819	1	ND	ND	ND	ND	3,1	12,5	17,6	17,6	>125	ND	ND	ND	8,1	100	31	5

<sup>a</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in; <sup>b</sup> MW, Molekulargewicht; <sup>c</sup> MHK<sub>50</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006); <sup>d</sup> ND, Nicht determiniert; <sup>e</sup> HD<sub>50</sub>, hämolytische Dosis bei 50%; <sup>f</sup> SR, Selektiver Ratio (HD<sub>50</sub>/MIC<sub>50</sub> S. aureus ATCC 29737); <sup>g</sup> LD<sub>50</sub>, zytotoxische Dosis bei 50%; <sup>h</sup> Struktur in Tabelle 1, <sup>i</sup> Struktur in Tabelle 2, <sup>j</sup> Struktur in Tabelle 3, <sup>k</sup> Struktur in Tabelle 4; <sup>l</sup> SR, Selektiver Ratio (HD<sub>50</sub>/MIC<sub>50</sub> E. coli ATCC35218)

### 3. Zusammenfassende Diskussion und Schlussfolgerung

Von 424 getesteten Peptoiden waren 18 Peptide stark antimikrobiell aktiv gegen *S. aureus* ATCC 29737 (MHK<sub>90</sub> ≤ 6,3 μM). Die antimikrobiell aktiven Peptide gegen das gram-positive Bakterium *S. aureus* ATCC 29737 sind in Tabelle 18 zusammengestellt.

**Tabelle 18:** Peptoidnummer, Molekulargewicht, Farbcode und MHK<sub>90</sub>-Werte der antimikrobiell aktiven Peptide gegen *S. aureus* ATCC 29737.

Nr.	MW <sup>a</sup>	Farbcode	MHK <sub>90</sub> <sup>b</sup>
			<i>S. aureus</i> ATCC 29737
			[μM]
<b>Peptoidbibliothek 1<sup>c</sup></b>			
54	1046		6,3
72	1046		6,3
198	1046		6,3
200	1012		6,3
<b>Peptoidbibliothek 2<sup>c</sup></b>			
293	1067		1,6
297	1103		1,6
321	1083		1,6/0,8
322	1081		6,3/3,1
324	1101		1,6
332	1081		1,6/0,8
<b>Peptoidbibliothek 3<sup>c</sup></b>			
360	1088		3,1
361	1101		3,1
374	1081		1,6
378	951		1,6
<b>Peptoidbibliothek Oktamere<sup>c</sup></b>			
414	1654		3,1
415	1585		3,1
<b>Peptoidbibliothek Pentamer, Nonamere, Undekamere, Dodekamere<sup>c</sup></b>			
420	1477		5
424	1819		1
		4	

<sup>a</sup>MW, Molekulargewicht.

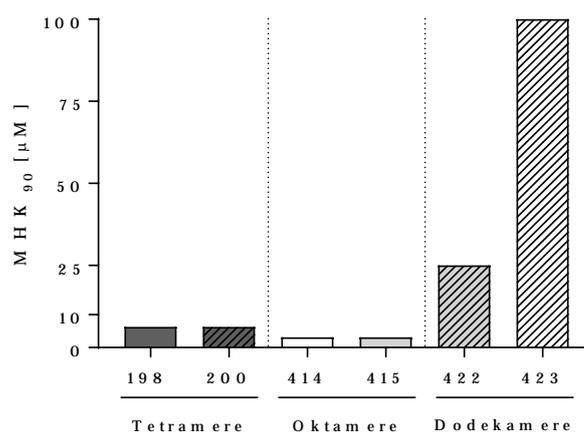
<sup>b</sup>MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

<sup>c</sup>Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 25.

### 3. Zusammenfassende Diskussion und Schlussfolgerung

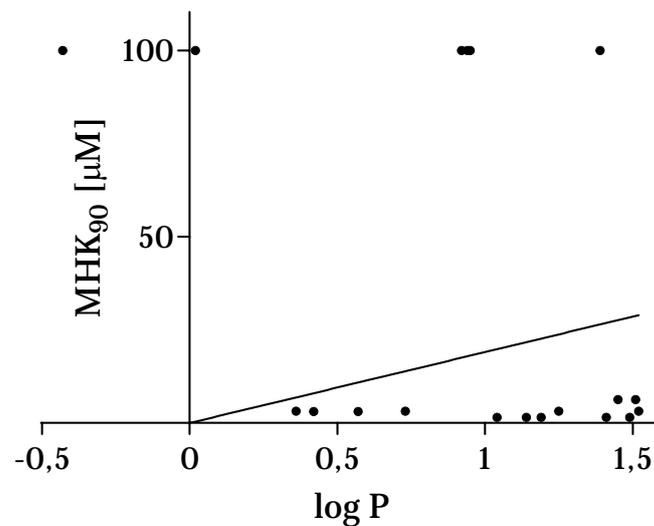
---

Dabei konnte bei den Peptoiden 198 und 200 einen Trend in der Peptoidlänge festgestellt werden. Wurde die Peptoidlänge auf eine oktamere Struktur verdoppelt, nimmt die antimikrobielle Aktivität um den Faktor 2 zu ( $MHK_{90} < 3,1 \mu M$ ). Wurden die antimikrobiell aktiven tetrameren Peptide allerdings in der Länge verdreifacht, nimmt die antimikrobielle Hemmung mindestens um den Faktor 8 ab ( $MHK_{90} \leq 25 \mu M$ ) (Abbildung 43). Des Weiteren zeigten auch andere antimikrobiell aktiven Peptide mit unterschiedlicher Peptoidkette keine klare Korrelation zwischen Länge der Peptoidkette und antimikrobieller Aktivität (Chongsiriwatana et al. 2008, Chongsiriwatana et al. 2011, Huang et al. 2012, Seo et al. 2012, Ghosh et al. 2014, Mojsoska und Jenssen 2015, Mojsoska et al. 2015, Saporito et al. 2019). Daher konnte durch die Länge der Peptoidkette kein Rückschluss auf die antimikrobielle Wirkung gezogen werden.



**Abbildung 43:** Vergleich der antimikrobiellen Aktivität von Tetrameren, Oktameren und Dodekameren gegen *S. aureus*.

Wurden die antimikrobiell aktiven Peptide in Korrelation mit ihren logP-Werten gesetzt, zeigte sich, dass tendenziell mit steigendem logP-Wert die Wahrscheinlichkeit der antimikrobiellen Hemmung gegen *S. aureus* zunehmen kann (Abbildung 44). Allerdings wurden auch Peptide mit hohen LogP-Werten mit keiner antimikrobiellen Wirkung ( $MHK_{90} \geq 100 \mu M$ ) identifiziert. Der Vergleich der antimikrobiellen Eigenschaft von Peptoiden und ihren LogP Werten zeigte ebenfalls keinen eindeutigen Zusammenhang (Yamamura et al. 2016).



**Abbildung 44:** Antimikrobiell aktive Peptide gegen *S. aureus* ATCC 29737 in Korrelation mit ihren LogP Werten. LogP-Werte sind im Appendix in Tabelle 26 zusammengefasst.

Lediglich 2 der 424 Peptide zeigten eine antimikrobielle Wirkung gegen *E. coli* und *P. aeruginosa* ( $MHK_{90} \leq 8,1 \mu M$ ). Dabei war ein klarer Trend in der antimikrobiellen Wirkung gegen Mykobakterien im Vergleich zu der Wirkung gegen gram-positive und gram-negative Bakterien zu erkennen. Zeigte ein Peptoid eine starke antimikrobielle Hemmung lediglich gegenüber dem gram-positiven Bakterium *S. aureus*, so ist das Peptoid auch gegen *M. bovis* aktiv (Peptide 54, 72, 198, 200, 293, 297, 321, 322, 332, 360, 361, 374, 378, 404 und 414). Hingegen sind Peptide, die nur gegen das gram-negative Bakterium *E. coli* aktiv sind, nicht gegen *M. bovis* aktiv. Dies könnte auf die strukturellen Unterschiede in der Membran der Bakterien zurückzuführen sein. Mykobakterien besitzen einen eher ähnlichen Membranaufbau wie gram-positive Erreger (siehe Kapitel 1.2) (Mukherjee et al. 2016, Mukherjee et al. 2017).

Die Untersuchung der Struktur der Peptide in Bezug auf die antimikrobielle Wirkung hat zu keiner eindeutigen Aussage geführt. Zwar zeigten Peptide mit einem hohen Anteil an *Npcb*, *Nphe*, *Npfb* und *Nprg* eine Tendenz für eine starke antimikrobielle Wirkung ( $MHK_{90} \geq 6,3 \mu M$ ), jedoch konnte keine eindeutige Korrelation der Struktur der Seitenkette und der antimikrobiellen Wirkung festgestellt werden. Peptide, die reich an der hydrophilen Seitenkette *Nlys* waren, waren nicht gegen gram-negative und gram-positive Bakterien aktiv. Jedoch ist hier keine pauschale Aussage für die antimikrobielle Aktivität von *Nlys* zu treffen, da in der Literatur antimikrobiell aktive Peptide mit Lysin beschrieben sind (Yang et al. 2014, Chongsiriwatana et al. 2017).

Des Weiteren wurde die Stimulierung des Zytokins TNF- $\alpha$  durch Peptide untersucht. TNF- $\alpha$  ist ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems und somit ein wichtiger Faktor in der Immunabwehr gegen Bakterien. Patienten, die mit Anti-TNF- $\alpha$  Medikamenten, wie Infliximab, einem Arzneimittel gegen u. a. rheumatische Erkrankungen behandelt werden, sind besonders anfällig für schwerwiegende bakterielle und virale Infektionen (Salliot et al. 2007). Die Rolle von TNF- $\alpha$  in der menschlichen Immunantwort bei TB-infizierten Menschen ist bis heute unklar (Keane et al. 2001). Eine Hypothese ist, dass TNF- $\alpha$  für einige Erscheinungsformen tuberkulöser Erkrankungen verantwortlich sein könnte. Aufgrund dessen ist es von Bedeutung, ob ein antimikrobiell aktives Peptid zusätzlich TNF- $\alpha$  stimulieren kann. Dabei ist jedoch eine zu starke Stimulierung kontraindikal, da dies einen tödlichen septischen Schock durch die Stimulation von CD4 (Yeung et al. 1996) und dem *toll like* Rezeptor 4 (Cristofaro und Opal 2003), begünstigen kann (Mira et al. 1999, Polat et al. 2017). Bei Patienten mit einem septischen Schock liegen die TNF- $\alpha$  Werte zwischen 100-5000 pg/ml (Damas et al. 1989). Bei dem Peptid 198 und bei den AMPs Polymyxin B, Colistin und Protegrin konnte eine TNF- $\alpha$  Stimulierung von  $>150$  pg/ml festgestellt werden. Um einen möglichen septischen Schock im Organismus auszuschließen, müssen hier weitere *in vivo* Studien durchgeführt werden. Die Peptide 293 und 374 zeigten eine TNF- $\alpha$  Stimulierung zwischen 60-80 pg/ml und zeigten damit geeignete Bedingungen für eine TNF- $\alpha$  Stimulierung im Organismus, da diese Werte unter den TNF- $\alpha$  Werten liegen, die im Blut bei Patienten mit einem septischen Schock festgestellt wurden. Die Peptide 200, 403, 404, 414 und 414 zeigten hingegen keine TNF- $\alpha$  Stimulierung.

Die Untersuchung der Wirkweise durch Durchflusszytometrie und *soft* X-ray Tomographie zeigte bei den Peptiden 198, 200, 374, 378 und 424 eine Membrandeformation, beziehungsweise eine Membranpermeabilisierung, und eine

DNA-Delokalisation in den Bakterien. Bei den Peptoiden 418 und 419 wurde die Membran jedoch nicht deformiert. Daher ist davon auszugehen, dass Peptoide nicht nur über einen einzigen Wirkmechanismus verfügen. Im Gegensatz zu vielen klinisch angewendeten Antibiotika, die meist nur einen bestimmten Angriffspunkt besitzen, beinhalten die meisten AMP-Mechanismen keine stereospezifischen Wechselwirkungen mit Rezeptoren oder Enzymen, da Enantiomerenversionen typischerweise Aktivitäten aufweisen, die mit den nativen Peptiden kongruent sind (Bessalle et al. 1990, Chongsiriwatana et al. 2008). Folglich müssen die Wechselwirkungsmechanismen der AMP- und *Ampetoids* auf biophysikalischen Wechselwirkungen vom Typ "*pattern recognition*" beruhen, die, basierend auf der Kationizität und Amphiphilität der *Ampetoids*, durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt werden. In Anbetracht dieser Überlegungen darf sich ein vollständiges Paradigma des *Ampetoids*-Mechanismus nicht nur auf Membranwechselwirkungen konzentrieren, sondern es müssen auch intrazelluläre Effekte berücksichtigt werden. Die Fähigkeit der Peptoide, eindeutige Verformungen und damit strukturelle Veränderungen der Membran und der DNA zu verursachen, bedeutet, dass sie unweigerlich mit cytoplasmatischen Komponenten interagieren. Darüber hinaus ist das Ausmaß der verheerenden physikalischen Transformationen der Zellmembran und der intrazellulären Biomasseverteilung, die diese Wechselwirkungen der *Ampetoids* mit Bakterien verursacht, mitverantwortlich für die antimikrobielle Aktivität. Womöglich könnten *Ampetoids* mit hydrophoben Seitenketten eventuell die intrazelluläre Aggregation von Biomolekülen bewirken und dazu führen, dass intrabakterielle Polyanionen, die auch wesentliche aromatische hydrophobe Eigenschaften in den RNA- und DNA-Basen aufweisen, ausflocken. Dieses Phänomen, konnte bereits von Chongsiriwatana (Chongsiriwatana et al. 2017) beschrieben werden. Es gibt viele ubiquitär vorkommende Polyanionen, wie Aktinhomologe im bakteriellen Proteom (van den Ent et al. 2001, Jones et al. 2004). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieses Netzwerk von Polyanionen bei vielen zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle spielt (Jones et al. 2004). Durch diesen neuartigen Mechanismus wird das polyanionische Netzwerk durch *Ampetoids* und AMPs quervernetzt, und somit werden die räumliche Organisation, die freie Diffusion und die Zugänglichkeit von cytoplasmatischen Komponenten gleichzeitig gestört. In diesem Sinne zielen *Ampetoids* und AMPs weniger auf zytoplasmatische Spezies ab, als dass sie die räumliche Organisation des intrabakteriellen Kompartiments

unspezifisch stören. Hypothetisch könnten diese Veränderungen schädlich genug sind, um das Wachstum zu hemmen und in vielen Fällen Bakterien abzutöten.

Trotz der Bedeutung intrazellulärer Effekte für die Mechanismen von *Ampetoids*, AMPs und ihrer Mimetika muss betont werden, dass Studien zur Membranpermeabilisierung ein wesentlicher Bestandteil eines umfassenden Verständnisses dieser Moleküle bleiben. Forscher haben jedoch einen osmotischen Lyse-Mechanismus für AMPs ausgeschlossen (Henk et al. 1995, Pratt et al. 2005). Die Depolarisation der Membran an sich ist für die meisten Bakterien nicht tödlich, obwohl viele *Ampetoids* und AMPs eine maximale Depolarisation bei subinhibitorischen Konzentrationen verursachen, und die Wirkung vieler Atmungskoppler reversibel ist (Skulachev 1998, Wu et al. 1999, Friedrich et al. 2000, Zhang et al. 2000, Friedrich et al. 2001, Brogden 2005). Daraus folgt, dass Störungen der Lipidzusammensetzung und Porenbildung für die antibakteriellen Mechanismen vieler dieser Oligomere nur insoweit essentiell sind, als sie ihre Transmigration in das Cytoplasma erleichtern (Wu et al. 1999). In diesem Sinne sollten Membranwechselwirkungen und Interkalationen in die Membran nicht die Ursache der antimikrobiellen Eigenschaften der Peptoide sein, führen jedoch zur Destabilisierung und gegebenenfalls zur Porosität der Membran.

Neben Peptoiden, wurden auch glykosilierte Peptoidnanosheets auf ihre antimikrobielle Funktion untersucht. Dabei zeigte sich eine antimikrobielle Wirkung bei einer Zugabe von 20 µl glykosilierten Peptoidnanosheets. Durch die hohe Modifizierbarkeit der Peptoidnanosheets im Vergleich zu beispielsweise Graphenoxid Nanosheets (Krishnamoorthy et al. 2012) kann die antimikrobielle Eigenschaft weiter optimiert werden.

Abschließend weisen die identifizierten antimikrobiell aktiven Peptoide in dieser Arbeit eine geringe Toxizität in Säugerzellen, eine hohe Stabilität und niedrige Synthesekosten auf. All dies sind Eigenschaften, die zu ihrem hohen Potenzial als neue antimikrobielle Substanzen mit therapeutischen Anwendungen beitragen.

## 4. Material und Methoden

Alle wässrigen Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

### 4.1 Chemische Methodik

#### 4.1.1 Synthese von Peptoidbibliotheken

Die Peptoidbibliotheken wurden mittels Festphasensynthese mit Hilfe der Submonomermethode nach ZUCKERMANN (Zuckermann et al. 1992) synthetisiert. Dafür wurden zwei verschiedene Systeme benutzt: Zum einen die IRORI Technologie für die Synthese von große Bibliotheken (Kölmel et al. 2012) und zum anderen wurden Peptide mit Hilfe von PP Reaktoren mit einer PE Fritte synthetisiert, um hohe Ausbeuten zu erzielen. Beide Systeme nutzen die nukleophile Substitution zum Aufbau eines Monomers an die feste Phase.

#### Synthese von Peptoidbibliotheken mit Hilfe der IRORI Technologie

**Quellen und Entschützen.** Für die Synthese mit IRORI-Kans wurde 60 mg trockenes Rink-Amid Harz (AM resin LL 100-200 mesh, 0.61 mmol/g) in IRORI MiniKans in DMF über Nacht unter Schütteln gequollen. Anschließend wurden die IRORI-Kans 3 x 20 min mit DMF gewaschen. Die Entschützung des Harzes erfolgte durch 2 x 1 h Schütteln mit 20%-iger Piperidinlösung in DMF. Zwischen den Entschützungsschritten wurden die IRORI-Kans 3 x 20 min mit DMF unter Schütteln gewaschen.

**Acylierung.** 1,2 M Bromessigsäure (20,00 Äq.) wurde in 500 ml DMF mit DIC (20,00 Äq.) gegeben. Die IRORI-Kans wurde in diesem Gemisch für 2 h geschüttelt. Nach Ablauf der Reaktionsdauer wurden die IRORI-Kans 3 x 20 min mit DMF unter Schütteln gewaschen.

**Substitution.** Für die Monomerkupplung wurde eine 1 M Lösung der verschiedenen Submonomere in DMF hergestellt. Die IRORI-Kans wurden in dieser Lösung über Nacht inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die IRORI MiniKans 3 x 20 min mit DMF unter Schütteln gewaschen.

Die Schritte der Acylierung und Substitution wurden so lange wiederholt, bis die entsprechende Länge der Peptoidkette synthetisiert wurde.

**Rhodamin B Konjugation.** Die Peptide wurden mit dem Farbstoff Rhodamin B gekuppelt. Dazu wurde Rhodamin B (10 Äq.), DCC (20 Äq.) und HoBT (20 Äq.) in DMF gelöst und mit den IRORI-Kans über Nacht unter Schütteln inkubiert. Nach der

Inkubationszeit wurden die IRORI-Kans mit DMF gewaschen bis die Waschlösung klar blieb. Anschließend wurden die IRORI-Kans 3-mal mit DCM gewaschen.

**Abspaltung.** Die Abspaltung der Peptoide vom Harz erfolgte durch Inkubation mit 95% TFA in DCM für 2 h. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die IRORI-Kans nochmals mit etwa 2 ml DCM abgespült. Die Trocknung der Peptoide erfolgte entweder durch die Verwendung eines Zentrifugal-Vakuumkonzentrators oder durch Einengen unter vermindertem Druck.

Alle Peptoide wurden durch MALDI-TOF MS analysiert und durch HPLC gereinigt.

#### **Synthese von Peptoidbibliotheken mit Hilfe von PP Reaktoren mit einer PE Fritte**

**Quellen und Entschützen.** Für die Synthese mit PP Reaktoren mit PE Fritte wurde das trockenes Rink-Amid Harz (AM resin LL 100-200 mesh, 0.61 mmol/g) in DMF (1 ml/50 mg Harz) 1 h unter Schütteln gequollen. Anschließend wurde das Harz 3 x 5 min mit je 1,5 ml 20%-iger Piperidinlösung in DMF unter Schütteln entschützt. Danach wurde das Lösungsmittel entfernt und das Harz wurde 5-mal mit DMF und 1-mal mit *peptide synthesis grade* DMF (*pDMF*) gewaschen.

**Acylierung.** 1,2 M Bromessigsäure (8,00 Äq.) wurde in *pDMF* und DIC (8,00 Äq.) gegeben, in den Reaktor mit Fritte und Kanüle aufgezogen und für 30 min bei RT geschüttelt. Direkt nach dem Aufziehen in den Reaktor wird das Gemisch leicht warm. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel entfernt und 3-mal mit DMF und 1-mal mit *pDMF* gewaschen.

**Substitution.** Für die Monomerkupplung wurde eine 1 M Lösung der verschiedenen Submonomere in *pDMF* hergestellt und zu dem trockenen, gequollenen Harz gegeben. Das Gemisch wurde 30 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Harz wurde 3-mal mit DMF und 1-mal mit *pDMF* gewaschen.

Die Schritte der Acylierung und Substitution wurden so lange wiederholt, bis die entsprechende Länge der Peptoidkette synthetisiert wurde.

**Rhodamin B Konjugation.** Die Peptoide wurden mit dem Farbstoff Rhodamin B gekuppelt. Dazu wurde Rhodamin B (3 Äq.), DCC (3 Äq.) und HOBt (3 Äq.) in 3 ml DMF gelöst und mit dem Harz im Reaktor mit Fritte über Nacht unter Schütteln bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Harz mit DMF gewaschen bis die Waschlösung klar blieb. Anschließend wurden das Harz 3-mal mit DCM gewaschen bis die Waschlösung farblos blieb.

**Abspaltung.** Die Abspaltung der Peptoide vom Harz erfolgte durch Inkubation mit 1 ml 95% TFA in DCM für 2 h. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden der Reaktor nochmals mit etwa 2 ml DCM durchgespült und die peptoidhaltige Lösung wurde aufgesammelt. Die Trocknung der Peptoide erfolgte entweder durch die Verwendung eines Zentrifugal-Vakuumkonzentrators oder durch Einengen unter vermindertem Druck.

Alle Peptoide wurden durch MALDI-TOF MS analysiert und durch HPLC gereinigt.

### 5.1.2 Synthese des Submonomers tert-Butyl(4-aminobutyl)carbammat

Die Synthese von tert-Butyl(4-aminobutyl)carbammat wurde wie nach SCHRÖDER (Schroder et al. 2007) synthetisiert und wie im Folgenden optimiert. Es wurden 62,3 g (70,0 ml, 707 mmol, 1,00 Äq.) 1,4-Diaminobutan in 400 ml THF gelöst. Anschließend wurde 23,1 g (106 mmol, 0,15 Äq.) Boc-Anhydrid in 220 ml THF gelöst und tropfenweise während 4 Stunden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h lang gerührt. Nach Einengen des Produkts mit Vakuum und Resuspension in 150 ml kaltem Wasser wurde die Suspension filtriert. Das wässrige Filtrat wurde 4 × 50 ml mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Schichten wurden mit 2 × 25 ml H<sub>2</sub>O und 40 ml Salzlösung gewaschen. Es wurde anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann im Vakuum konzentriert. Das Produkt war ein leicht gelbliches Öl.

### 5.1.3 High Pressure (Performance) Liquid Chromatography (HPLC)

Für die Reinigung der synthetisierten Peptoide wurde für die Peptoidbibliotheken 1, 2 und 3 und für alle Oktamere eine JASCO HPLC System LC-NETII/ADC Serie mit zwei PU-2087 Plus Pumpen, einem CO-2060 Plus Thermostat, einem MD-2010 Plus Dioden Array Detektor und einem CHF-122SC Fraktionssammler von ADVANTEC verwendet. Als stationäre Phase wurde eine präparative C18-Säule (*VDSpher C18-M-SE*, C18, 10 µm, 250 × 20 mm von VDS OPTILAB) mit einer maximalen Flussrate von 15 ml/min genutzt. Die Flussrate betrug 3,5 ml/min und ein linearer Gradient wurde zur Trennung verwendet: Eluent A: 95% H<sub>2</sub>O, 5% ACN, 0,1% TFA und Eluent B: 95% ACN, 5% H<sub>2</sub>O, 0,1% TFA. Die Mischung des Gradienten ist in Tabelle 19 zu ausgewählten Zeiten aufgelistet. Die Separation der Peptoide wurde bei λ=218 nm, 254 nm sowie 560 nm (Rhodamin B) gemessen.

## 4. Material und Methoden

---

**Tabelle 19** Zusammensetzung des Gradienten zu ausgewählten Zeitpunkten

Zeit/min	Eluent B/%
0	0
4	0
30	80
42	95
50	50
55	0

Für die Reinigung der synthetisierten Peptide wurde für die Peptidbibliotheken 2, 3 und für alle Dodekamere eine PURIFLASH® 4125 (INTERCHIM), ausgestattet mit der Software InterSoft V5.1.08 und einem UV Diodenarray-Detektor (200-600 nm), verwendet. Als stationäre Phase wurde eine präparative C18-Säule (VDSpher C18-M-SE, C18, 10 µm, 250 × 20 mm von VDS OPTILAB) mit einer Flussrate von 15 ml/min genutzt. Ein linearer Gradient der Laufmittelzusammensetzung wurde verwendet: Eluent A: 95% H<sub>2</sub>O, 5% ACN, 0,1% TFA und Eluent B: 100% ACN, 0,1% TFA. Die Mischung des Gradienten ist in Tabelle 20 zu ausgewählten Zeiten aufgelistet. Die Separation der Peptide wurde bei λ=218nm, 254 nm sowie 560 nm (Rhodamin B) gemessen.

**Tabelle 20:** Zusammensetzung des Gradienten zu ausgewählten Zeitpunkten.

Zeit/min	Eluent B/%
0	0
15	80
24	100
30	100
35	0

### 5.1.4 Massenspektrometrie

Die Peptide wurden mit einem MALDI TOF/TOF-Analysator 4800 Plus (Applied Biosystems, MDS SCIEX) mit einem Stickstofflaser gemessen. Als Matrix wurde α-Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA, 10 mg/ml) in Acetonitril/Wasser (1: 1) mit 0,1% TFA verwendet. Dabei wurden je 0,5 µl Peptid und 0,5 µl Matrix auf einer 384er

Bruker MALDI-Zielplatte vermischt und trocknen gelassen. Molekülfragmente wurden als Masse-Ladungs-Verhältnis [m/z] angegeben.

### 5.1.5 Octanol-Wasser Koeffizient

In ein Eppendorfgefäß wurden 250 µl einer Peptoidlösung mit einer Endkonzentration von 160 µM in Wasser mit 250 µl Octanol vermischt und anschließend 2 min lang gevortext. Das Gemisch wurde danach bei 1000 g für 3 min zentrifugiert um die Phasen zu trennen. Die Phasen wurden getrennt und je 200 µl auf eine 96-Well Platte überführt. Die Extinktion wurde bei 550 nm und die Emission wurde bei 567 nm mit einem Plattenmessgerät gemessen (Ultra Microplate Reader ELx808, BioTEK Instruments, INC). Jede Absorption wurde dreimal gemessen. Die Daten wurden gemittelt und die Standardabweichung wurde berechnet. Der molaren Extinktionskoeffizienten von Rhodamin B in Wasser und Octanol wurde durch Verdünnen von Rhodamin B in Octanol und Wasser auf eine Endkonzentration von 20 µM bei einer Extinktion 550 nm bestimmt.

## 4.2 Bakterielle Methodik

### Verwendete Bakterienstämme

*Escherichia coli* ATCC 35218

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Methicillin* resistenter *Staphylococcus aureus* (Stamm *S. aureus* A1 *mecA<sup>r</sup>* (klinisches MRSA-Isolat aus einem Patienten))

*Staphylococcus aureus* ATCC 29737

*Staphylococcus aureus* DM4299

*Staphylococcus aureus* DM0004583R

*Staphylococcus aureus* DM21455

*Staphylococcus aureus* DR09808R

*Mycobacterium bovis* BCG ATCC 35734

*Mycobacterium chelonae* ATCC 19539

*Mycobacterium abscessus* ATCC 1997

*Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950

*Klebsiella pneumoniae*  $\psi$ kp13 ( $\psi$ kp7 :: CBR),  $\psi$ kp14 ( $\psi$ kp7 :: FFluc),

$\psi$ kp11 ( $\psi$ kp6 :: CBR) und  $\psi$ kp12 ( $\psi$ kp6 :: FFluc)

### 4.2.1. Kultivierung von Bakterien

Die kryokonservierten Bakterien wurden 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend in einen neuen 20 ml Medium-Ansatz überführt. Die Suspension wurde über Nacht bei 37 °C und 15 rpm für *Mycobacterium* Stämme bzw. bei 220 rpm für alle anderen verwendeten Stämme geschüttelt. Für *Mycobacterium* Stämme wurden Middlebrook 7H9 Medium und eine T25 Zellkulturflasche verwendet. Alle anderen verwendeten Stämme wurden in LB-Medium in konische 50 ml Falcon™ Zentrifugenröhrchen kultiviert.

#### Verwendete Lösungen

##### 1x LB Medium

10 g	NaCl
10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt

Auffüllen auf 1 L mit dH<sub>2</sub>O  
Einstellen des pH auf 7.0 mit 5 N NaOH  
Autoklavieren bei 121°C für 10 Minuten

##### 1x Middlebrook 7H9 Medium

4,7 g Middlebrook 7H9 Broth Base (Sigma-Aldrich, M0178)  
Auffüllen auf 900 L mit ddH<sub>2</sub>O und 2 ml Glycerin  
Autoklavieren bei 121°C für 10 Minuten  
Herunterkühlen auf 45-50°C  
Hinzufügen von 100 ml ADC Enrichment Supplement (Sigma-Aldrich, M0553)  
unter sterilen Bedingungen  
Sorgfältig vermischen

### 4.2.2 Kultivierung von Hefepilzen

Die kryokonservierten Hefepilze *C. albicans* wurden 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend in einen neuen 20 ml TSB-Ansatz überführt. Die Suspension wurde über Nacht bei RT bei 220 rpm geschüttelt.

#### Verwendete Lösungen

##### 1x TSB-Medium

17 g	Trypton
------	---------

3 g	Soyton
5 g	NaCl
2.5 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2.5 g	Glucose
1 l	destilliertes Wasser
pH 7,3 ± 0,2	

#### 4.2.3 Photometrische Analyse des Wachstumsverhaltens

Die Bakterienanzahl wurde photometrisch über die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Dazu wurden die behandelten 96-Well Platten mittels einem Biorad SmartSpec 3000 Photometers gemessen.

#### 4.2.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

##### MHK Bestimmung bei *S. aureus* und *E. coli*

Die MHK wurde in 96-Well Platten durchgeführt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe für jedes der insgesamt 424 Peptide erstellt. Es wurde eine 9-stufige Verdünnung mit MHB-Medium vorgenommen. Dabei wurden je nach Ausbeute des Peptoids entweder die Verdünnungen 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,3 µM, 3,125 µM, 1,625 µM und 0,78125 µM oder die Verdünnungen 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,3 µM, 3,125 µM, 1,625 µM, 0,78125 µM und 0,390625 µM hergestellt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 75 µl in je ein Well der 96-Well Platte gegeben. Die jeweilige Bakteriensuspension wurde bis zur mittleren log-Phase (OD<sub>600</sub> 0,4-0,6) kultiviert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf eine End-OD<sub>600</sub> von 0,07 verdünnt und auf die Wells verteilt. Als Negativkontrolle wurden die Bakterien mit 10%-EtOH, 20 µM Rhodamin B und nur mit MHB-Medium behandelt. Als Positivkontrolle wurde für *S. aureus* Vancomycin und für *E. coli* Streptomycin verwendet. Die behandelten 96-Well Platte wurden bei 37°C und 150 rpm 18 h lang geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte bei 600 nm mit einem Plattenlesemessgerät gemessen. Der MHK<sub>90</sub> Wert wurde definiert als die Konzentration, bei der 90% des Bakterienwachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle inhibiert wurde. Alle MHK-Bestimmungen wurden in Triplikaten und drei unabhängigen Versuchen angefertigt.

### Verwendete Lösungen

#### 1x MH-Medium

21 g	Müller Hinton Medium (Carl Roth, X927.1)
1 l	destilliertes Wasser

Autoklavieren bei 121°C für 10 Minuten

### **MHK Bestimmung bei *Mycobacterium* Stämmen**

Die verwendeten Peptide wurde wie oben beschrieben in einer 96-Well Platte verdünnt. Die *Mycobacterium* Stämme wurden bis zur mittleren log-Phase (OD<sub>600</sub> 0,4-0,6) kultiviert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf eine End-OD<sub>600</sub> von 0,05 verdünnt und auf die Wells verteilt. Als Negativkontrolle wurden die Bakterien jeweils mit 10%-EtOH und 20 µM Rhodamin B behandelt. Als Positivkontrolle wurde Rifampicin verwendet. Die behandelten 96-Well Platten mit *M. bovis* wurden 5 Tage und alle anderen *Mycobacterium* Stämme wurden 24<sup>h</sup> bei 37°C und 110 rpm geschüttelt. Die optische Dichte wurde bei 600 nm mit einem Plattenlesemessgerät gemessen. Der MHK<sub>90</sub> Wert wurde definiert als die Konzentration, bei der 90% des Bakterienwachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle inhibiert wurde. Alle MHK-Bestimmungen wurden in Triplikaten und drei unabhängigen Versuchen angefertigt.

### **MHK Bestimmung bei *Candida albicans***

Die verwendeten Peptide wurden wie oben beschrieben in einer 96-Well Platte verdünnt. Die Hefesuspension wurde bis zur mittleren log-Phase (OD<sub>600</sub> 0,4-0,6) kultiviert. Danach wurde die Hefesuspension auf eine End-OD<sub>600</sub> von 0,05 verdünnt und auf die Wells verteilt. Als Negativkontrolle wurden die Hefe jeweils mit 10%-EtOH und 20 µM Rhodamin B behandelt. Als Positivkontrolle wurde Fluconazol verwendet. Die behandelten 96-Well Platte 24<sup>h</sup> bei 37°C und 120 rpm geschüttelt. Die optische Dichte wurde bei 600 nm mit einem Tecan Infinite M200 PRO plate reader gemessen. Der MHK<sub>90</sub> Wert wurde definiert als die Konzentration, bei der 90% des Hefewachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle inhibiert wurde. Alle MHK-Bestimmungen wurden in Triplikaten und drei unabhängigen Versuchen angefertigt.

### **MHK und MBK Bestimmung bei *K. pneumoniae***

Es wurden die *K. pneumoniae*-Stämme NIH-1 ( $\psi$ kp7) und AR-0666 ( $\psi$ kp6) von Dr. Andrea C. Young (Centers for Disease and Prevention, USA) verwendet. Diese Stämme wurden mit den Plasmiden pJDC181 (hsp60 w/ click beetle red (CBR) und pJDC182 (hsp60 w/ firefly luciferase (FFluc)) transformiert, um eine Biolumineszenz der Stämme zu generieren. Transformierte Stämme sind:  $\psi$ kp13 ( $\psi$ kp7 :: CBR),  $\psi$ kp14 ( $\psi$ kp7 :: FFluc),  $\psi$ pk11 ( $\psi$ kp6 :: CBR) und  $\psi$ kp12 ( $\psi$ kp6 :: FFluc).

Für jeden Assay wurde eine Primärkultur von  $\psi$ kp12 oder  $\psi$ kp14 gestartet und über Nacht in MH-Medium bei 37° C schüttelnd gezüchtet. Eine Sekundärkultur wurde am nächsten Tag gestartet und 3 Stunden lang inkubiert bis sie eine optische Dichte von etwa 1,5 bis 2,5 erreichte. Diese Kulturen wurden dann in MH-Medium mit 0,001% Essigsäure und 0,02% BSA verdünnt, um eine berechnete OD von 0,001 zu ergeben. Dies entspricht etwa  $5 \times 10^5$  koloniebildenden Einheiten pro ml (CFU/ml). Unter Verwendung von 96-Well Platten (Corning inkorporiert, Polypropylen, nicht pyrogen, Katalognummer 3879) wurden 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension für jedes getestete Peptoid oder Antibiotikum in Triplikaten zugegeben. Jedes antimikrobielle Mittel wurde bei 11 verschiedenen Konzentrationen in zweifachen seriellen Verdünnungen getestet. Für jeden Assay wurden nicht mehr als 25% des antimikrobiellen Volumens als maximale Ausgangskonzentration verwendet. Die verwendete maximale Konzentration betrug 256  $\mu$ g/ml. Zu Beginn des Assays wurde die OD<sub>600</sub> jedes Wells unter Verwendung eines Plattenlesegeräts gemessen. Die Platten wurden dann 16 h bei 37°C in einen durch Feuchtigkeit kontrollierten Inkubator gestellt. Die OD<sub>600</sub> wurde nach 0, 1, 3, 4, 6 und 16 h gemessen. Dann wurden jeweils 50  $\mu$ l des Bakterien-Peptoid Gemischs für die Lumineszenzmessung auf eine weiße 96-Well-Platte übertragen. Diese wurden mit 50  $\mu$ l MH-Medium und 10  $\mu$ l Luciferin in Natriumcitratpuffer gemischt, um in jeder Vertiefung insgesamt 110  $\mu$ l zu ergeben. Dann wurde die Biolumineszenz mit einem Plattenlesegerät gemessen. Die Messungen der Biolumineszenz wurde nach 1 h Inkubationszeit mit Luciferin vorgenommen.

Zur Bestimmung des MBK wurden *K. pneumoniae*, die mit Peptoiden oder Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen in dreifacher Ausfertigung inkubiert wurden, in 96-Well-Platten überführt. Zehnfache Reihenverdünnungen dieser Kulturen wurden mit 1  $\times$  PBS hergestellt und zur Bestimmung ihrer CFU/ml nach 16 Stunden plattiert. Eine Kontrolle nur mit Bakterien wurde nach 16 Stunden ausplattiert, um das Wachstum der *K. pneumoniae*-Stämme  $\psi$ kp12 und  $\psi$ ec559 ohne jegliche Hemmung

zu bestimmen. Die prozentuale Überlebensrate wurde für jede Peptoid- oder Antibiotikakonzentration bestimmt, indem jede KBE/ml mit der Kontroll-CFU/ml (ohne antimikrobielle Mittel) nach 16 Stunden verglichen wurde. Die MHK- und MBK<sub>99</sub>-Werte wurden relativ zu den Ausgangs-CFU/ml berechnet. MHK wurde als die minimale Konzentration des Peptoids definiert, die erforderlich ist, um das Wachstum der Ausgangskultur von Bakterien zu hemmen ( $\leq 100\%$ ). MBK<sub>99</sub> wurde als die minimale Konzentration des Peptoids definiert, die erforderlich ist, um 99% der Startkultur abzutöten ( $\leq 1\%$ ).

### Verwendete Lösungen

0,1 M Natriumcitratpuffer

#### **4.2.5 Bestimmung der bakteriziden Wirkung**

Für die minimale bakterizide Konzentration (MBK) wurde die jeweilige Bakteriensuspension mit verschiedene Peptoidkonzentrationen für 24 h behandelt. Danach wurden diese zur CFU-Bestimmung auf eine MH-Agarplatte ausplattiert. Nach weiteren 24 h wurden die gebildeten Kolonien gezählt. Der MBK-Wert ist die niedrigste Peptoidkonzentration, bei der 99,9% des Startinokulums getötet wurde. Alle MBK-Bestimmungen wurden in Duplikaten und drei unabhängigen Versuchen angefertigt.

### Verwendete Lösungen

MH-Agarplatte

21 g Müller Hinton Medium (Carl Roth, X927.1)

15 g Agar

1 l destilliertes Wasser

Autoklavieren bei 121°C für 10 Minuten

#### **4.2.6 Zeitliche Bestimmung der bakteriziden Wirkung**

Die zeitliche Bestimmung der bakteriziden Wirkung wurde unter Verwendung ausgewählter Zeitpunkte in unterschiedlichen MBK-Werten definiert. Hierzu wurde die Bakteriensuspension mit verschiedene Peptoidkonzentrationen für die entsprechend ausgewählten Zeitpunkte behandelt. Danach wurden diese zur CFU-Bestimmung auf eine MH-Agarplatte ausplattiert. Nach 24 h wurden die gebildeten Kolonien gezählt. Die zeitliche Bestimmung der bakteriziden Wirkung ist

die niedrigste Zeitangabe, bei der 99,9% der des Startinokulums getötet wurde. Alle zeitlichen Bestimmungen der bakteriziden Wirkung wurden in Duplikaten und drei unabhängigen Versuchen angefertigt.

#### 4.2.7 Synergistischer Effekt antimikrobieller Wirkstoffe

Für die Bestimmung des synergistischen Effekts wurde das jeweilige Peptoid und das Antibiotikum nach dem System eines Schachbretts auf eine 96-well Platte verteilt. Die  $MHK_{90}$  Bestimmung erfolgte dann wie in Kapitel 5.2.4 beschrieben. Für die Auswertung wurden folgende Formeln angewendet:

$$FIC (a) = \frac{MHK_{90} \text{ Peptoid Kombination}}{MHK_{90} \text{ Peptoid alleine}}$$

$$FIC (b) = \frac{MHK_{90} \text{ Antibiotikum Kombination}}{MHK_{90} \text{ Antibiotikum alleine}}$$

$$FICI = FIC (a) + FIC (b)$$

Ein synergistischer, additiver und antagonistischer Effekt wurde wie in Tabelle 21 beschrieben bestimmt.

**Tabelle 21:** Definition der synergistischen, additiven und antagonistischen Wirkweise zweier Wirkstoffe anhand der Bestimmung der Determinante FICI.

	FICI
Synergie	$\leq 0,5$
Additiv	0,6-1,9
Antagonie	$\geq 2$

### 4.3 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Die Arbeiten mit den Zellkulturlinien, HeLa, HEK 293 T und RAW 264.7 erfolgten steril unter einer Laminar-Flow Sterilbank. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle verwendeten Lösungen wurden vor der Verwendung im Wasserbad auf 37°C temperiert.

## 4. Material und Methoden

---

### Verwendete Puffer und Lösungen

DMEM (Dulbeco's modified Eagle's medium, high glucose, Sigma Aldrich)

mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, PAA) und 1 U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco®, Life Technologies™)

Trypsin-Lösung

0,25% Trypsin-EDTA Lösung

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4 (Sigma Aldrich)

Einfriermedium

50% FKS, 40% DMEM, 10% DMSO

### Verwendete permanente Zellkulturlinie

HeLa

humane Gebärmutterhalskarzinomzellen

ATCC® CCL-2™

Kultivierung in DMEM mit 10% FKS

Verdoppelungszeit ca. 24 h

HEPG2

humane embryonale Leberkrebsepithelzellen

ATCC® HB-8065™

Kultivierung in DMEM mit 10% FKS

Verdoppelungszeit ca. 24 h

RAW 264.7

Abelson murine Leukämievirus (Ab-MuLV) infizierte  
Mausmakrophagen

ATCC® TIB-71®

Kultivierung in DMEM mit 10% FKS

Verdoppelungszeit ca. 24 h

### **4.3.1 Passagieren der Zellen**

Bei einer Konfluenz zwischen 60% und 70% wurden die Zellen passagiert. Nach der lichtmikroskopischen Betrachtung der Zellen wurde das alte Medium abgesaugt und mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit 1 ml Trypsin-Lösung benetzt und für 5-7 min bei 37°C im Brutschrank belassen. Die abgelösten Zellen wurden mit 9 ml frischen DMEM aufgenommen und suspendiert. Die Zellzahl wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer Improved,

0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm<sup>2</sup>, Kammerfaktor 10<sup>4</sup>) bestimmt. Geeignete Aliquote der Zellsuspension wurde in einer neuen Zellkulturschale nach Bedarf ausgestreut. Um optimale Bedingungen für das Wachstum der Zellen zu gewähren wurde in regelmäßigen Abständen ein Medienwechsel durchgeführt.

### **4.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Für die Kryokonservierung der Zellen wurde eine entsprechende Menge der Zellsuspension bei Raumtemperatur und 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium aufgenommen und zu je 2 x 10<sup>6</sup> Zellen in 1,5 ml Kryoröhrchen eingefroren. Die Aliquote wurden für 2 Tage im Biofreezer bei -80°C gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um neue Zellen in Kultur aufzunehmen, wurden die in flüssigem Stickstoff eingelagerten Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Danach wurde das Aliquot in eine Zellkulturschale mit frischem Medium überführt und im Brustschrank kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen passagiert.

### **4.4 Bestimmung der Zellzytotoxizität mittels MTS-Test**

MTS-Tests werden zur Bestimmung von Zellproliferation, Zellviabilität und Zytotoxizität verwendet. Lebende Zellen sind dabei in der Lage, den MTS Tetrazolium Farbstoff intrazellulär in den blauen Farbstoff Formazan zu reduzieren. Diese Umwandlung geschieht vermutlich durch NAD(P)H-abhängige Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen. Der von den lebensfähigen Zellen produzierte blaue Formazan-Farbstoff kann durch Messen der Absorption bei 490–500 nm quantifiziert werden.

Das MTS-Assay-Protokoll wurde durchgeführt, indem das MTS-Reagens direkt in das Zellkulturmedium gegeben wird, ohne die intermittierenden Schritte, die bei einem MTT-Assay erforderlich sind. Darüber hinaus erfordert dieser Hochdurchsatzassay im Gegensatz zum MTT-Assay keinen Wasch- oder Solubilisierungsschritt.

### Verwendete Puffer und Lösungen

MTS-Reagens (Promega CellTitre 96 Aqueous Nonradioactive Cell proliferation Assay)

DMEM

Trypsin

PBS

In eine T75 Zellkulturflasche wurden HepG2 Zellen bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und in frischem Medium wieder aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann bei 400 g für 3 min zentrifugiert und um die Zellen anschließend in frischem Medium resuspendiert. In einer 96-Well Platte wurden pro Well  $2 \times 10^4$  Zellen/100  $\mu\text{l}$  der resuspendierten Zellen ausgestreut und für 24 h bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank zum Anwachsen belassen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, ohne dabei die Zellschicht zu zerstören. Je 200  $\mu\text{l}$  der reihenverdünnten Peptide wurden auf die Wells verteilt. Für die Positivkontrolle wurde 1% Triton-x verwendet und als Negativkontrolle wurden Zellen unbehandelt belassen, sowie mit 10% EtOH behandelt. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt und 100  $\mu\text{l}$  frisches Medium, sowie 20  $\mu\text{l}$  MTS-Reagens zugegeben. Die 96-Well Platte wurde in Alufolie eingewickelt und für 3,5 h bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  zur Farbstoffentwicklung im Brutschrank inkubiert. Die Intensität des Formazans wurde photometrisch bei 490 nm in einem Plattenlesegerät (Infinite M200 PRO plate reader, Tecan) bestimmt. Die Zellzytotoxizität wurde unter Verwendung folgender Formel charakterisiert:

$$\%Zellzytotoxizität \equiv \frac{I_{\text{Experiment}} - I_{\text{Positivkontrolle}}}{I_{\text{Negativkontrolle}} - I_{\text{Positivkontrolle}}} \times 100$$

*I=Intensität*

Der LD<sub>50</sub>-Wert wurde als die Konzentration definiert, bei der 50% Reduktion des Signals im Vergleich zur Negativkontrolle stattfand.

### **4.5 Hämolytische Aktivität**

Für die Evaluierung der hämolytischen Aktivität wurde frisches humanes Blut (NUS, Spender Unbekannt) in EDTA-Röhrchen gesammelt und anschließend bei 1000 g für

10 min zentrifugiert. Dabei muss die Stärke der Beschleunigung und die Stärke der Abbremsung der Zentrifuge bei jedem Zentrifugationsschritt stets auf ein Minimum heruntergestellt werden. Das entstandene rote Blutkörperchen enthaltende Pellet wurde 4-mal mit dem 5- bis 10-fachen Volumen an PBS gewaschen. Anschließend wurde bei 1000g für 10 min zentrifugiert und mit 3-4 ml PBS resuspendiert. Die aufbereiteten roten Blutkörperchen sind bis zu 3 Wochen haltbar.

In eine 96-Well Platte wurden je 200 µl der reihenverdünnten Peptide überführt und 10<sup>6</sup> rote Blutkörperchen pro Well hinzugegeben. Für die Positivkontrolle wurde 1% Triton-x verwendet und als Negativkontrolle wurden Zellen unbehandelt belassen, sowie mit 10% EtOH behandelt. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die 96-Well Platte bei 1000 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl des Überstandes auf eine neue 96-Well Platte übertragen. Der Überstand wurde gut vermischt um eine gute Homogenisierung zu erreichen. Die Absorption wurde bei 540 nm in einem Plattenlesegerät (Infinite M200 PRO plate reader, Tecan) bestimmt. Der Hämolyse Assay wurde mit Blut von verschiedenen Spendern durchgeführt. Die hämolytische Aktivität wurde unter Verwendung folgender Formel charakterisiert:

$$\%Hämolyse \equiv \frac{A_{540Peptoid} - A_{540Blank}}{A_{540Triton\ x-100} - A_{540Blank}} \times 100$$

*A*=Absorption bei 540 nm

Der HD<sub>50</sub>-Wert wurde als die Konzentration definiert, bei der 50% Reduktion des Signals im Vergleich zur Negativkontrolle stattfand.

#### **4.6 Membranpermeabilitätsuntersuchung mittels Durchflusszytometrie**

Die *S. aureus* Bakterienkultur in der mittleren log-Phase wurde in frischem MH-Medium verdünnt, um eine OD<sub>600</sub> von 0,15 zu erreichen. Es wurde dann zweimal mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert. Die Suspension wurde mit 1 × MHK der ausgewählten Peptide und 50 nM SYTOX Green für 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Das Inkubationsgemisch wurde zweimal in PBS gewaschen und im gleichen Volumen PBS resuspendiert. Die Durchflusszytometrie wurde anschließend durchgeführt und die Daten wurden mit dem CytoFLEX LX-Durchflusszytometer und CytExpert

(Beckman Coulter, Brea, CA) analysiert. Die Bakteriensuspension wurde auch mit 35% Ethanol und 50 nM SYTOX Green 1 Stunde bei 37 ° C als positive Kontrolle inkubiert. Kontrollen von ungefärbten Zellen und Peptoidbehandlung in Abwesenheit von SYTOX Green wurden ebenfalls analysiert, um Hintergrundgeräusche zu berücksichtigen.

### **4.7 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie**

Es wurden  $2 \times 10^4$  RAW 264.7 Zellen in einem Volumen von 200  $\mu$ l pro Well in einem 8-Well Chamber Slide ( $\mu$  Slide 8 Well ibiTreat, ibidi) ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit 10  $\mu$ M Peptoiden behandelt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Zellen für 15 min mit MitoTracker® Green FM (Endkonzentration: 125 nM) gefärbt. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Hoechst 33342 (2  $\mu$ g/ml) behandelt.

Für die simultane Visualisierung der Mitochondrien und der Zellkerne mit den Peptoiden wurde das inverse Mikroskop (Leica SP5, DMI6000) mit der Leica Application Suite (LAS-AF) Software und dem HCX PL APO CS 63.0x1.20 WATER UV Objektiv verwendet. Dabei wurde der MitoTracker® Green FM mit einem Argon Ionen Laser (30%), Hoechst 33342 bei 364 nm mit einem UV Laser und das Rhodamin B, welches an die Peptoide gekuppelt wurde, bei 561 nm mit einem DPSS Laser angeregt. Die Emission der Fluoreszenz wurde bei 499-522 nm für MitoTracker® Green FM, 417-468 nm für Hoechst 33342 und bei 593-696 nm für die Peptoide gemessen. Alle Bilder wurden bei einer Auflösung von 1024x1024 Pixeln, 8 Bit Farbtiefe und einer Scannergeschwindigkeit von 200 Hz aufgenommen.

### **4.8 TNF-alpha ELISA Assay**

Für den TNF-alpha ELISA Test wurden Nunc™ MaxiSorp™ 96-Well Platten mit je 100  $\mu$ l Capture Antikörper pro Well beschichtet. Die Platten wurden versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten 3-mal mit mindestens 250  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Waschpuffer jeweils mindestens 1 min lang einwirken konnte, um die Effektivität des Waschens zu erhöhen. Anschließend wurden die Platten mit je 200  $\mu$ l ELISASPOT Diluent für 1 h und bei RT geblockt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde nochmals

mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden je 100 µl der reihenverdünnten ausgewählten Peptide auf die Wells verteilt und die Platte wurde versiegelt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2 h bei RT wurde die Platte 5-mal mit >250 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden je 100 µl Detection Antikörper auf die Wells verteilt. Die Platte wurde versiegelt und 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte 5-mal mit >250 µl Waschpuffer gewaschen. Es wurden 100 µl pro Well Avidin-HRP hinzugegeben, die Platte wurde versiegelt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl TMB-Substrat Solution pro Well 1x hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Stop Solution pro Well verteilt. Die Absorption wurde bei 450 nm in einem Plattenlesegerät (Infinite M200 PRO plate reader, Tecan) bestimmt. Für die Bestimmung der Standardkurve wurden die Schritte des Invitrogen Protokolls befolgt.

### Verwendete Puffer und Lösungen

Capture Antikörper (Anti-Maus TNF alpha Antikörper, 250X, 1:1250 in Coating Puffer, Invitrogen)

Detection Antikörper (biotinkonjugierter Anti-Maus TNF alpha Antikörper, 250X, 1:1250 in ELISASPOT Diluent, Invitrogen)

Coating Puffer (Invitrogen)

ELISASPOT Diluent (Invitrogen)

TMB-Substrat Solution (Invitrogen)

Avidin-HRP Konzentrat (250X, 1:1250 in ELISASPOT Diluent, Invitrogen)

Waschpuffer

1x            PBS

0,05%       Tween 20

Stop Solution

1N            H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## **4.9 Mannosebeschichtete Peptoid-Nanosheets**

### **4.9.1 Bindung der Bakterien an Peptoid-Nanosheets**

Übernachtskulturen der Stämme *E. coli* ORN 178 und *E. coli* ORN 208 wurden in LB-Medium bei 37°C und statischer Lagerung hergestellt. Am nächsten Tag wurden die Bakteriensuspensionen bei 3200g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in M1-Medium auf eine OD 0,2 resuspendiert. Anschließend wurden 15 µl der

#### 4. Material und Methoden

---

jeweiligen Bakteriensuspension und je 5 µl Nanosheet in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 37°C bei 180 rpm für 30 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die erfolgreiche Bindung der mannosebeschichteten B28 Nanosheets mittels konfokaler Mikroskopie überprüft.

Bei der Verwendung des Bakterienstamms *E. coli* ATCC 33456 ORN 178 wurde stets Tetracyclin hinzugegeben und bei der Verwendung des Bakterienstamms *E. coli* ATCC 33456 ORN 208 wurden stets Tetracyclin und Kanamycin hinzugegeben.

##### Verwendete Puffer und Lösungen

Nanosheet B28 (Mannosebeschichtet, LBNL, Berkeley, CA)

Nanosheet B36 (Kontrolle, keine Mannose, LBNL, Berkeley, CA)

**M1-Medium**

50 mM	PIPES
7,5 mM	NaOH
28 mM	NH <sub>4</sub> CL
1,3 mM	KCl
4,3 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
100 mM	NaCl

Einstellen des pH auf 7.0 mit 5 N NaOH

Autoklavieren bei 121°C für 10 Minuten, danach folgende Substanzen hinzufügen:

10 ml/l	Vitamin Stock 100x
10 ml/l	Mineral Stock 100x
10 ml/l	Aminosäuren Stock 100x

**Vitamin Stock 100x**

2 mg	D-Biotin (B7)
2 mg	Folsäure (B9)
10 mg	Pyridoxin HCl (B6)
5 mg	Thiamin HCl (B1)
5 mg	Nicotinsäure (B3)
5 mg	D-Pantothersäure (B5)
0,1 mg	Cobalamin (B12)
5 mg	<i>p</i> -Aminobenzoensäure
5 mg	$\alpha$ -Liponsäure

Auffüllen auf 1 L mit ddH<sub>2</sub>O

Sterilfiltrieren und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahren

**Mineral Stock 100x**

7,85 mM	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>6</sub> Na <sub>3</sub> (Na-NTA)
12,17 mM	MgSO <sub>4</sub>
2,96 mM	MnSO <sub>4</sub>
17,11 mM	NaCl
0,36 mM	FeSO <sub>4</sub>
0,68 mM	CaCl <sub>2</sub>
0,42 mM	CoCl <sub>2</sub> ·

## 4. Material und Methoden

---

0,95 mM	ZnCl <sub>2</sub>
0,040 mM	CuSO <sub>4</sub>
0,021 mM	AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
0,016 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0,010 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
0,010 mM	NiCl <sub>2</sub>
0,076 mM	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>

Einstellen des pH auf 7.0 mit 5 N NaOH  
Sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren

### Aminosäuren Stock 100x

2 g	L-Glutaminsäure
2 g	L-Arginin
2 g	D,L-Serin

Auffüllen auf 1 L mit ddH<sub>2</sub>O  
Einstellen des pH auf 7.0 mit 5 N NaOH  
Sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren

### Verwendete Bakterienstämme

*E. coli* ATCC 33456 ORN 178 (tetR)

*E. coli* ATCC 33456 ORN 208 (tetR, kanR)

### **4.9.2 Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit der an die Nanosheets gebundenen Bakterien**

Für die Bindung der Bakterien an die Nanosheets wurden drei Ansätze mit jeweils 5 µl, 10 µl und 20 µl Nanosheet für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakteriensuspensionen mittels einer Reihenverdünnung auf LB-Agarplatten ausplattiert. Bei der Ausplattierung des Bakterienstamms *E. coli* ATCC 33456 ORN 178 wurde auf die Agarplatten Tetracyclin verstrichen und bei der Verwendung des Bakterienstamms *E. coli* ATCC 33456 ORN 208 wurden auf die Agarplatten Tetracyclin und Kanamycin verstrichen. Die Agarplatten wurden bei 37°C für 24 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden Kolonien gezählt. Die Ansätze wurden in Duplikaten und in zweifacher Ausfertigung angesetzt.

Verwendete Lösungen

1x LB Agar

10 g	NaCl
10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
15 g	Agar

Auffüllen auf 1 L mit dH<sub>2</sub>O

Einstellen des pH auf 7.0 mit 5 N NaOH

Autoklavieren bei 121°C für 10 Minuten

**4.10 Soft X-ray Tomographie**

Eine *E. coli* Übernachtskultur in LB-Medium wurde am nächsten Tag bis zu  $OD \approx 0,4$  kultiviert. Anschließend wurden in einer 48-Well Platte je 500  $\mu$ l der ausgewählten MHK-Konzentrationen der Peptide und 500  $\mu$ l der Bakteriensuspension für 4h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben bei 1000g für 5 min zentrifugiert und 5-mal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in möglichst wenig PBS (6-20  $\mu$ l, je nach Pelletgröße) gelöst. Für die X-ray Tomographie wurden pro Probe je 3 dünnwandige Glaskapillare angefertigt. In die Glaskapillare wurden je 2  $\mu$ l der Probe pipettiert und anschließend wurde mit einem Mikroskop das Vorhandensein der Bakterien in der Glaskapillare überprüft. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftbläschen in der Probe vorhanden sind. Die Glaskapillare wurde dann zügig in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die X-Ray Datensätze wurden mit einem XM-2 soft X-ray Mikroskop des National Center für X-Ray Tomographie (<http://ncxt.lbl.gov>) an der *Advanced Light Source* (<http://www.als.lbl.gov>) des Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL) gesammelt. XM-2 ist mit Fresnel-Zonenplatten basierenden Kondensor- und Objektivlinsen (hergestellt vom Centre for X-Ray Optics, LBNL) ausgestattet und wurde speziell für die Untersuchung biologischer Proben bei Tiefsttemperaturen entwickelt. Die Bilder wurden zu allen Zeiten in einer Atmosphäre aus mit flüssigem Stickstoff gekühltem Heliumgas aufgenommen. Für jeden Datensatz wurden 90 Projektionsbilder sequentiell um eine Drehachse in Schritten von 2° aufgenommen, um eine Gesamtdrehung von 180° zu erhalten. Das Mikroskop war mit einer Auflösung ausgestattet, die eine 50-nm-Objektivlinse definiert. Es wurde eine Belichtungszeit zwischen 150 und 300 ms verwendet (abhängig vom Synchrotron-Ringstrom).

### LAC Kalkulation und manuelle Segmentierung

Rekonstruierte Zellen wurden in Subvolumina mit ähnlichen LACs unterteilt. Der LAC für jedes Voxel wurde direkt aus den experimentellen Daten gemessen. Die Absorption *soft* X-Ray Röntgenstrahlen folgt dem Beer'schen Gesetz und ist daher konzentrations- und molekülartenabhängig. Im Fall von isolierten Biomolekülen kann der LAC experimentell gemessen oder einfach anhand der chemischen Zusammensetzung der Probe berechnet werden. Beispielsweise wurde berechnet, dass Eis einen LAC von  $0,109 \mu\text{M}^{-1}$  aufweist, wohingegen ein Modellprotein mit der chemischen Zusammensetzung  $\text{C}_{94}\text{H}_{139}\text{N}_{24}\text{O}_{31}\text{S}$  einen LAC von  $1,35 \mu\text{M}^{-1}$  aufweist (Weiss et al. 2000). Diese Begebenheit wird im Zusammenhang mit 50-nm-Voxeln bei der Rekonstruktion einer Zelle komplexer. In diesem Fall enthält jedes Voxel mit ziemlicher Sicherheit eine Mischung von Biomolekülen (Lipide, Proteine, Wasser usw.). Daher ist der LAC für eine segmentierte Organelle ein Maß für die gesamte biochemische Zusammensetzung. Die manuelle Segmentierung, die Messung von Voxelwerten zur Berechnung von LACs und die Erstellung von Filmen wurden mit dem Amira-Softwarepaket (*Mercury Computer Systems*) durchgeführt.

## 4.11 Geräte und Materialien

μ-Slide 8-Well, ibiTreat	ibidi®
1-Hydroxybenzotriazolehydrat	Sigma-Aldrich®
2-Butanol	Sigma-Aldrich®
400 MHz NMR Spectrometer	Bruker
4-Chlorobenzylamin	Sigma-Aldrich®
4-Fluorobenzylamin	Sigma-Aldrich®
4-Hydroxybenzylamin	Sigma-Aldrich®
96-Well Plattenlesegerät	SpectraMax ID3, Molecular Devices, USA
96-Well Plattenlesegerät	Ultra Microplate ELx808, BioTEK Instruments, INC
96-Well Plattenlesegerät	Tecan
Acetonitril	Fisher Scientific
Agar	Sigma-Aldrich®
Analytische Waage	VWR International
Ascorbic acid	Sigma-Aldrich®
Benzylamin	Sigma-Aldrich®
Boc-anhydrid	Sigma-Aldrich®
Bromessigsäure	Sigma-Aldrich®
Bromopropylamine hydrobromide	Sigma-Aldrich®
Butylamin	Sigma-Aldrich®
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich®
Clarithromycin	Sigma-Aldrich®
Diaminobutan	Sigma-Aldrich®
Dichlormethan	Carl Roth®
Diethylether	VWR International
Dimethylformamid	VWR International
Dimethylformamid, peptide grade	Abcr
Dimethylsulfoxid	Carl Roth®
DMEM	Gibco®
DPBS	Gibco®
EDTA-Röhrchen	VWR International
Einmal-Impfösen	VWR International
Einmal-Kanülen	Carl Roth®
Einmal-Spatel, Drigalski	VWR International
Einweg Spatel	VWR International
Ethanol 99,8%	VWR International
Ethylacetat	VWR International
Falcon Tubes 15 ml, 50 ml	CELLSTAR®, Greiner Bio-One
FCS	Gibco®
Glaskapillare, 1.9 x 100mm	Altmann Analytik

#### 4. Material und Methoden

---

Hefeextrakt	Sigma-Aldrich®
Hexylamin	Sigma-Aldrich®
Hoechst 33342	Invitrogen™
HPLC	GE Healthcare Life Science
HPLC	Puriflash, Interchim
Imipenem	Sigma-Aldrich®
Indolicidin	Sigma-Aldrich®
Inkubator	Binder
IRORI Mini+B2:B79Kans	IRORI®
IRORI radiofrequency tag	IRORI®
IRORI USB-Stick	IRORI®
Isoniazid	Sigma-Aldrich®
Kanamycin	Sigma-Aldrich®
Konfokalmikroskop	Leica SPE
LB-Medium, Miller	Carl Roth®
LL-37	AnaSpec
Magainin 2	AnaSpec
MALDI TOF/TOF	Applied Biosystems/MDS SCIEX
Melittin	AnaSpec
Meropenem	Sigma-Aldrich®
Messpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Brand GmbH
MH-Medium	Carl Roth®
Middlebrook 7H9 Medium	Sigma-Aldrich®
MitoTracker® Green	Thermo Scientific
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific
MTS	Promega
Multikanalpipette	Eppendorf
N,N'-Diisopropylcarbodiimid	Sigma-Aldrich®
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich®
Octanol	Sigma-Aldrich®
Parafilm® M	Sigma-Aldrich®
Penicillin-Streptomycin	Gibco®
Petrischale	CELLSTAR®, Greiner Bio-One
Piperidin	Carl Roth®
PIPES	Sigma-Aldrich®
Pipetten (0,5 µl-1000 µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen 0,1-10 µl	Corning® Life Science
Pipettenspitzen 100-1000 µl	Corning® Life Science
Pipettenspitzen 1-200 µl	Corning® Life Science
PP Reaktor mit PE Fritte 10 ml	MultiSynTech GmbH
PP Reaktor mit PE Fritte 20 ml	MultiSynTech GmbH
PP Reaktor mit PE Fritte 5 ml	MultiSynTech GmbH

Propargylamin	Sigma-Aldrich
Pyridin	VWR International
Rhodamine B	Sigma-Aldrich®
Rifampicin	Sigma-Aldrich®
Rink Amide AM resin LL	Novabiochem
Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf
Safe-Lock Tubes, 2,0 ml	Eppendorf
Soyton	Sigma-Aldrich®
SpeedVac	Eppendorf
Sterilbank	Clean Air
Sterilfilter, 0,2 µl	Whatmann® Schleicher&Schuell®
SYTOX® Green	Thermo Scientific
Tetracyclin	Sigma-Aldrich®
TNF alpha Human ELISA Kit	Invitrogen™
Tobramycin	Sigma-Aldrich®
Trifluoroacetic acid	Carl Roth®
Triton-X-100	Sigma-Aldrich®
Trypan blue	Sigma-Aldrich®
Trypsin-EDTA	Gibco®
Trypton	Sigma-Aldrich®
Tween 20	Sigma-Aldrich®
Vancomycin	Sigma-Aldrich®
Zellkulturflaschen	CELLSTAR®, Greiner Bio-One
Zellkultur Multiwellplatten	CELLSTAR®, Greiner Bio-one
Zentrifuge	Eppendorf, VWR International
α-Cyano-4-hydroxymethylsäure	Sigma-Aldrich®



## Literaturverzeichnis

---

- ALBY, K, BENNETT, R J (2009). Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 20, 3178-3191.
- ALTARAC, S, PAPES, D (2014). Use of D-mannose in prophylaxis of recurrent urinary tract infections (UTIs) in women. *BJU Int*, 113, 9-10.
- ARDUINO, S M, QUIROGA, M P, RAMÍREZ, M S, MERKIER, A K, ERRECALDE, L, DI MARTINO, A, SMAYEVSKY, J, KAUFMAN, S, CENTRÓN, D (2012). Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. *J Med Microbiol*, 61, 1417-1420.
- ARMAND, P, KIRSHENBAUM, K, FALICOV, A, DUNBRACK, R L, Jr, DILL, K A, ZUCKERMANN, R N, COHEN, F E (1997). Chiral N-substituted glycines can form stable helical conformations. *Fold Des*, 2, 369-375.
- ARNOLD, M S, DEMPSEY, J M, FISHMAN, M, MCAULEY, P J, TIBERT, C, VALLANDE, N C (2002). The best hospital practices for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: on the cutting edge. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 23, 69-76.
- ASTHANA, N, YADAV, S P, GHOSH, J K (2004). Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin: a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. *J Biol Chem*, 279, 55042-55050.
- AUERBACH, O (1944). Acute generalized miliary tuberculosis. *Am J Pathol*, 20, 121-136.
- BAEK, K T, GRUNDLING, A, MOGENSEN, R G, THOGERSEN, L, PETERSEN, A, PAULANDER, W, FREES, D (2014).  $\beta$ -Lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 is increased by inactivation of the ClpXP protease. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 4593-4603.
- BARCZAK, A K, AVRAHAM, R, SINGH, S, LUO, S S, ZHANG, W R, BRAY, M-A, HINMAN, A E, THOMPSON, M, NIETUPSKI, R M, GOLAS, A, MONTGOMERY, P, FITZGERALD, M, SMITH, R S, WHITE, D W, TISCHLER, A D, CARPENTER, A E, HUNG, D T (2017). Systematic, multiparametric analysis of *Mycobacterium tuberculosis* intracellular infection offers insight into coordinated virulence. *PLoS Pathogens*, 13, e1006363.
- BASSETTI, M, RIGHI, E, ANSALDI, F, MERELLI, M, CECILIA, T, DE PASCALE, G, DIAZ-MARTIN, A, LUZZATI, R, ROSIN, C, LAGUNES, L, TRECARICHI, E M, SANGUINETTI, M, POSTERARO, B, GARNACHO-MONTERO, J, SARTOR, A, RELLO, J, ROCCA, G D, ANTONELLI, M, TUMBARELLO, M (2014). A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. *Intens Care Med*, 40, 839-845.
- BATTIGELLI, A, KIM, J H, DEHIGASPITIYA, D C, PROULX, C, ROBERTSON, E J, MURRAY, D J, RAD, B, KIRSHENBAUM, K, ZUCKERMANN, R N (2018). Glycosylated peptoid nanosheets as a multivalent scaffold for protein recognition. *ACS Nano*, 12, 2455-2465.
- BECKER, K, VAN ALEN, S, IDELEVICH, E A, SCHLEIMER, N, SEGGEWISS, J, MELLMANN, A, KASPAR, U, PETERS, G (2018). Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, 24, 242-248.

- BENNETT, J W, CHUNG, K-T (2001). Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Adv Appl Microbiol*, 49, 163-184.
- BERKOW, E L, LOCKHART, S R (2017). Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect Drug Resist*, 10, 237-245.
- BESSALLE, R, KAPITKOVSKY, A, GOREA, A, SHALIT, I, FRIDKIN, M (1990). All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. *FEBS Lett*, 274, 151-155.
- BEVERIDGE, T J (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol*, 181, 4725-4733.
- BLAIR, J M A, WEBBER, M A, BAYLAY, A J, OGBOLU, D O, PIDDOCK, L J V (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 13, 42.
- BLASER, M J (2016). Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science*, 352, 544-545.
- BLOEMBERG, G V, KELLER, P M, STUCKI, D, TRAUNER, A, BORRELL, S, LATSHANG, T, COSCOLLA, M, ROTHE, T, HOMKE, R, RITTER, C, FELDMANN, J, SCHULTHESS, B, GAGNEUX, S, BOTTGER, E C (2015). Acquired resistance to bedaquiline and delamanid in therapy for tuberculosis. *N Engl J Med*, 373, 1986-1988.
- BLONDELLE, S E, HOUGHTEN, R A (1991). Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogues of melittin. *Biochemistry*, 30, 4671-4678.
- BONDUELLE, C, LECOMMANDOUX, S (2013). Synthetic glycopolypeptides as biomimetic analogues of natural glycoproteins. *Biomacromolecules*, 14, 2973-2983.
- BOUCKAERT, J, BERGLUND, J, SCHEMBRI, M, DE GENST, E, COOLS, L, WUHRER, M, HUNG, C S, PINKNER, J, SLATTEGARD, R, ZAVIALOV, A, CHOUDHURY, D, LANGERMANN, S, HULTGREN, S J, WYNS, L, KLEMM, P, OSCARSON, S, KNIGHT, S D, DE GREVE, H (2005). Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *Mol Microbiol*, 55, 441-455.
- BOUSSIOTIS, V A, NADLER, L M, STROMINGER, J L, GOLDFELD, A E (1994). Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7007-7011.
- BOWMAN, S M, FREE, S J (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28, 799-808.
- BRENNAN, P J (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 83, 91-97.
- BROGDEN, K A (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat Rev Microbiol*, 3, 238-250.
- BROWN, B A, WALLACE, R J, ONYI, G O, DE ROSAS, V, WALLACE, R J (1992). Activities of four macrolides, including clarithromycin, against *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, and *M. chelonae*-like organisms. *Antimicrob Agents Chemother*, 36, 180-184.

- BROWN, D F J, REYNOLDS, P E (1980). Intrinsic resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. FEBS Lett, 122, 275-278.
- BROWN, L, WOLF, J M, PRADOS-ROSALES, R, CASADEVALL, A (2015). Through the wall: extracellular vesicles in gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. Nat Rev Microbiol, 13, 620.
- BURTON, M F, STEEL, P G (2009). The chemistry and biology of LL-37. Nat Prod Rep, 26, 1572-1584.
- BUSH, K (2012). Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. Rev Sci Tech, 31, 43-56.
- CALDERONE, R A, CLANCY, C J (2012). Candida and candidiasis. Clin Microbiol Rev.
- CDC (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Centers for Disease Control and Prevention.
- ÇETIN, E T, ANG, Ö (1962). Staphylococci resistant to methicillin ("celbenin"). Brit Med J, 2, 51-52.
- CHAMBERS, H F (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?, Emerg Infect Dis, 7, 178-182.
- CHAMBERS, H F, DELEO, F R (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol, 7, 629-641.
- CHANDRA, J, KUHN, D M, MUKHERJEE, P K, HOYER, L L, MCCORMICK, T, GHANNOUM, M A (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol, 183, 5385-5394.
- CHANG, C-M, LEE, H-C, LEE, N-Y, LEE, I-W, WU, C-J, CHEN, P-L, LEE, C-C, KO, N-Y, KO, W-C (2008). Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* complicated skin and soft-tissue infections of extremities: emphasis on cirrhotic patients and gas formation. Infection, 36, 328.
- CHARLES, P E, DOISE, J M, QUENOT, J P, AUBE, H, DALLE, F, CHAVANET, P, MILESI, N, AHO, L S, PORTIER, H, BLETTERY, B (2003). Candidemia in critically ill patients: difference of outcome between medical and surgical patients. Intensive Care Med, 29, 2162-2169.
- CHATTERJEE, D (1997). The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. Curr Opin Chem Biol, 1, 579-588.
- CHATTERJEE, D, BOZIC, C M, MCNEIL, M, BRENNAN, P J (1991). Structural features of the arabinan component of the lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem, 266, 9652-9660.
- CHAVES, J, LADONA, M G, SEGURA, C, COIRA, A, REIG, R, AMPURDANES, C (2001). SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 45, 2856-2861.
- CHEN, L, KREISWIRTH, B N (2018). Convergence of carbapenem-resistance and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. Lancet Infect Dis, 18, 2-3.

- CHESNEAU, O, MORVAN, A, GRIMONT, F, LABISCHINSKI, H, EL SOLH, N (1993). *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. *Int J Syst Bacteriol*, 43, 237-244.
- CHO, H, UEHARA, T, BERNHARDT, Thomas G (2014). Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*, 159, 1300-1311.
- CHONGSIRIWATANA, N P, LIN, J S, KAPOOR, R, WETZLER, M, REA, J A C, DIDWANIA, M K, CONTAG, C H, BARRON, A E (2017). Intracellular biomass flocculation as a key mechanism of rapid bacterial killing by cationic, amphipathic antimicrobial peptides and peptoids. *Scientific Reports*, 7, 16718.
- CHONGSIRIWATANA, N P, PATCH, J A, CZYZEWSKI, A M, DOHM, M T, IVANKIN, A, GIDALEVITZ, D, ZUCKERMANN, R N, BARRON, A E (2008). Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2794-2799.
- CHONGSIRIWATANA, N P, WETZLER, M, BARRON, A E (2011). Functional synergy between antimicrobial peptoids and peptides against gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 399–5402.
- CITRI, N, ZYK, N (1965). The interaction of penicillinase with penicillins IV. Structural aspects of catalytic and non-catalytic interactions. *Biochim Biophys Acta*, 99, 427-441.
- CLEVELAND, A A, FARLEY, M M, HARRISON, L H, STEIN, B, HOLLICK, R, LOCKHART, S R, MAGILL, S S, DERADO, G, PARK, B J, CHILLER, T M (2012). Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clin Infect Dis*, 55, 1352-1361.
- CLEVELAND, A A, HARRISON, L H, FARLEY, M M, HOLLICK, R, STEIN, B, CHILLER, T M, LOCKHART, S R, PARK, B J (2015). Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. *PLoS One*, 10, e0120452.
- CLSI (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S16., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- COLE, L W (2016). The evolution of per-cell organelle number. *Front Cell Dev Biol*, 4, 85.
- COSTERTON, J W, INGRAM, J M, CHENG, K J (1974). Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol Rev*, 38, 87-110.
- CRISTOFARO, P, OPAL, S M (2003). The Toll-like receptors and their role in septic shock. *Expert Opin Ther Targets*, 7, 603-612.
- DAFFÉ, M, DRAPER, P (1997). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Academic Press*. 39, 131-203.

- DAMAS, P, REUTER, A, GYSEN, P, DEMONTY, J, LAMY, M, FRANCHIMONT, P (1989). Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med*, 17, 975-978.
- DAVIES, S C, FOWLER, T, WATSON, J, LIVERMORE, D M, WALKER, D (2013). Annual report of the chief medical officer: infection and the rise of antimicrobial resistance. *Lancet*, 381, 1606-1609.
- DE JONG, R, ALTARE, F, HAAGEN, I A, ELFERINK, D G, BOER, T, VAN BREDA VRIESMAN, P J, KABEL, P J, DRAAISMA, J M, VAN DISSEL, J T, KROON, F P, CASANOVA, J L, OTTENHOFF, T H (1998). Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science*, 280, 1435-1438.
- DELISLE, S, PERL, T M (2003). Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest*, 123, 504S-518S.
- DEN BROEDER, A A, JOOSTEN, L A, SAXNE, T, HEINEGARD, D, FENNER, H, MILTENBURG, A M, FRASA, W L, VAN TITS, L J, BUURMAN, W A, VAN RIEL, P L, VAN DE PUTTE, L B, BARRERA, P (2002). Long term anti-tumour necrosis factor alpha monotherapy in rheumatoid arthritis: effect on radiological course and prognostic value of markers of cartilage turnover and endothelial activation. *Ann Rheum Dis*, 61, 311-318.
- DHARMARAJA, A T (2017). Role of reactive oxygen species (ROS) in therapeutics and drug resistance in cancer and bacteria. *J Med Chem*, 60, 3221-3240.
- DIETZ, G P, BAHR, M (2004). Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci*, 27, 85-131.
- DOBELL, C (1923). *Antony van Leewenhoek and his "little animals."*. Harcourt, Brace and Co., New York.
- DONDONI, A (2008). The emergence of thiol-ene coupling as a click process for materials and bioorganic chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47, 8995-8997.
- DOVER, L G, COXON, G D (2011). Current status and research strategies in tuberculosis drug development. *J Med Chem*, 54, 6157-6165.
- DRAPER, P (1982). Bacteriology of *Mycobacterium leprae*: state of the art paper. *Ann Microbiol (Paris)*, 133, 13-14.
- DRAPER, P (1998). The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front Biosci*, 3, D1253-1261.
- DUPONT, H, MAHJOUB, Y, CHOUAKI, T, LORNE, E, ZOGHEIB, E (2017). Antifungal prevention of systemic Candidiasis in immunocompetent ICU adults: systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Crit Care Med*, 45, 1937-1945.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (2018). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017*.
- EGGENBERGER, K, BIRTALAN, E, SCHRODER, T, BRASE, S, NICK, P (2009). Passage of Trojan peptoids into plant cells. *Chembiochem*, 10, 2504-2512.

- EL-JADE, M R, PARCINA, M, SCHMITHAUSEN, R M, STEIN, C, MEILAENDER, A, HOERAUF, A, MOLITOR, E, BEKEREDJIAN-DING, I (2016). ESBL detection: comparison of a commercially available chromogenic test for third generation cephalosporine resistance and automated susceptibility testing in Enterobacteriaceae. PLoS ONE, 11, e0160203.
- ELEK, S D (1959). *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. E. & S. Livingstone, Ltd., vii + 767 pp.
- ENRIGHT, M C, ROBINSON, D A, RANDLE, G, FEIL, E J, GRUNDMANN, H, SPRATT, B G (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 7687-7692.
- ESPOSITO, S, BIANCHINI, S, BLASI, F (2015). Bedaquiline and delamanid in tuberculosis. Expert Opin Pharmacother, 16, 2319-2330.
- ETEBU, E, ARIKEKPAR, I (2016). Antibiotics: classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. IJAMBR, 4, 90-101.
- FALAGAS, M E, KASIAKOU, S K (2006). Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. Crit Care, 10, R27.
- FANG, L, LI, X, LI, L, LI, S, LIAO, X, SUN, J, LIU, Y (2016). Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. Sci Rep, 6, 25312.
- FARRINGTON, M, REDPATH, C, TRUNDLE, C, BROWN, N (1999). Controlling MRSA. J Hosp Infect, 41, 251-254.
- FASTING, C, SCHALLEY, C A, WEBER, M, SEITZ, O, HECHT, S, KOKSCH, B, DERNEDDE, J, GRAF, C, KNAPP, E W, HAAG, R (2012). Multivalency as a chemical organization and action principle. Angew Chem Int Ed Engl, 51, 10472-10498.
- FISHOVITZ, J, HERMOSO, J A, CHANG, M, MOBASHERY, S (2014). Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. IUBMB Life, 66, 572-577.
- FJELL, C D, HISS, J A, HANCOCK, R E, SCHNEIDER, G (2011). Designing antimicrobial peptides: form follows function. Nat Rev Drug Discov, 11, 37-51.
- FLYNN, J L, GOLDSTEIN, M M, CHAN, J, TRIEBOLD, K J, PFEFFER, K, LOWENSTEIN, C J, SCHREIBER, R, MAK, T W, BLOOM, B R (1995). Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Immunity, 2, 561-572.
- FOSTER, T J (2016). The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 35, 1923-1931.
- FOSTER, T J, GEOGHEGAN, J A, GANESH, V K, HOOK, M (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol, 12, 49-62.
- FOX, G J, MENZIES, D (2013). A review of the evidence for using bedaquiline (TMC207) to treat multi-drug resistant tuberculosis. J Infect Dis, 2, 123-144.

- FOXMAN, B, BROWN, P (2003). Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infect Dis Clin North Am*, 17, 227-241.
- FRANKEL, A D, PABO, C O (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55, 1189-1193.
- FREE, S J (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet*, 81, 33-82.
- FRIEDMAN, N D, TEMKIN, E, CARMELI, Y (2016). The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 22, 416-422.
- FRIEDRICH, C L, MOYLES, D, BEVERIDGE, T J, HANCOCK, R E (2000). Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 2086-2092.
- FRIEDRICH, C L, ROZEK, A, PATRZYKAT, A, HANCOCK, R E (2001). Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. *J Biol Chem*, 276, 24015-24022.
- FURKA, A, SEBESTYEN, F, ASGEDOM, M, DIBO, G (1991). General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int J Pept Protein Res*, 37, 487-493.
- GERRIETS, V, KHADDOUR, K (2019). Tumor necrosis factor (TNF) inhibitors.
- GESTWICKI, J E, CAIRO, C W, STRONG, L E, OETJEN, K A, KIESSLING, L L (2002). Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J Am Chem Soc*, 124, 14922-14933.
- GHOSH, C, MANJUNATH, G B, AKKAPEDDI, P, YARLAGADDA, V, HOQUE, J, UPPU, D S S M, KONAI, M M, HALDAR, J (2014). Small molecular antibacterial peptoid mimics: the simpler the better!, *J MedChem*, 57, 1428-1436.
- GLER, M T, SKRIPCONOKA, V, SANCHEZ-GARAVITO, E, XIAO, H, CABRERA-RIVERO, J L, VARGAS-VASQUEZ, D E, GAO, M, AWAD, M, PARK, S K, SHIM, T S, SUH, G Y, DANILOVITS, M, OGATA, H, KURVE, A, CHANG, J, SUZUKI, K, TUPASI, T, KOH, W J, SEAWORTH, B, GEITER, L J, WELLS, C D (2012). Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *N Engl J Med*, 366, 2151-2160.
- GLICKMAN, M S, JACOBS, W R, Jr. (2001). Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell*, 104, 477-485.
- GOLDMANN, D A, HUSKINS, W C (1997). Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide. *Clin Infect Dis*, 24 Suppl 1, S139-145.
- GOREN, M B, BRENNAN, P J (1979). Mycobacterial lipids: chemistry and biological activities. *Tuberculosis*.
- GREEN, M, LOEWENSTEIN, P M (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, 55, 1179-1188.
- GREMA, H A (2015). Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA): a review. *Adv Anim Vet*, 3, 79-98.

- GROSS, M (2013). Antibiotics in crisis. *Curr Biol*, 23, R1063-1065.
- GROVE, J, MARSH, M (2011). The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol*, 195, 1071-1082.
- GUDLAUGSSON, O, GILLESPIE, S, LEE, K, BERG, J V, HU, J, MESSER, S, HERWALDT, L, PFALLER, M, DIEKEMA, D (2003). Attributable mortality of nosocomial candidemia, Revisited. *Clin Infect Dis*, 37, 1172-1177.
- GUPTA, K, STAMM, W E (1999). Pathogenesis and management of recurrent urinary tract infections in women. *World J Urol*, 17, 415-420.
- GUTSMANN, T (2016). Interaction between antimicrobial peptides and mycobacteria. *BBA-Biomembranes*, 1858, 1034-1043.
- HAIR, P S, ECHAGUE, C G, SHOLL, A M, WATKINS, J A, GEOGHEGAN, J A, FOSTER, T J, CUNNION, K M (2010). Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis. *Infect Immun*, 78, 1717-1727.
- HALLIDAY, J, MCKEVENY, D, MULDOON, C, RAJARATNAM, P, MEUTERMANS, W (2006). Targeting the forgotten transglycosylases. *Biochem Pharmacol*, 71, 957-967.
- HAMPTON, T (2013). Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. *JAMA*, 310, 1661-1663.
- HAMRICK, T S, HARRIS, S L, SPEARS, P A, HAVELL, E A, HORTON, J R, RUSSELL, P W, ORNDORFF, P E (2000). Genetic characterization of *Escherichia coli* type 1 pilus adhesin mutants and identification of a novel binding phenotype. *J Bacteriol*, 182, 4012-4021.
- HAMURO, Y, SCHNEIDER, J P, DEGRADO, W F (1999). De novo design of antibacterial  $\beta$ -peptides. *J Am Chem Soc*, 121, 12200-12201.
- HANCOCK, R E W, SAHL, H-G (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*, 24, 1551-1557.
- HARRIS, S L, SPEARS, P A, HAVELL, E A, HAMRICK, T S, HORTON, J R, ORNDORFF, P E (2001). Characterization of *Escherichia coli* Type 1 Pilus mutants with altered binding specificities. *J Bacteriol*, 183, 4099-4102.
- HARTMAN, B J, TOMASZ, A (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 158, 513-516.
- HAWKEY, P M (2008). The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*, 62, i1-i9.
- HEIMARK, L, SHIPKOVA, P, GREENE, J, MUNAYYER, H, YAROSH-TOMAINO, T, DiDOMENICO, B, HARE, R, PRAMANIK, B N (2002). Mechanism of azole antifungal activity as determined by liquid chromatographic/mass spectrometric monitoring of ergosterol biosynthesis. *J Mass Spectrom*, 37, 265-269.

- HENK, W G, TODD, W J, ENRIGHT, F M, MITCHELL, P S (1995). The morphological effects of two antimicrobial peptides, hecate-1 and melittin, on *Escherichia coli*. *Scanning Microsc*, 9, 501-507.
- HILL, H R, HUNT, C E, MATSEN, J M (1974). Nosocomial colonization with *Klebsiella*, type 26, in a neonatal intensive-care unit associated with an outbreak of sepsis, meningitis, and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*, 85, 415-419.
- HIRAMATSU, K, ASADA, K, SUZUKI, E, OKONOJI, K, YOKOTA, T (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Lett*, 298, 133-136.
- HITCHCOCK, C A (1991). Cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *Biochem Soc Trans*, 19, 782-787.
- HOLT, K E, WERTHEIM, H, ZADOKS, R N, BAKER, S, WHITEHOUSE, C A, DANCE, D, JENNEY, A, CONNOR, T R, HSU, L Y, SEVERIN, J, BRISSE, S, CAO, H, WILKSCH, J, GORRIE, C, SCHULTZ, M B, EDWARDS, D J, NGUYEN, K V, NGUYEN, T V, DAO, T T, MENSINK, M, MINH, V L, NHU, N T K, SCHULTSZ, C, KUNTAMAN, K, NEWTON, P N, MOORE, C E, STRUGNELL, R A, THOMSON, N R (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E3574-E3581.
- HÖLTJE, J-V (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 181-203.
- HOOPER, D C, WOLFSON, J S (1985). The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses, and toxicities in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 28, 716-721.
- HOYER, J, SCHATZSCHNEIDER, U, SCHULZ-SIEGMUND, M, NEUNDORF, I (2012). Dimerization of a cell-penetrating peptide leads to enhanced cellular uptake and drug delivery. *Beilstein J Org Chem*, 8, 1788-1797.
- HUANG, J, BONDUELLE, C, THÉVENOT, J, LECOMMANDOUX, S, HEISE, A (2012). Biologically active polymersomes from amphiphilic glycopeptides. *J Am Chem Soc*, 134, 119-122.
- HUCKER, G J, CONN, H J (1923). *Methods of gram staining*. New York Agricultural Experiment Station, 93.
- HULL, R A, GILL, R E, HSU, P, MINSHEW, B H, FALKOW, S (1981). Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect Immun*, 33, 933-938.
- HURLIMANN-DALEL, R L, RYFFEL, C, KAYSER, F H, BERGER-BACHI, B (1992). Survey of the methicillin resistance-associated genes *mecA*, *mecR1-mecI*, and *femA-femB* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 36, 2617-2621.
- HYMES, J P, KLAENHAMMER, T R (2016). Stuck in the middle: fibronectin-binding proteins in gram-positive bacteria. *Front Microbiol*, 7, 1504.

- ISHITSUKA, Y, ARNT, L, MAJEWSKI, J, FREY, S, RATAJCZEK, M, KJAER, K, TEW, G N, LEE, K Y C (2006). Amphiphilic poly(phenyleneethynylene)s can mimic antimicrobial peptide membrane disordering effect by membrane insertion. *J Am Chem Soc*, 128, 13123-13129.
- ITO, T, HIRAMATSU, K, TOMASZ, A, DE LENCASTRE, H, PERRETEEN, V, HOLDEN, M T, COLEMAN, D C, GOERING, R, GIFFARD, P M, SKOV, R L, ZHANG, K, WESTH, H, O'BRIEN, F, TENOVER, F C, OLIVEIRA, D C, BOYLE-VAVRA, S, LAURENT, F, KEARNS, A M, KREISWIRTH, B, KO, K S, GRUNDMANN, H, SOLLID, J E, JOHN, J F, Jr., DAUM, R, SODERQUIST, B, BUIST, G (2012). Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 4997-4999.
- JARVIS, W R, MUNN, V P, HIGHSMITH, A K, CULVER, D H, HUGHES, J M (1985). The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control*, 6, 68-74.
- JEVONS, M P (1961). "Celbenin" - resistant Staphylococci. *BMJ*, 1, 124-125.
- JONES, L S, YAZZIE, B, MIDDAGH, C R (2004). Polyanions and the proteome. *Mol Cell Proteomics*, 3, 746-769.
- JONES, R N (2010). Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis*, 51 Suppl 1, 81-87.
- KAPOOR, G, SAIGAL, S, ELONGAVAN, A (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 33, 300-305.
- KAPOOR, R, EIMERMAN, P R, HARDY, J W, CIRILLO, J D, CONTAG, C H, BARRON, A E (2011). Efficacy of antimicrobial peptoids against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3058-3062.
- KATAYAMA, Y, ITO, T, HIRAMATSU, K (2000). A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 1549-1555.
- KAULICH, B, THIBAUT, P, GIANONCELLI, A, KISKINOVA, M (2011). Transmission and emission x-ray microscopy: operation modes, contrast mechanisms and applications. *J Phys Condens Matter*, 23, 083002.
- KAYE, K S, POGUE, J M (2015). Infections caused by resistant gram-negative bacteria: epidemiology and management. *Pharmacotherapy*, 35, 949-962.
- KEANE, J, GERSHON, S, WISE, R P, MIRABILE-LEVENS, E, KASZNICA, J, SCHWIETERMAN, W D, SIEGEL, J N, BRAUN, M M (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor  $\alpha$ -neutralizing agent. *N Engl J Med*, 345, 1098-1104.
- KEMPE, D S, AKEL, A, LANG, P A, HERMLE, T, BISWAS, R, MURESANU, J, FRIEDRICH, B, DREISCHER, P, WOLZ, C, SCHUMACHER, U, PESCHEL, A, GÖTZ, F, DÖRING, G, WIEDER, T, GULBINS, E, LANG, F (2007). Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med (Berl)*, 85, 273-281.
- KEYSTONE, E C, SCHIFF, M H, KREMER, J M, KAFKA, S, LOVY, M, DEVRIES, T, BURGE, D J (2004). Once-weekly administration of 50 mg etanercept in patients with active

rheumatoid arthritis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 50, 353-363.

KHARA, J S, LIM, F K, WANG, Y, KE, X Y, VOO, Z X, YANG, Y Y, LAKSHMINARAYANAN, R, EE, P L R (2015). Designing alpha-helical peptides with enhanced synergism and selectivity against *Mycobacterium smegmatis*: discerning the role of hydrophobicity and helicity. *Acta Biomater*, 28, 99-108.

KIM, J, SUDBERY, P (2011). *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*, 49, 171.

KIM, Y-K, PAI, H, LEE, H-J, PARK, S-E, CHOI, E-H, KIM, J, KIM, J-H, KIM, E-C (2002). Bloodstream infections by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 1481-1491.

KINDLER, V, SAPPINO, A P, GRAU, G E, PIGUET, P F, VASSALLI, P (1989). The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*, 56, 731-740.

KIRBY, W M (1944). Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*, 99, 452-453.

KLIS, F M (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast*, 10, 851-869.

KÖCK, R, BECKER, K, COOKSON, B, GEMERT-PIJNEN, J E v, HARBARTH, S, KLUYTMANS, J, MIELKE, M, PETERS, G, SKOV, R L, STRUELENS, M J, TACCONELLI, E, TORNÉ, A N, WITTE, W, FRIEDRICH, A W (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. Robert Koch-Institut.

KOH, J J, ZOU, H, MUKHERJEE, D, LIN, S, LIM, F, TAN, J K, TAN, D Z, STOCKER, B L, TIMMER, M S M, CORKRAN, H M, LAKSHMINARAYANAN, R, TAN, D T H, CAO, D, BEUERMAN, R W, DICK, T, LIU, S (2016). Amphiphilic xanthenes as a potent chemical entity of anti-mycobacterial agents with membrane-targeting properties. *Eur J Med Chem*, 123, 684-703.

KOLB, H C, FINN, M G, SHARPLESS, K B (2001). Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 40, 2004-2021.

KÖLMEL, D K, FURNISS, D, SUSANTO, S, LAUER, A, GRABHER, C, BRASE, S, SCHEPERS, U (2012). Cell penetrating peptoids (CPPos): synthesis of a small combinatorial library by using IRORI MiniKans. *Pharmaceuticals (Basel)*, 5, 1265-1281.

KÖLMEL, D K, HORNER, A, RONICKE, F, NIEGER, M, SCHEPERS, U, BRASE, S (2014). Cell-penetrating peptoids: introduction of novel cationic side chains. *Eur J Med Chem*, 79, 231-243.

KONTOYIANNIS, D P, LEWIS, R E (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *The Lancet*, 359, 1135-1144.

KOUL, A, ARNOULT, E, LOUNIS, N, GUILLEMONT, J, ANDRIES, K (2011). The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, 469, 483-490.

- KRANJČEC, B, PAPEŠ, D, ALTARAC, S (2014). D-mannose powder for prophylaxis of recurrent urinary tract infections in women: a randomized clinical trial. *World J Urol*, 32, 79-84.
- KRESKEN, M, HAFNER, D (1999). Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975-1995. Study group bacterial resistance of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Infection*, 27 Suppl 2, 2-8.
- KRESKEN, M, HAFNER, D, SCHMITZ, F J, WICHELHAUS, T A (2003). für die Studiengruppe: Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen und Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 2001.
- KRESKEN, M, HAFNER, D, SCHMITZ, F J, WICHELHAUS, T A, PAUL-EHRLICH-SOCIETY FOR, C (2004). Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the antimicrobial resistance surveillance study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, 2001. *Int J Antimicrob Agents*, 23, 577-581.
- KRISHNAMOORTHY, K, VEERAPANDIAN, M, ZHANG, L-H, YUN, K, KIM, S J (2012). Antibacterial efficiency of graphene nanosheets against pathogenic bacteria via lipid peroxidation. *J Phys Chem C*, 116, 17280-17287.
- KULP, A, KUEHN, M J (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol*, 64, 163-184.
- KUMAMOTO, C A, PIERCE, J V (2011). Immunosensing during colonization by *Candida albicans*: does it take a village to colonize the intestine?, *Trends Microbiol*, 19, 263-267.
- KUMAMOTO, C A, VINCES, M D (2005). Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol*, 59, 113-133.
- LAKHUNDI, S, ZHANG, K (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev*, 31.
- LAN, L, CHENG, A, DUNMAN, P M, MISSIAKAS, D, HE, C (2010). Golden pigment production and virulence gene expression are affected by metabolisms in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 192, 3068-3077.
- LANDMAN, D, GEORGESCU, C, MARTIN, D A, QUALE, J (2008). Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev*, 21, 449-465.
- LE GROS, M A, MCDERMOTT, G, LARABELL, C A (2005). X-ray tomography of whole cells. *Curr Opin Struct Biol*, 15, 593-600.
- LE GROS, M A, MCDERMOTT, G, UCHIDA, M, KNOECHEL, C G, LARABELL, C A (2009). High-aperture cryogenic light microscopy. *J Microsc*, 235, 1-8.
- LEDERBERG, J (1957). Mechanism of action of penicillin. *J Bacteriol*, 73, 144.

- LEROY, O, GANGNEUX, J P, MONTRAVERS, P, MIRA, J P, GOUIN, F, SOLLET, J P, CARLET, J, REYNES, J, ROSENHEIM, M, REGNIER, B, LORTHOLARY, O (2009). Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med*, 37, 1612-1618.
- LEVY, R M, LEYDEN, J J, MARGOLIS, D J (2005). Colonisation rates of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* in the oropharynx of a young adult population. *Clin Microbiol Infect*, 11, 153-155.
- LI, J, NATION, R L, TURNIDGE, J D, MILNE, R W, COULTHARD, K, RAYNER, C R, PATERSON, D L (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*, 6, 589-601.
- LINDGREN, M, HALLBRINK, M, PROCHIANTZ, A, LANGEL, U (2000). Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci*, 21, 99-103.
- LINDSAY, J A, MOORE, C E, DAY, N P, PEACOCK, S J, WITNEY, A A, STABLER, R A, HUSAIN, S E, BUTCHER, P D, HINDS, J (2006). Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *J Bacteriol*, 188, 669-676.
- LIU, D, DEGRADO, W F (2001). De novo design, synthesis, and characterization of antimicrobial  $\beta$ -peptides. *J Am Chem Soc*, 123, 7553-7559.
- LIU, G Y, ESSEX, A, BUCHANAN, J T, DATTA, V, HOFFMAN, H M, BASTIAN, J F, FIERER, J, NIZET, V (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med*, 202, 209-215.
- LUEPKE, K H, SUDA, K J, BOUCHER, H, RUSSO, R L, BONNEY, M W, HUNT, T D, MOHR III, J F (2017). Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. *Pharmacotherapy*, 37, 71-84.
- LUGTENBERG, B, VAN ALPHEN, L (1983). Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *BBA*, 737, 51-115.
- MACGOWAN, A P, ANDERSSON, M I (2003). Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother*, 51, 1-11.
- MAIER, M A, YANNOPOULOS, C G, MOHAMED, N, ROLAND, A, FRITZ, H, MOHAN, V, JUST, G, MANOHARAN, M (2003). Synthesis of antisense oligonucleotides conjugated to a multivalent carbohydrate cluster for cellular targeting. *Bioconjug Chem*, 14, 18-29.
- MAMMEN, M, CHOI, S K, WHITESIDES, G M (1998). Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 37, 2754-2794.
- MANDELL, G L (1974). Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun*, 9, 337-341.

- MANGES, A R, JOHNSON, J R (2012). Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin Infect Dis*, 55, 712-719.
- MARSCHÜTZ, M K, BERNKOP-SCHNÜRCH, A (2000). Oral peptide drug delivery: polymer–inhibitor conjugates protecting insulin from enzymatic degradation in vitro. *Biomaterials*, 21, 1499-1507.
- MARTÍNEZ, J A, AGUILAR, J, ALMELA, M, MARCO, F, SORIANO, A, LÓPEZ, F, BALASSO, V, POZO, L, MENSA, J (2006). Prior use of carbapenems may be a significant risk factor for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella* spp. in patients with bacteraemia. *J Antimicrob Chemother*, 58, 1082-1085.
- MCMURRAY, D N (2001). Disease model: pulmonary tuberculosis. *Trends Mol Med*, 7, 135-137.
- MCNEIL, M, DAFFE, M, BRENNAN, P J (1991). Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J Biol Chem*, 266, 13217-13223.
- MCNEIL, M R, BRENNAN, P J (1991). Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol*, 142, 451-463.
- MÉNDEZ-SAMPERIO, P (2008). Role of antimicrobial peptides in host defense against mycobacterial infections. *Peptides*, 29, 1836-1841.
- MERRIFIELD, R B (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc*, 85, 2149-2154.
- MICHAELS, E K, CHMIEL, J S, PLOTKIN, B J, SCHAEFFER, A J (1983). Effect of D-mannose and D-glucose on *Escherichia coli* bacteriuria in rats. *Urol Res*, 11, 97-102.
- MINNIKIN, D E, MINNIKIN, S M, GOODFELLOW, M, STANFORD, J L (1982). The mycolic acids of *Mycobacterium chelonae*. *J Gen Microbiol*, 128, 817-822.
- MIRA, J-P, CARIOU, A, GRALL, F, DELCLAUX, C, LOSSER, M-R, HESHMATI, F, CHEVAL, C, MONCHI, M, TEBOUL, J-L, RICÉ, F, LELEU, G, ARBIBE, L, MIGNON, A, DELPECH, M, DHAINAUT, J-F (1999). Association of TNF2, a TNF- $\alpha$  promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality. A multicenter Study. *JAMA*, 282, 561-568.
- MOHAN, V P, SCANGA, C A, YU, K, SCOTT, H M, TANAKA, K E, TSANG, E, TSAI, M M, FLYNN, J L, CHAN, J (2001). Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun*, 69, 1847-1855.
- MOJSOSKA, B, JENSSEN, H (2015). Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design. *Pharmaceuticals (Basel)*, 8, 366-415.
- MOJSOSKA, B, ZUCKERMANN, R N, JENSSEN, H (2015). Structure-activity relationship study of novel peptoids that mimic the structure of antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 4112-4120.
- MORAN, E J, SARSHAR, S, CARGILL, J F, SHAHBAZ, M M, LIO, A, MJALLI, A M M, ARMSTRONG, R W (1995). Radio frequency tag encoded combinatorial library method

for the discovery of tripeptide-substituted cinnamic acid inhibitors of the protein tyrosine phosphatase PTP1B. *J Am Chem Soc*, 117, 10787-10788.

MORATH, S, VON AULOCK, S, HARTUNG, T (2005). Structure/function relationships of lipoteichoic acids. *J Endotoxin Res*, 11, 348-356.

MORRIS, R S, PFEIFFER, D U, JACKSON, R (1994). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol*, 40, 153-177.

MORRISON, T E, MAUSER, A, KLINGELHUTZ, A, KENNEY, S C (2004). Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced signaling and apoptosis by downregulating tumor necrosis factor receptor 1. *J Virol*, 78, 544-549.

MOYES, R B, REYNOLDS, J, BREAKWELL, D P (2009). Differential staining of bacteria: gram stain. *Curr Protoc Microbiol*, 15, A.3C.1-A.3C.8.

MUKHERJEE, D, WU, M-L, TEO, J W P, DICK, T (2017). Vancomycin and clarithromycin show synergy against *Mycobacterium abscessus* *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 61, e01298-01217.

MUKHERJEE, D, ZOU, H, LIU, S, BEUERMAN, R, DICK, T (2016). Membrane-targeting AM-0016 kills mycobacterial persisters and shows low propensity for resistance development. *Future Microbiol*, 11, 643-650.

MUNOZ, A, SIGWALT, D, ILLESCAS, B M, LUCZKOWIAK, J, RODRIGUEZ-PEREZ, L, NIERENGARTEN, I, HOLLER, M, REMY, J S, BUFFET, K, VINCENT, S P, ROJO, J, DELGADO, R, NIERENGARTEN, J F, MARTIN, N (2016). Synthesis of giant globular multivalent glycofullerenes as potent inhibitors in a model of Ebola virus infection. *Nat Chem*, 8, 50-57.

MUSSER, J M, KAPUR, V (1992). Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol*, 30, 2058-2063.

NAM, K T, SHELBY, S A, CHOI, P H, MARCIEL, A B, CHEN, R, TAN, L, CHU, T K, MESCH, R A, LEE, B C, CONNOLLY, M D, KISIELOWSKI, C, ZUCKERMANN, R N (2010). Free-floating ultrathin two-dimensional crystals from sequence-specific peptoid polymers. *Nat Mater*, 9, 454-460.

NEUHAUS, F C, BADDILEY, J (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 686-723.

NEWPORT, M J, HUXLEY, C M, HUSTON, S, HAWRYLOWICZ, C M, OOSTRA, B A, WILLIAMSON, R, LEVIN, M (1996). A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*, 335, 1941-1949.

NICKEL, J C (2005). Practical management of recurrent urinary tract infections in premenopausal women. *Rev Urol*, 7, 11-17.

- NICOLAOU, K C, XIAO, X-Y, PARANDOOSH, Z, SENYEL, A, NOVA, M P (1995). Radiofrequency encoded combinatorial chemistry. *Angew Chem, Int Ed*, 34, 2289-2291.
- NORDMANN, P, CUZON, G, NAAS, T (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, 9, 228-236.
- O'NEILL, J (2015). Review on antimicrobial resistance. Securing new drugs for future generations: The pipeline of antibiotics. *Wellcome Open Res*.
- ODDS, F C (2003). Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*, 52, 1.
- OLIVIER, G K, CHO, A, SANII, B, CONNOLLY, M D, TRAN, H, ZUCKERMANN, R N (2013). Antibody-mimetic peptoid nanosheets for molecular recognition. *ACS Nano*, 7, 9276-9286.
- OLIVOS, H J, ALLURI, P G, REDDY, M M, SALONY, D, KODADEK, T (2002). Microwave-assisted solid-phase synthesis of peptoids. *Org Lett*, 4, 4057-4059.
- ONDERDONK, A B, WEINSTEIN, W M, SULLIVAN, N M, BARTLETT, J G, GORBACH, S L (1974). Experimental intra-abdominal abscesses in rats: quantitative bacteriology of infected animals. *Infect Immun*, 10, 1256-1259.
- OSTROUMOVA, O S, EFIMOVA, S S, MALEV, V V (2015). Chapter six - modifiers of membrane dipole potentials as tools for investigating ion channel formation and functioning. *Int Rev Cell Mol Biol*. 315, 245-297.
- OTTO, M (2010). *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol*, 5, 183-195.
- PACE, J L, YANG, G (2006). Glycopeptides: update on an old successful antibiotic class. *Biochem Pharmacol*, 71, 968-980.
- PAGÈS, J-M, JAMES, C E, WINTERHALTER, M (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 6, 893.
- PAPPAS, P G, REX, J H, LEE, J, HAMILL, R J, LARSEN, R A, POWDERLY, W, KAUFFMAN, C A, HYSLOP, N, MANGINO, J E, CHAPMAN, S, HOROWITZ, H W, EDWARDS, J E, DISMUKES, W E, GROUP, N M S (2003). A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis*, 37, 634-643.
- PARAMESWARAN, N, PATIAL, S (2010). Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 20, 87-103.
- PASTEWSKI, A A, CARUSO, P, PARRIS, A R, DIZON, R, KOPEC, R, SHARMA, S, MAYER, S, GHITAN, M, CHAPNICK, E K (2008). Parenteral polymyxin B use in patients with multidrug-resistant gram-negative bacteremia and urinary tract infections: a retrospective case series. *Ann Pharmacother*, 42, 1177-1187.
- PATERSON, D L (2006). Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Am J Infect Control*, 34, S20-S28.

- PATI, D, SHAIKH, A Y, DAS, S, NAREDDY, P K, SWAMY, M J, HOTHAS, S, GUPTA, S S (2012). Controlled synthesis of O-glycopolypeptide polymers and their molecular recognition by lectins. *Biomacromolecules*, 13, 1287-1295.
- PEACOCK, S J, PATERSON, G K (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*, 84, 577-601.
- PEIRANO, G, AHMED-BENTLEY, J, FULLER, J, RUBIN, J E, PITOUT, J D D (2014). Travel-related carbapenemase-producing gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years. *J Clin Microbiol*, 52, 1575-1581.
- PERLIN, D S (2015). Echinocandin resistance in *Candida*. *Clin Infect Dis*, 61 Suppl 6, 612-617.
- PEW (2017). Antibiotics currently in clinical development. The Pew Charitable Trust.
- PEW (2018). Antibiotics currently in global clinical development. The Pew Charitable Trust.
- PFALLER, M A, DIEKEMA, D J, GIBBS, D L, NEWELL, V A, ELLIS, D, TULLIO, V, RODLOFF, A, FU, W, LING, T A, GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE, G (2010). Results from the ARTEMIS DISK Global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*, 48, 1366-1377.
- PFALLER, M A, RHOMBERG, P R, MESSER, S A, JONES, R N, CASTANHEIRA, M (2015). Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 82, 303-313.
- PITTET, D, MONOD, M, SUTER, P M, FRENK, E, AUCKENTHALER, R (1994). *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Annals of surgery*, 220, 751-758.
- PITTET, D, TARARA, D, WENZEL, R P (1994). Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA*, 271, 1598-1601.
- PIZARRO-CERDA, J, COSSART, P (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124, 715-727.
- PODSCHUN, R, ULLMANN, U (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*, 11, 589-603.
- POLAT, G, UGAN, R A, CADIRCI, E, HALICI, Z (2017). Sepsis and septic shock: current treatment strategies and new approaches. *Eurasian J Med*, 49, 53-58.
- POLSON, J E (2007). Hepatotoxicity due to antibiotics. *Dig Liver Dis*, 11, 549-561.
- POPOVA, A A, MARCATO, D, PERAVALI, R, WEHL, I, SCHEPERS, U, LEVKIN, P A (2018). Fish-microarray: A miniaturized platform for single-embryo high-throughput screenings. *Adv Funct Mater*, 28, 1703486.

- PORTER, E A, WEISBLUM, B, GELLMAN, S H (2002). Mimicry of host-defense peptides by unnatural oligomers: antimicrobial beta-peptides. *J Am Chem Soc*, 124, 7324-7330.
- PORTER, J R (1976). Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriol Rev*, 40, 260-269.
- POTOCKY, T B, MENON, A K, GELLMAN, S H (2003). Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J Biol Chem*, 278, 50188-50194.
- PRATT, J P, RAVNIC, D J, HUSS, H T, JIANG, X, OROZCO, B S, MENTZER, S J (2005). Melittin-induced membrane permeability: a nonosmotic mechanism of cell death. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 41, 349-355.
- RADETSKY, M (1996). The discovery of penicillin. *Pediatr Infect Dis J*, 15, 811-818.
- RAMMELKAMP, C H, MAXON, T (1942). Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proc Soc Exp Biol Med*, 51, 386-389.
- RASTOGLI, N, DAVID, H L (1988). Mechanisms of pathogenicity in mycobacteria. *Biochimie*, 70, 1101-1120.
- RAYNER, C, MUNCKHOF, W J (2005). Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Intern Med J*, 35 Suppl 2, S3-16.
- REDDY, K V, YEDERY, R D, ARANHA, C (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*, 24, 536-547.
- REYNOLDS, P E, BROWN, D F (1985). Penicillin-binding proteins of beta-lactam-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Effect of growth conditions. *FEBS Lett*, 192, 28-32.
- RIDLEY, M, BARRIE, D, LYNN, R, STEAD, K C (1970). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and hospital antibiotic policies *The Lancet*, 295, 230-233.
- Robert Koch Institut (2018). Epidemiologisches Bulletin. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health.
- ROBBINS, J B, MCCracken, G H, GOTSCHLICH, E C, ØRSKOV, F, ØRSKOV, I, HANSON, L A (1974). *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis. *N Engl J Med*, 290, 1216-1220.
- ROBERTSON, E J, BATTIGELLI, A, PROULX, C, MANNIGE, R V, HAXTON, T K, YUN, L, WHITELAM, S, ZUCKERMANN, R N (2016). Design, synthesis, assembly, and engineering of peptoid nanosheets. *Acc Chem Res*, 49, 379-389.
- ROKITSKAYA, T I, KOLODKIN, N I, KOTOVA, E A, ANTONENKO, Y N (2011). Indolicidin action on membrane permeability: carrier mechanism versus pore formation. *Biochim Biophys Acta*, 1808, 91-97.
- RÖNICKE, F (2015). Synthese und *in vivo* Screening einer Bibliothek zellpenetrierender Peptide zur Isolation organspezifischer Transportmoleküle.

- ROOK, G A, TAVERNE, J, LEVETON, C, STEELE, J (1987). The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology*, 62, 229-234.
- ROSENZWEIG, D Y (1979). Pulmonary mycobacterial infections due to *Mycobacterium intracellulare*-*avium* complex: clinical features and course in 100 consecutive cases. *Chest*, 75, 115-119.
- RUSSELL, P W, ORNDORFF, P E (1992). Lesions in two *Escherichia coli* type 1 pilus genes alter pilus number and length without affecting receptor binding. *J Bacteriol*, 174, 5923-5935.
- RUSSO, T A, JOHNSON, J R (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis*, 181, 1753-1754.
- RYSER, H J, SHEN, W C (1978). Conjugation of methotrexate to poly(L-lysine) increases drug transport and overcomes drug resistance in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 3867-3870.
- SACCHETTINI, J C, RUBIN, E J, FREUNDLICH, J S (2008). Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*, 6, 41-52.
- SÁENZ, Y, BRIÑAS, L, DOMÍNGUEZ, E, RUIZ, J, ZARAZAGA, M, VILA, J, TORRES, C (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 3996-4001.
- SALLIOT, C, GOSSEC, L, RUYSSSEN-WITRAND, A, LUC, M, DUCLOS, M, GUIGNARD, S, DOUGADOS, M (2007). Infections during tumour necrosis factor-alpha blocker therapy for rheumatic diseases in daily practice: a systematic retrospective study of 709 patients. *Rheumatology (Oxford)*, 46, 327-334.
- SANDERS, C C (1977). *In vitro* studies with cefaclor, a new oral cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother*, 12, 490-497.
- SANII, B, KUDIRKA, R, CHO, A, VENKATESWARAN, N, OLIVIER, G K, OLSON, A M, TRAN, H, HARADA, R M, TAN, L, ZUCKERMANN, R N (2011). Shaken, not stirred: collapsing a peptoid monolayer to produce free-floating, stable nanosheets. *J Am Chem Soc*, 133, 20808-20815.
- SAPORITO, P, BILJANA, M, LØBNER OLESEN, A, JENSSEN, H (2019). Antibacterial mechanisms of GN-2 derived peptides and peptoids against *Escherichia coli*. *Biopolymers*, 0, e23275.
- SARAVOLATZ, L D, KASIAKOU, S K, FALAGAS, M E (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*, 40, 1333-1341.
- SCHAEFFER, A J, AMUNDSEN, S K, JONES, J M (1980). Effect of carbohydrates on adherence of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. *Infect Immun*, 30, 531-537.

SCHAEFFER, A J, CHMIEL, J S, DUNCAN, J L, FALKOWSKI, W S (1984). Mannose-sensitive adherence of *Escherichia coli* to epithelial cells from women with recurrent urinary tract infections. *J Urol*, 131, 906-910.

SCHERTZER, J W, WHITELEY, M (2012). A bilayer-couple model of bacterial outer membrane vesicle biogenesis. *MBio*, 3.

SCHRODER, T, SCHMITZ, K, NIEMEIER, N, BALABAN, T S, KRUG, H F, SCHEPERS, U, BRASE, S (2007). Solid-phase synthesis, bioconjugation, and toxicology of novel cationic oligopeptoids for cellular drug delivery. *Bioconjug Chem*, 18, 342-354.

SCHWABER, M J, CARMELI, Y (2008). Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: a potential threat. *JAMA*, 300, 2911-2913.

SCHWARTZ, M T, CALVERT, J F (1990). Potential neurologic toxicity related to ciprofloxacin. *DICP*, 24, 138-140.

SCHWARZ-LINEK, U, HOOK, M, POTTS, J R (2006). Fibronectin-binding proteins of gram-positive cocci. *Microbes Infect*, 8, 2291-2298.

SCHWARZ-LINEK, U, WERNER, J M, PICKFORD, A R, GURUSIDDAPPA, S, KIM, J H, PILKA, E S, BRIGGS, J A, GOUGH, T S, HOOK, M, CAMPBELL, I D, POTTS, J R (2003). Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature*, 423, 177-181.

SCHWENDENER, S, COTTING, K, PERRETEN, V (2017). Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Macrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. *Sci Rep*, 7, 43797.

SEEBACH, D, OVERHAND, M, KÜHNLE, F N M, MARTINONI, B, OBERER, L, HOMMEL, U, WIDMER, H (1996).  $\beta$ -Peptides: Synthesis by Arndt-Eistert homologation with concomitant peptide coupling. Structure determination by NMR and CD spectroscopy and by X-ray crystallography. Helical secondary structure of a  $\beta$ -hexapeptide in solution and its stability towards pepsin. *Helv Chim Acta*, 79, 913-941.

SENALDI, G, YIN, S, SHAKLEE, C L, PIGUET, P F, MAK, T W, ULICH, T R (1996). *Corynebacterium parvum*- and *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-induced granuloma formation is inhibited in TNF receptor I (TNF-RI) knockout mice and by treatment with soluble TNF-RI. *J Immunol*, 157, 5022-5026.

SENDI, P, PROCTOR, R A (2009). *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol*, 17, 54-58.

SENGUPTA, S, CHATTOPADHYAY, M K, GROSSART, H P (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol*, 4, 47.

SEO, J, REN, G, LIU, H, MIAO, Z, PARK, M, WANG, Y, MILLER, T M, BARRON, A E, CHENG, Z (2012). In vivo biodistribution and small animal PET of (64)Cu-labeled antimicrobial peptoids. *Bioconjug Chem*, 23, 1069-1079.

SHOCKMAN, G D, BARRETT, J F (1983). Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 37, 501-527.

- SHON, A S, BAJWA, R P, RUSSO, T A (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*, 4, 107-118.
- SIMON, R J, KANIA, R S, ZUCKERMANN, R N, HUEBNER, V D, JEWELL, D A, BANVILLE, S, NG, S, WANG, L, ROSENBERG, S, MARLOWE, C K, ET AL. (1992). Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 9367-9371.
- SKRIPCONOKA, V, DANILOVITS, M, PEHME, L, TOMSON, T, SKENDERS, G, KUMMIK, T, CIRULE, A, LEIMANE, V, KURVE, A, LEVINA, K, GEITER, L J, MANISSERO, D, WELLS, C D (2013). Delamanid improves outcomes and reduces mortality in multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J*, 41, 1393-1400.
- SKULACHEV, V P (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*, 1363, 100-124.
- SNYDER, E L, DOWDY, S F (2004). Cell penetrating peptides in drug delivery. *Pharm Res*, 21, 389-393.
- SPEARS, P A, SCHAUER, D, ORNDORFF, P E (1986). Metastable regulation of type 1 piliation in *Escherichia coli* and isolation and characterization of a phenotypically stable mutant. *J Bacteriol*, 168, 179-185.
- SPELLBERG, B, GILBERT, D N (2014). The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis*, 59 Suppl 2, 71-75.
- STEINBERG, I Z, HARRINGTON, W F, BERGER, A, SELA, M, KATCHALSKI, E (1960). The configurational changes of poly-L-proline in solution. *J Am Chem Soc*, 82, 5263-5279.
- STRYJEWSKI, M E, COREY, G R (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. *Clin Infect Dis*, 58 Suppl 1, 10-19.
- SUTHERLAND, R, CROYDON, E A P, ROLINSON, G N (1970). Flucloxacillin, a new isoxazolyl Penicillin, compared with oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin. *BMJ*, 4, 455-460.
- SUZUKI, E, HIRAMATSU, K, YOKOTA, T (1992). Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for mecA gene distribution. *Antimicrob Agents Chemother*, 36, 429-434.
- SWOBODA, J G, CAMPBELL, J, MEREDITH, T C, WALKER, S (2010). Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *ChemBiochem*, 11, 35-45.
- TACCONELLI, E, CARRARA, E, SAVOLDI, A, HARBARTH, S, MENDELSON, M, MONNET, D L, PULCINI, C, KAHLMETER, G, KLUYTMANS, J, CARMELI, Y, OUELLETTE, M, OUTTERSON, K, PATEL, J, CAVALERI, M, COX, E M, HOUCHEMS, C R, GRAYSON, M L, HANSEN, P, SINGH, N, THEURETZBACHER, U, MAGRINI, N, ABODERIN, A O, AL-ABRI, S S, AWANG JALIL, N, BENZONANA, N, BHATTACHARYA, S, BRINK, A J, BURKERT, F R, CARS, O, CORNAGLIA, G, DYAR, O J, FRIEDRICH, A W, GALES, A C, GANDRA, S, GISKE, C G, GOFF, D A, GOOSSENS, H, GOTTLIEB, T, GUZMAN BLANCO, M, HRYNIEWICZ, W, KATTULA, D, JINKS, T, KANJ, S S, KERR, L, KIENY, M-P, KIM, Y S, KOZLOV, R S, LABARCA, J, LAXMINARAYAN, R, LEDER, K, LEIBOVICI, L, LEVY-HARA, G, LITTMAN, J, MALHOTRA-KUMAR, S, MANCHANDA, V, MOJA, L, NDOYE, B, PAN, A, PATERSON, D L, PAUL, M, QIU, H, RAMON-PARDO, P, RODRÍGUEZ-BAÑO, J, SANGUINETTI, M, SENGUPTA, S, SHARLAND, M, SI-MEHAND, M, SILVER, L L, SONG, W, STEINBAKK, M, THOMSEN, J, THWAITES, G E, VAN DER MEER, J W M, VAN KINH,

- N, VEGA, S, VILLEGAS, M V, WECHSLER-FÖRDÖS, A, WERTHEIM, H F L, WESANGULA, E, WOODFORD, N, YILMAZ, F O, ZORZET, A (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 18, 318-327.
- TAGER, M (1956). Studies on the nature and the purification of the coagulase-reacting factor and its relation to prothrombin. *J Exp Med*, 104, 675-686.
- TAN, N C, YU, P, KWON, Y U, KODADEK, T (2008). High-throughput evaluation of relative cell permeability between peptoids and peptides. *Bioorg Med Chem*, 16, 5853-5861.
- THOMER, L, EMOLO, C, THAMMAVONGSA, V, KIM, H K, MCADOW, M E, YU, W, KIEFFER, M, SCHNEEWIND, O, MISSIAKAS, D (2016). Antibodies against a secreted product of *Staphylococcus aureus* trigger phagocytic killing. *J Exp Med*, 213, 293-301.
- TORCHILIN, V P (2000). Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*, 11 Suppl 2, 81-91.
- TRAMONTANA, J M, UTAIPAT, U, MOLLOY, A, AKARASEWI, P, BURROUGHS, M, MAKONKAWKEYOON, S, JOHNSON, B, KLAUSNER, J D, ROM, W, KAPLAN, G (1995). Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. *Mol Med*, 1, 384-397.
- TSUBERY, H, OFEK, I, COHEN, S, FRIDKIN, M (2000). The functional association of polymyxin B with bacterial lipopolysaccharide is stereospecific: studies on polymyxin B nonapeptide. *Biochemistry*, 39, 11837-11844.
- TURNER, J, FRANK, A A, BROOKS, J V, MARIETTA, P M, ORME, I M (2001). Pentoxifylline treatment of mice with chronic pulmonary tuberculosis accelerates the development of destructive pathology. *Immunology*, 102, 248-253.
- UCHIDA, M, MCDERMOTT, G, WETZLER, M, LE GROS, M A, MYLLYS, M, KNOECHEL, C, BARRON, A E, LARABELL, C A (2009). Soft X-ray tomography of phenotypic switching and the cellular response to antifungal peptoids in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 19375-19380.
- UTSUI, Y, YOKOTA, T (1985). Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 28, 397-403.
- VAARA, M (2009). New approaches in peptide antibiotics. *Curr Opin Pharmacol*, 9, 571-576.
- VAGNER, J, QU, H, HRUBY, V J (2008). Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 12, 292-296.
- VAIDYA, S, DVIVEDI, G, JADHAV, S (2011). Cross-neutralization between three mumps viruses & mapping of haemagglutinin-neuraminidase (HN) epitopes. *J Lab Physicians*, 3, 37-42.
- VAN DEN ENT, F, AMOS, L A, LOWE, J (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*, 413, 39-44.
- VAN HAUWERMEIREN, E, IOSIFIDIS, E, KÄRKI, T, SUETENS, C, KINROSS, P, PLACHOURAS, D (2019). Development of case vignettes for assessment of the inter-rater variability of

national validation teams for the point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. *J Hosp Infect*, 101, 455-460.

VANDAMME, D, LANDUYT, B, LUYTEN, W, SCHOOF, L (2012). A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol*, 280, 22-35.

VINCENT, J L, RELLO, J, MARSHALL, J, SILVA, E, ANZUETO, A, MARTIN, C D, MORENO, R, LIPMAN, J, GOMERSALL, C, SAKR, Y, REINHART, K (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*, 302, 2323-2329.

VINCENT, S P, BUFFET, K, NIERENGARTEN, I, IMBERTY, A, NIERENGARTEN, J-F (2016). Biologically active heteroglycoclusters constructed on a pillar[5]arene-containing [2]rotaxane scaffold. *Eur J Chem*, 22, 88-92.

VIOLETTE, A, FOURNEL, S, LAMOUR, K, CHALOIN, O, FRISCH, B, BRIAND, J-P, MONTEIL, H, GUICHARD, G (2006). Mimicking helical antibacterial peptides with nonpeptidic folding oligomers. *Chem Biol*, 13, 531-538.

VIVES, E (2005). Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: "is the Trojan horse too wild to go only to Troy?". *J Control Release*, 109, 77-85.

VOLLMER, W, JORIS, B, CHARLIER, P, FOSTER, S (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 259-286.

VON EIFF, C, REINERT, R R, KRESKEN, M, BRAUERS, J, HAFNER, D, PETERS, G (2000). Nationwide German multicenter study on prevalence of antibiotic resistance in staphylococcal bloodstream isolates and comparative in vitro activities of quinupristin-dalfopristin. *J Clin Microbiol*, 38, 2819-2823.

WANN, E R, GURUSIDDAPPA, S, HOOK, M (2000). The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem*, 275, 13863-13871.

WARTH, A D, STROMINGER, J L (1969). Structure of the peptidoglycan of bacterial spores: occurrence of the lactam of muramic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 64, 528-535.

WAXMAN, D J, STROMINGER, J L (1983). Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem*, 52, 825-869.

WEINHARDT, V, CHEN, J H, EKMAN, A, MCDERMOTT, G, LE GROS, M A, LARABELL, C (2019). Imaging cell morphology and physiology using X-rays. *Biochem Soc Trans*, 47, 489-508.

WEISS, D, SCHNEIDER, G, NIEMANN, B, GUTTMANN, P, RUDOLPH, D, SCHMAHL, G (2000). Computed tomography of cryogenic biological specimens based on X-ray microscopic images. *Ultramicroscopy*, 84, 185-197.

WELLINGTON, E M H, BOXALL, A B A, CROSS, P, FEIL, E J, GAZE, W H, HAWKEY, P M, JOHNSON-ROLLINGS, A S, JONES, D L, LEE, N M, OTTEN, W, THOMAS, C M, WILLIAMS, A

P (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis*, 13, 155-165.

WENDER, P A, MITCHELL, D J, PATTABIRAMAN, K, PELKEY, E T, STEINMAN, L, ROTHBARD, J B (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13003-13008.

WHALEY, S G, BERKOW, E L, RYBAK, J M, NISHIMOTO, A T, BARKER, K S, ROGERS, P D (2017). Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Front Microbiol*, 7.

WHO (2010). Multidrug and extensive drug resistant tuberculosis: 2010 global report on surveillance and response. World Health Organization.

WHO (2014). Antimicrobial resistance: overview of global report surveillance. World Health Organization.

WHO (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization.

WHO (2017). Global tuberculosis report. World Health Organization.

WILEY, R A, RICH, D H (1993). Peptidomimetics derived from natural products. *Med Res Rev*, 13, 327-384.

WISPLINGHOFF, H, SEIFERT, H, TALLENT, S M, BISCHOFF, T, WENZEL, R P, EDMOND, M B (2003). Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. *Pediatr Infect Dis J*, 22, 686-691.

WITTMANN, V, PIETERS, R J (2013). Bridging lectin binding sites by multivalent carbohydrates. *Chem Soc Rev*, 42, 4492-4503.

WU, C W, KIRSHENBAUM, K, SANBORN, T J, PATCH, J A, HUANG, K, DILL, K A, ZUCKERMANN, R N, BARRON, A E (2003). Structural and spectroscopic studies of peptoid oligomers with  $\alpha$ -chiral aliphatic side chains. *J Am Chem Soc*, 125, 13525-13530.

WU, M, MAIER, E, BENZ, R, HANCOCK, R E (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.

YAMAMURA, H, MIYAGAWA, A, SUGIYAMA, H, MURATA, K, MABUTI, T, MITSUHASHI, R, HAGIWARA, T, NONAKA, M, TANIMOTO, K, TOMITA, H (2016). Rule of hydrophobicity/hydrophilicity balance in membrane-disrupting antimicrobial activity of polyalkylamino cyclodextrins synthesized via click chemistry. *ChemistrySelect*, 1, 469-472.

YANG, H, ZHANG, Y, YU, J, HUANG, Y, ZHANG, X-E, WEI, H (2014). Novel chimeric lysin with high-level antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 536-542.

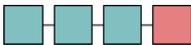
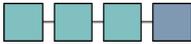
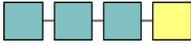
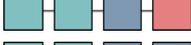
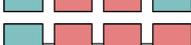
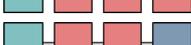
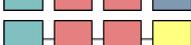
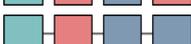
- YEUNG, R S M, PENNINGER, J M, KÜNDIG, T, KHOO, W, OHASHI, P S, KROEMER, G, MAK, T W (1996). Human CD4 and human major histocompatibility complex class II (DQ6) transgenic mice: supersensitivity to superantigen-induced septic shock. *Eur J Immunol*, 26, 1074-1082.
- ZAPOTOCZNA, M, MCCARTHY, H, RUDKIN, J K, O'GARA, J P, O'NEILL, E (2015). An essential role for coagulase in *Staphylococcus aureus* biofilm development reveals new therapeutic possibilities for device-related infections. *J Infect Dis*, 212, 1883-1893.
- ZASLOFF, M (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395.
- ZAVASCKI, A P, GOLDANI, L Z, LI, J, NATION, R L (2007). Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, 60, 1206-1215.
- ZHANG, L, DHILLON, P, YAN, H, FARMER, S, HANCOCK, R E (2000). Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 3317-3321.
- ZHU, Y, MOHAPATRA, S, WEISSHAAR, J C (2019). Rigidification of the *Escherichia coli* cytoplasm by the human antimicrobial peptide LL-37 revealed by superresolution fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 1017-1026.
- ZORKO, M, LANGEL, U (2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 529-545.
- ZOWAWI, H M, HARRIS, P N A, ROBERTS, M J, TAMBYAH, P A, SCHEMBRI, M A, PEZZANI, M D, WILLIAMSON, D A, PATERSON, D L (2015). The emerging threat of multidrug-resistant gram-negative bacteria in urology. *Nat Rev Urol*, 12, 570.
- ZUCKERMANN, R N, KERR, J M, KENT, S B H, MOOS, W H (1992). Efficient method for the preparation of peptoids [oligo(N-substituted glycines)] by submonomer solid-phase synthesis. *J Am Chem Soc*, 114, 10646-10647.



# Appendix

## a) Peptoidbibliothek 1

**Tabelle 22:** Peptoidnummer, Sequenz, Farbcode, Zahlencode, Molekulargewicht und Identifizierung der Peptide in Peptoidbibliothek 1.

Nr.	Sequenz <sup>a</sup>	Farbcode	Zahlencode	MW <sup>b</sup> g/mol	Peptoid vorhanden <sup>c</sup> (✓/×)
1	Nprg-Nprg-Nprg-Nprg		1 1 1 1	822,5	✓
2	Nprg-Nprg-Nprg-Npcb		1 1 1 2	908,5	×
3	Nprg-Nprg-Nprg-Mys		1 1 1 3	855,6	✓
4	Nprg-Nprg-Nprg-Nphe		1 1 1 4	874,5	✓
5	Nprg-Nprg-Npcb-Nprg		1 1 2 1	908,5	✓
6	Nprg-Nprg-Npcb-Npcb		1 1 2 2	994,4	✓
7	Nprg-Nprg-Npcb-Mys		1 1 2 3	941,5	×
8	Nprg-Nprg-Npcb-Nphe		1 1 2 4	960,5	✓
9	Nprg-Nprg-Mys-Nprg		1 1 3 1	855,6	✓
10	Nprg-Nprg-Mys-Npcb		1 1 3 2	941,5	✓
11	Nprg-Nprg-Mys-Mys		1 1 3 3	888,6	✓
12	Nprg-Nprg-Mys-Nphe		1 1 3 4	907,6	✓
13	Nprg-Nprg-Nphe-Nprg		1 1 4 1	874,5	✓
14	Nprg-Nprg-Nphe-Npcb		1 1 4 2	960,5	✓
15	Nprg-Nprg-Nphe-Mys		1 1 4 3	907,6	✓
16	Nprg-Nprg-Nphe-Nphe		1 1 4 4	926,6	×
17	Nprg-Npcb-Nprg-Nprg		1 2 1 1	908,5	✓
18	Nprg-Npcb-Nprg-Npcb		1 2 1 2	994,5	✓
19	Nprg-Npcb-Nprg-Mys		1 2 1 3	941,5	✓
20	Nprg-Npcb-Nprg-Nphe		1 2 1 4	960,5	✓
21	Nprg-Npcb-Npcb-Nprg		1 2 2 1	994,5	✓
22	Nprg-Npcb-Npcb-Npcb		1 2 2 2	1080,5	✓
23	Nprg-Npcb-Npcb-Mys		1 2 2 3	1029,5	✓
24	Nprg-Npcb-Npcb-Nphe		1 2 2 4	1046,5	✓
25	Nprg-Npcb-Mys-Nprg		1 2 3 1	941,5	✓
26	Nprg-Npcb-Mys-Npcb		1 2 3 2	1027,5	✓
27	Nprg-Npcb-Mys-Mys		1 2 3 3	974,6	✓

## Appendix

Nr.	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup>	Peptoid vorhanden <sup>c</sup>
				g/mol	(✓/×)
28	<i>Nprg-Npcb-Mys-Nphe</i>		1 2 3 4	993,6	✓
29	<i>Nprg-Npcb-Nphe-Nprg</i>		1 2 4 1	960,5	✓
30	<i>Nprg-Npcb-Nphe-Npcb</i>		1 2 4 2	1046,5	✓
31	<i>Nprg-Npcb-Nphe-Mys</i>		1 2 4 3	993,6	✓
32	<i>Nprg-Npcb-Nphe-Nphe</i>		1 2 4 4	1012,5	×
33	<i>Nprg-Mys-Nprg-Nprg</i>		1 3 1 1	855,5	✓
34	<i>Nprg-Mys-Nprg-Npcb</i>		1 3 1 2	941,5	×
35	<i>Nprg-Mys-Nprg-Mys</i>		1 3 1 3	888,6	✓
36	<i>Nprg-Mys-Nprg-Nphe</i>		1 3 1 4	907,6	✓
37	<i>Nprg-Mys-Npcb-Nprg</i>		1 3 2 1	941,53	✓
38	<i>Nprg-Mys-Npcb-Npcb</i>		1 3 2 2	1027,5	✓
39	<i>Nprg-Mys-Npcb-Mys</i>		1 3 2 3	974,6	✓
40	<i>Nprg-Mys-Npcb-Nphe</i>		1 3 2 4	993,6	✓
10	<i>Nprg-Mys-Mys-Nprg</i>		1 3 3 1	888,6	✓
42	<i>Nprg-Mys-Mys-Npcb</i>		1 3 3 2	974,6	✓
43	<i>Nprg-Mys-Mys-Mys</i>		1 3 3 3	921,6	×
44	<i>Nprg-Mys-Mys-Nphe</i>		1 3 3 4	940,6	✓
45	<i>Nprg-Mys-Nphe-Nprg</i>		1 3 4 1	907,6	✓
46	<i>Nprg-Mys-Nphe-Npcb</i>		1 3 4 2	993,6	✓
47	<i>Nprg-Mys-Nphe-Mys</i>		1 3 4 3	940,6	✓
48	<i>Nprg-Mys-Nphe-Nphe</i>		1 3 4 4	959,6	✓
49	<i>Nprg-Nphe-Nprg-Nprg</i>		1 4 1 1	874,5	✓
50	<i>Nprg-Nphe-Nprg-Npcb</i>		1 4 1 2	960,5	✓
51	<i>Nprg-Nphe-Nprg-Mys</i>		1 4 1 3	907,6	✓
52	<i>Nprg-Nphe-Nprg-Nphe</i>		1 4 1 4	926,6	✓
53	<i>Nprg-Nphe-Npcb-Nprg</i>		1 4 2 1	960,5	×
54	<i>Nprg-Nphe-Npcb-Npcb</i>		1 4 2 2	1046,5	✓
55	<i>Nprg-Nphe-Npcb-Mys</i>		1 4 2 3	993,6	✓
56	<i>Nprg-Nphe-Npcb-Nphe</i>		1 4 2 4	1012,5	✓
57	<i>Nprg-Nphe-Mys-Nprg</i>		1 4 3 1	907,6	×
58	<i>Nprg-Nphe-Mys-Npcb</i>		1 4 3 2	993,6	✓
59	<i>Nprg-Nphe-Mys-Mys</i>		1 4 3 3	940,6	✓
60	<i>Nprg-Nphe-Mys-Nphe</i>		1 4 3 4	959,6	✓
61	<i>Nprg-Nphe-Nphe-Nprg</i>		1 4 4 1	926,6	✓
62	<i>Nprg-Nphe-Nphe-Npcb</i>		1 4 4 2	1012,5	✓

Nr.	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup>	Peptoid vorhanden <sup>c</sup>
				g/mol	(✓/×)
63	<i>Nprg-Nphe-Nphe-Mys</i>		1 4 4 3	959,6	✓
64	<i>Nprg-Nphe-Nphe-Nphe</i>		1 4 4 4	978,6	✓
65	<i>Npcb-Nprg-Nprg-Nprg</i>		2 1 1 1	908,5	✓
66	<i>Npcb-Nprg-Nprg-Npcb</i>		2 1 1 2	994,5	✓
67	<i>Npcb-Nprg-Nprg-Mys</i>		2 1 1 3	941,5	✓
68	<i>Npcb-Nprg-Nprg-Nphe</i>		2 1 1 4	960,5	✓
69	<i>Npcb-Nprg-Npcb-Nprg</i>		2 1 2 1	994,5	✓
70	<i>Npcb-Nprg-Npcb-Npcb</i>		2 1 2 2	1080,5	✓
71	<i>Npcb-Nprg-Npcb-Mys</i>		2 1 2 3	1027,5	✓
72	<i>Npcb-Nprg-Npcb-Nphe</i>		2 1 2 4	1046,5	✓
73	<i>Npcb-Nprg-Mys-Nprg</i>		2 1 3 1	941,5	✓
74	<i>Npcb-Nprg-Mys-Npcb</i>		2 1 3 2	1027,5	✓
75	<i>Npcb-Nprg-Mys-Mys</i>		2 1 3 3	974,6	✓
76	<i>Npcb-Nprg-Mys-Nphe</i>		2 1 3 4	993,6	✓
77	<i>Npcb-Nprg-Nphe-Nprg</i>		2 1 4 1	960,5	✓
78	<i>Npcb-Nprg-Nphe-Npcb</i>		2 1 4 2	1046,5	×
79	<i>Npcb-Nprg-Nphe-Mys</i>		2 1 4 3	993,6	✓
80	<i>Npcb-Nprg-Nphe-Nphe</i>		2 1 4 4	1012,5	✓
81	<i>Npcb-Npcb-Nprg-Nprg</i>		2 2 1 1	994,5	✓
82	<i>Npcb-Npcb-Nprg-Npcb</i>		2 2 1 2	1080,5	✓
83	<i>Npcb-Npcb-Nprg-Mys</i>		2 2 1 3	1027,5	✓
84	<i>Npcb-Npcb-Nprg-Nphe</i>		2 2 1 4	1046,5	✓
85	<i>Npcb-Npcb-Npcb-Nprg</i>		2 2 2 1	1080,5	✓
86	<i>Npcb-Npcb-Npcb-Npcb</i>		2 2 2 2	1166,5	✓
87	<i>Npcb-Npcb-Npcb-Mys</i>		2 2 2 3	1113,5	✓
88	<i>Npcb-Npcb-Npcb-Nphe</i>		2 2 2 4	1132,5	✓
89	<i>Npcb-Npcb-Mys-Nprg</i>		2 2 3 1	1027,5	✓
90	<i>Npcb-Npcb-Mys-Npcb</i>		2 2 3 2	1113,5	✓
91	<i>Npcb-Npcb-Mys-Mys</i>		2 2 3 3	1060,6	✓
92	<i>Npcb-Npcb-Mys-Nphe</i>		2 2 3 4	1079,6	✓
93	<i>Npcb-Npcb-Nphe-Nprg</i>		2 2 4 1	1046,5	✓
94	<i>Npcb-Npcb-Nphe-Npcb</i>		2 2 4 2	1132,5	✓
95	<i>Npcb-Npcb-Nphe-Mys</i>		2 2 4 3	1079,5	✓
96	<i>Npcb-Npcb-Nphe-Nphe</i>		2 2 4 4	1098,5	✓
97	<i>Npcb-Mys-Nprg-Nprg</i>		2 3 1 1	941,5	×

## Appendix

Nr.	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup>	Peptoid vorhanden <sup>c</sup>
				g/mol	(✓/×)
98	<i>Npcb-Mys-Nprg-Npcb</i>		2 3 1 2	1027,5	✓
99	<i>Npcb-Mys-Nprg-Mys</i>		2 3 1 3	974,6	✓
100	<i>Npcb-Mys-Nprg-Nphe</i>		2 3 1 4	993,6	✓
101	<i>Npcb-Mys-Npcb-Nprg</i>		2 3 2 1	1027,5	✓
102	<i>Npcb-Mys-Npcb-Npcb</i>		2 3 2 2	1113,5	✓
103	<i>Npcb-Mys-Npcb-Mys</i>		2 3 2 3	1060,6	✓
104	<i>Npcb-Mys-Npcb-Nphe</i>		2 3 2 4	1079,6	✓
105	<i>Npcb-Mys-Mys-Nprg</i>		2 3 3 1	974,6	✓
106	<i>Npcb-Mys-Mys-Npcb</i>		2 3 3 2	1060,6	✓
107	<i>Npcb-Mys-Mys-Mys</i>		2 3 3 3	1007,6	✓
108	<i>Npcb-Mys-Mys-Nphe</i>		2 3 3 4	1026,6	✓
109	<i>Npcb-Mys-Nphe-Nprg</i>		2 3 4 1	993,6	✓
110	<i>Npcb-Mys-Nphe-Npcb</i>		2 3 4 2	1079,6	✓
111	<i>Npcb-Mys-Nphe-Mys</i>		2 3 4 3	1026,6	✓
112	<i>Npcb-Mys-Nphe-Nphe</i>		2 3 4 4	1045,6	✓
113	<i>Npcb-Nphe-Nprg-Nprg</i>		2 4 1 1	960,5	✓
114	<i>Npcb-Nphe-Nprg-Npcb</i>		2 4 1 2	1046,5	✓
115	<i>Npcb-Nphe-Nprg-Mys</i>		2 4 1 3	993,6	✓
116	<i>Npcb-Nphe-Nprg-Nphe</i>		2 4 1 4	1012,5	✓
117	<i>Npcb-Nphe-Npcb-Nprg</i>		2 4 2 1	1046,5	✓
118	<i>Npcb-Nphe-Npcb-Npcb</i>		2 4 2 2	1132,5	✓
119	<i>Npcb-Nphe-Npcb-Mys</i>		2 4 2 3	1079,6	✓
120	<i>Npcb-Nphe-Npcb-Nphe</i>		2 4 2 4	1098,5	✓
121	<i>Npcb-Nphe-Mys-Nprg</i>		2 4 3 1	993,5	✓
122	<i>Npcb-Nphe-Mys-Npcb</i>		2 4 3 2	1079,6	✓
123	<i>Npcb-Nphe-Mys-Mys</i>		2 4 3 3	1026,6	✓
124	<i>Npcb-Nphe-Mys-Nphe</i>		2 4 3 4	1045,6	✓
125	<i>Npcb-Nphe-Nphe-Nprg</i>		2 4 4 1	1012,5	✓
126	<i>Npcb-Nphe-Nphe-Npcb</i>		2 4 4 2	1098,5	✓
127	<i>Npcb-Nphe-Nphe-Mys</i>		2 4 4 3	1045,6	✓
128	<i>Npcb-Nphe-Nphe-Nphe</i>		2 4 4 4	1064,6	✓
129	<i>Mys-Nprg-Nprg-Nprg</i>		3 1 1 1	855,5	✓
130	<i>Mys-Nprg-Nprg-Npcb</i>		3 1 1 2	941,5	✓
131	<i>Mys-Nprg-Nprg-Mys</i>		3 1 1 3	888,6	✓
132	<i>Mys-Nprg-Nprg-Nphe</i>		3 1 1 4	907,6	✓

Nr.	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup>	Peptoid vorhanden <sup>c</sup>
				g/mol	(✓/×)
133	Mys-Nprg-Npcb-Nprg		3 1 2 1	941,5	✓
134	Mys-Nprg-Npcb-Npcb		3 1 2 2	1027,5	×
135	Mys-Nprg-Npcb-Mys		3 1 2 3	974,6	✓
136	Mys-Nprg-Npcb-Nphe		3 1 2 4	993,6	✓
137	Mys-Nprg-Mys-Nprg		3 1 3 1	888,6	✓
138	Mys-Nprg-Mys-Npcb		3 1 3 2	974,6	✓
139	Mys-Nprg-Mys-Mys		3 1 3 3	921,6	✓
140	Mys-Nprg-Mys-Nphe		3 1 3 4	940,6	✓
141	Mys-Nprg-Nphe-Nprg		3 1 4 1	907,6	✓
142	Mys-Nprg-Nphe-Npcb		3 1 4 2	993,6	✓
143	Mys-Nprg-Nphe-Mys		3 1 4 3	940,6	×
144	Mys-Nprg-Nphe-Nphe		3 1 4 4	959,6	✓
145	Mys-Npcb-Nprg-Nprg		3 2 1 1	941,5	✓
146	Mys-Npcb-Nprg-Npcb		3 2 1 2	1027,5	✓
147	Mys-Npcb-Nprg-Mys		3 2 1 3	974,6	✓
148	Mys-Npcb-Nprg-Nphe		3 2 1 4	993,6	✓
149	Mys-Npcb-Npcb-Nprg		3 2 2 1	1027,5	✓
150	Mys-Npcb-Npcb-Npcb		3 2 2 2	1113,5	✓
151	Mys-Npcb-Npcb-Mys		3 2 2 3	1060,6	✓
152	Mys-Npcb-Npcb-Nphe		3 2 2 4	1079,5	✓
153	Mys-Npcb-Mys-Nprg		3 2 3 1	974,6	✓
154	Mys-Npcb-Mys-Npcb		3 2 3 2	1060,5	✓
155	Mys-Npcb-Mys-Mys		3 2 3 3	1007,6	✓
156	Mys-Npcb-Mys-Nphe		3 2 3 4	1026,6	✓
157	Mys-Npcb-Nphe-Nprg		3 2 4 1	993,6	✓
158	Mys-Npcb-Nphe-Npcb		3 2 4 2	1079,6	✓
159	Mys-Npcb-Nphe-Mys		3 2 4 3	1026,6	✓
160	Mys-Npcb-Nphe-Nphe		3 2 4 4	1045,6	✓
161	Mys-Mys-Nprg-Nprg		3 3 1 1	888,6	✓
162	Mys-Mys-Nprg-Npcb		3 3 1 2	997,5	×
163	Mys-Mys-Nprg-Mys		3 3 1 3	921,6	✓
164	Mys-Mys-Nprg-Nphe		3 3 1 4	940,6	×
165	Mys-Mys-Npcb-Nprg		3 3 2 1	974,6	✓
166	Mys-Mys-Npcb-Npcb		3 3 2 2	1060,57	✓
167	Mys-Mys-Npcb-Mys		3 3 2 3	1007,6	✓

## Appendix

Nr.	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup>	Peptoid vorhanden <sup>c</sup>
				g/mol	(✓/×)
168	Mys-Mys-Npcb-Nphe		3 3 2 4	1026,6	✓
169	Mys-Mys-Mys-Nprg		3 3 3 1	921,6	✓
170	Mys-Mys-Mys-Npcb		3 3 3 2	1007,6	✓
171	Mys-Mys-Mys-Mys		3 3 3 3	954,7	✓
172	Mys-Mys-Mys-Nphe		3 3 3 4	973,7	✓
173	Mys-Mys-Nphe-Nprg		3 3 4 1	940,6	×
174	Mys-Mys-Nphe-Npcb		3 3 4 2	1026,6	✓
175	Mys-Mys-Nphe-Mys		3 3 4 3	973,7	✓
176	Mys-Mys-Nphe-Nphe		3 3 4 4	992,7	✓
177	Mys-Nphe-Nprg-Nprg		3 4 1 1	907,6	✓
178	Mys-Nphe-Nprg-Npcb		3 4 1 2	993,6	✓
179	Mys-Nphe-Nprg-Mys		3 4 1 3	940,6	✓
180	Mys-Nphe-Nprg-Nphe		3 4 1 4	959,6	✓
181	Mys-Nphe-Npcb-Nprg		3 4 2 1	993,6	✓
182	Mys-Nphe-Npcb-Npcb		3 4 2 2	1079,6	✓
183	Mys-Nphe-Npcb-Mys		3 4 2 3	1026,6	✓
184	Mys-Nphe-Npcb-Nphe		3 4 2 4	1045,6	✓
185	Mys-Nphe-Mys-Nprg		3 4 3 1	940,6	×
186	Mys-Nphe-Mys-Npcb		3 4 3 2	1026,6	✓
187	Mys-Nphe-Mys-Mys		3 4 3 3	973,7	✓
188	Mys-Nphe-Mys-Nphe		3 4 3 4	992,7	✓
189	Mys-Nphe-Nphe-Nprg		3 4 4 1	959,6	✓
190	Mys-Nphe-Nphe-Npcb		3 4 4 2	1045,6	✓
191	Mys-Nphe-Nphe-Mys		3 4 4 3	992,7	✓
192	Mys-Nphe-Nphe-Nphe		3 4 4 4	1011,6	✓
193	Nphe-Nprg-Nprg-Nprg		4 1 1 1	874,5	✓
194	Nphe-Nprg-Nprg-Npcb		4 1 1 2	960,5	✓
195	Nphe-Nprg-Nprg-Mys		4 1 1 3	907,6	✓
196	Nphe-Nprg-Nprg-Nphe		4 1 1 4	926,6	✓
197	Nphe-Nprg-Npcb-Nprg		4 1 2 1	960,5	✓
198	Nphe-Nprg-Npcb-Npcb		4 1 2 2	1046,5	✓
199	Nphe-Nprg-Npcb-Mys		4 1 2 3	993,6	✓
200	Nphe-Nprg-Npcb-Nphe		4 1 2 4	1012,6	✓
201	Nphe-Nprg-Mys-Nprg		4 1 3 1	907,6	✓
202	Nphe-Nprg-Mys-Npcb		4 1 3 2	993,6	✓

Nr.	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup>	Peptoid vorhanden <sup>c</sup>
				g/mol	(✓/×)
203	<i>Nphe-Nprg-Mys-Mys</i>		4 1 3 3	940,6	✓
204	<i>Nphe-Nprg-Mys-Nphe</i>		4 1 3 4	959,6	✓
205	<i>Nphe-Nprg-Nphe-Nprg</i>		4 1 4 1	926,6	✓
206	<i>Nphe-Nprg-Nphe-Npcb</i>		4 1 4 2	1012,5	✓
207	<i>Nphe-Nprg-Nphe-Mys</i>		4 1 4 3	959,6	✓
208	<i>Nphe-Nprg-Nphe-Nphe</i>		4 1 4 4	978,6	✓
209	<i>Nphe-Npcb-Nprg-Nprg</i>		4 2 1 1	960,5	×
210	<i>Nphe-Npcb-Nprg-Npcb</i>		4 2 1 2	1046,5	✓
211	<i>Nphe-Npcb-Nprg-Mys</i>		4 2 1 3	993,6	✓
212	<i>Nphe-Npcb-Nprg-Nphe</i>		4 2 1 4	1012,5	✓
213	<i>Nphe-Npcb-Npcb-Nprg</i>		4 2 2 1	1046,5	×
214	<i>Nphe-Npcb-Npcb-Npcb</i>		4 2 2 2	1132,5	✓
215	<i>Nphe-Npcb-Npcb-Mys</i>		4 2 2 3	1079,6	✓
216	<i>Nphe-Npcb-Npcb-Nphe</i>		4 2 2 4	1098,5	✓
217	<i>Nphe-Npcb-Mys-Nprg</i>		4 2 3 1	993,6	✓
218	<i>Nphe-Npcb-Mys-Npcb</i>		4 2 3 2	1079,6	✓
219	<i>Nphe-Npcb-Mys-Mys</i>		4 2 3 3	1026,6	✓
220	<i>Nphe-Npcb-Mys-Nphe</i>		4 2 3 4	1045,6	✓
221	<i>Nphe-Npcb-Nphe-Nprg</i>		4 2 4 1	1012,5	✓
222	<i>Nphe-Npcb-Nphe-Npcb</i>		4 2 4 2	1098,5	×
223	<i>Nphe-Npcb-Nphe-Mys</i>		4 2 4 3	1045,6	✓
224	<i>Nphe-Npcb-Nphe-Nphe</i>		4 2 4 4	1064,6	✓
225	<i>Nphe-Mys-Nprg-Nprg</i>		4 3 1 1	907,6	✓
226	<i>Nphe-Mys-Nprg-Npcb</i>		4 3 1 2	993,56	✓
227	<i>Nphe-Mys-Nprg-Mys</i>		4 3 1 3	940,6	✓
228	<i>Nphe-Mys-Nprg-Nphe</i>		4 3 1 4	959,6	✓
229	<i>Nphe-Mys-Npcb-Nprg</i>		4 3 2 1	993,6	✓
230	<i>Nphe-Mys-Npcb-Npcb</i>		4 3 2 2	1079,6	✓
231	<i>Nphe-Mys-Npcb-Mys</i>		4 3 2 3	1026,6	✓
232	<i>Nphe-Mys-Npcb-Nphe</i>		4 3 2 4	1045,6	✓
233	<i>Nphe-Mys-Mys-Nprg</i>		4 3 3 1	940,6	✓
234	<i>Nphe-Mys-Mys-Npcb</i>		4 3 3 2	1026,6	✓
235	<i>Nphe-Mys-Mys-Mys</i>		4 3 3 3	973,7	✓
236	<i>Nphe-Mys-Mys-Nphe</i>		4 3 3 4	992,6	✓
237	<i>Nphe-Mys-Nphe-Nprg</i>		4 3 4 1	959,6	✓

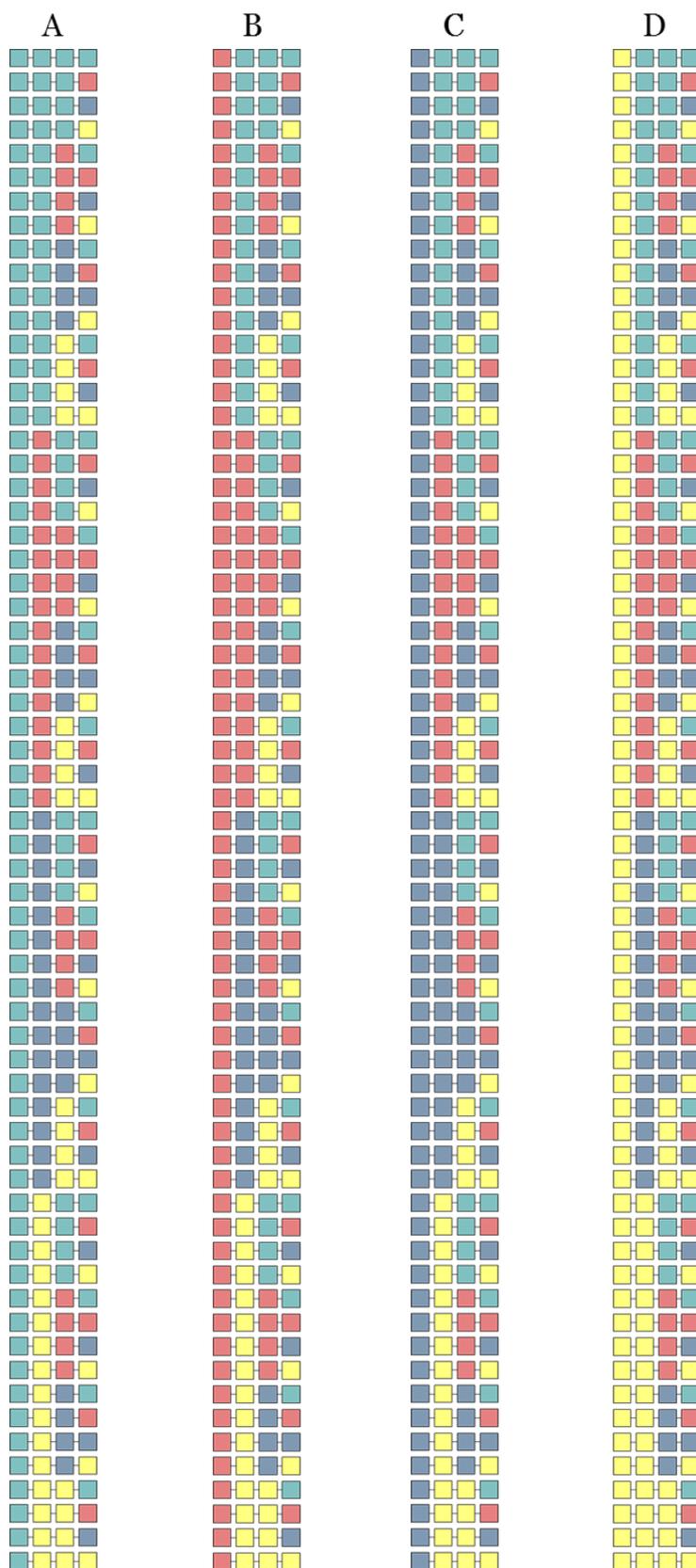
## Appendix

Nr.	Sequenz <sup>a</sup>	Farb- code	Zahlen- code	MW <sup>b</sup>	Peptoid vorhanden <sup>c</sup>
				g/mol	(✓/×)
238	<i>Nphe-Mys-Nphe-Npcb</i>		4 3 4 2	1045,6	✓
239	<i>Nphe-Mys-Nphe-Mys</i>		4 3 4 3	992,6	✓
240	<i>Nphe-Mys-Nphe-Nphe</i>		4 3 4 4	1011,6	✓
241	<i>Nphe-Nphe-Nprg-Nprg</i>		4 4 1 1	926,6	✓
242	<i>Nphe-Nphe-Nprg-Npcb</i>		4 4 1 2	1012,5	✓
243	<i>Nphe-Nphe-Nprg-Mys</i>		4 4 1 3	959,6	✓
244	<i>Nphe-Nphe-Nprg-Nphe</i>		4 4 1 4	978,6	✓
245	<i>Nphe-Nphe-Npcb-Nprg</i>		4 4 2 1	1012,5	✓
246	<i>Nphe-Nphe-Npcb-Npcb</i>		4 4 2 2	1098,5	✓
247	<i>Nphe-Nphe-Npcb-Mys</i>		4 4 2 3	1045,6	✓
248	<i>Nphe-Nphe-Npcb-Nphe</i>		4 4 2 4	1064,6	✓
249	<i>Nphe-Nphe-Mys-Nprg</i>		4 4 3 1	959,6	✓
250	<i>Nphe-Nphe-Mys-Npcb</i>		4 4 3 2	1045,6	✓
251	<i>Nphe-Nphe-Mys-Mys</i>		4 4 3 3	992,7	✓
252	<i>Nphe-Nphe-Mys-Nphe</i>		4 4 3 4	1011,6	✓
253	<i>Nphe-Nphe-Nphe-Nprg</i>		4 4 4 1	978,6	✓
254	<i>Nphe-Nphe-Nphe-Npcb</i>		4 4 4 2	1064,5	×
255	<i>Nphe-Nphe-Nphe-Mys</i>		4 4 4 3	1011,6	✓
256	<i>Nphe-Nphe-Nphe-Nphe</i>		4 4 4 4	1030,6	✓

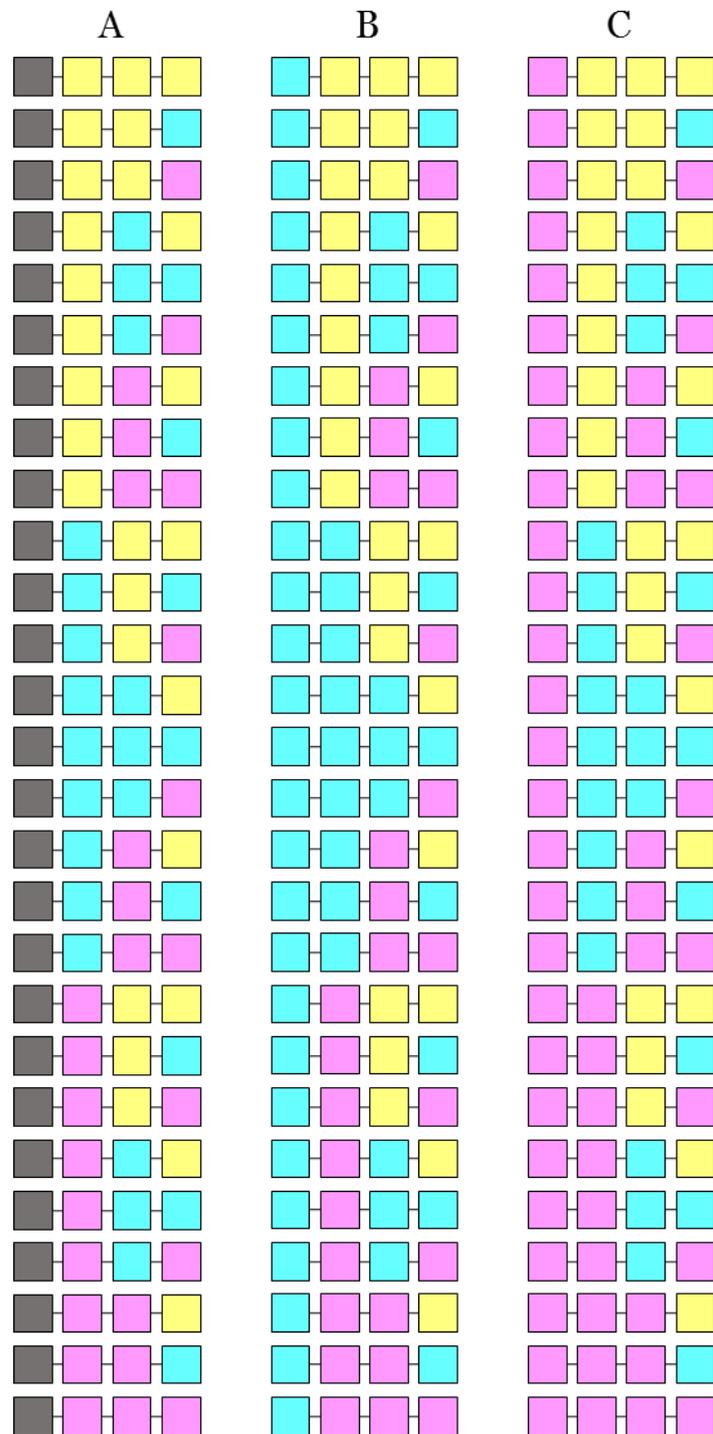
<sup>a</sup> Struktur, Farb- und Zahlencode in Tabelle 23.

<sup>b</sup> MW, Molekulargewicht.

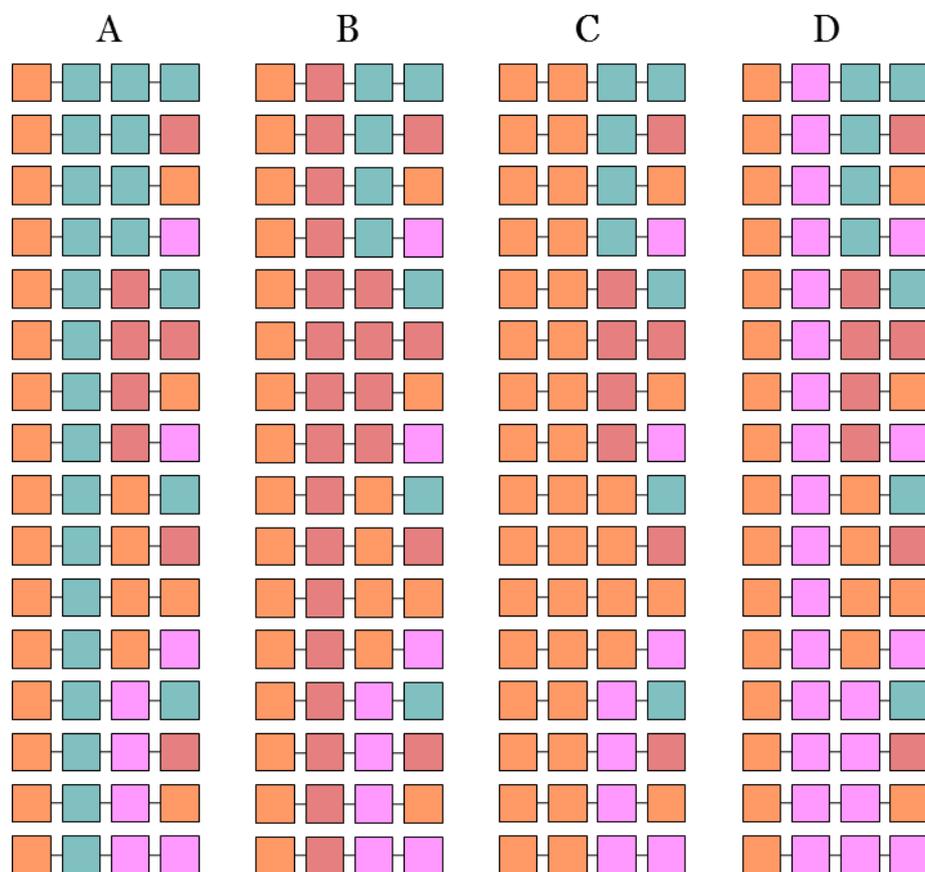
<sup>c</sup> ✓ Peptoid vorhanden, × Peptoid nicht vorhanden.

**b) Aufschlüsselung Heatmap**Peptoidbibliothek 1**Abbildung 45:** Reihenfolge der Peptide aus Peptoidbibliothek 1 für die in Abbildung 19 dargestellte Heatmap.

Peptoidbibliothek 2



**Abbildung 46:** Reihenfolge der Peptide aus Peptoidbibliothek 2 für die in Abbildung 19 dargestellte Heatmap.

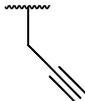
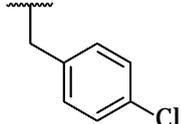
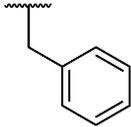
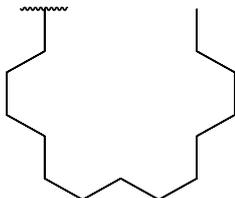
Peptoidbibliothek 3

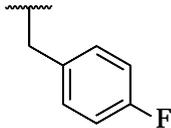
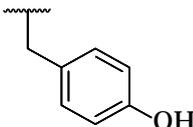
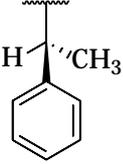
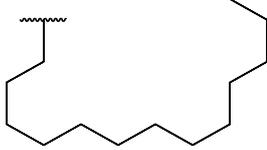
**Abbildung 47:** Reihenfolge der Peptide aus Peptoidbibliothek 3 für die in Abbildung 19 dargestellte Heatmap.

## c) Monomere

Verwendete Monomere für die erstellten Peptoidbibliotheken.

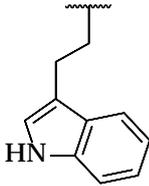
**Tabelle 23:** Zahlencode, Name, Abkürzung, Farbcode, Kategorie und Struktur sowie Molekulargewicht der verwendeten Monomere.

Zahlen- code	Name	Abkürzung	Farb- code	Ka- tegorie	Struktur
1	<i>N</i> -(2-prop-2-yn-1-yl)glycin	<i>N</i> prg		Klein	 MW 39,06 g/mol
2	<i>N</i> -(4-chlorbenzyl)glycin	<i>N</i> pcb		Aromat	 MW 125,58 g/mol
3	<i>N</i> -(4-aminobutyl)glycin	<i>N</i> lys		Lipophil	 MW 73,14 g/mol
4	<i>N</i> -(benzyl)glycin	<i>N</i> phe		Aromat	 MW 91,13 g/mol
5	<i>N</i> -(tetradecyl)glycin	<i>N</i> tetradec		Lipophil	 MW 197,39 g/mol

Zahlen- code	Name	Abkürzung	Farb- code	Ka- tegorie	Struktur
6	<i>N</i> -(4-fluorobenzyl)glycin	<i>N</i> pfb		Aromat	 MW 109,12 g/mol
7	<i>N</i> -(4-hydroxybenzyl)glycin	<i>N</i> phb		Aromat	 MW 107,13 g/mol
8	<i>N</i> -(hexyl)glycin	<i>N</i> he		Lipophil	 MW 85,17 g/mol
9	<i>N</i> -( <i>S</i> )-(1-phenylethyl)glycine	<i>N</i> spe		Aromat	 MW 105,16 g/mol
10	<i>N</i> -(1-methylpropyl)glycin	<i>N</i> ile		Klein	 MW 57,12 g/mol
11	<i>N</i> -(tridecyl)glycin	<i>N</i> tridec		Lipophil	 MW 183,36 g/mol

## Appendix

---

Zahlen- code	Name	Abkürzung	Farb- code	Ka- tegorie	Struktur
12	<i>N</i> -(2-indolethyl)glycin	<i>N</i> trp		Aromat	 MW 144,20 g/mol

---

**b) ORN 178 und ORN 208**

nach (Harris et al. 2001)

**Tabelle 24:** Bakterien, Phagen und Plasmide, die für die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität der Nanosheets verwendet wurden.

	Beschreibung	Referenz
<b><i>E. coli</i></b>		
ORN 115	<i>thr-1 leuB thi-1 D(argF-lac) U169 xyl-7 ara-13 mtl-2 gal-6 rpsL tonA2 supE44 pilG1</i> lr Pill1 (zeigt keine Phasenvariation der Piliation)	(Spears et al. 1986)
ORN 174	<i>thr leu proA2 lacY1 galK his argE rpsL supE mtl xyl recBC sbcB tetR</i> (inseriert wurde ca. 200 bp am Ende von <i>fimH</i> ) Pill1	(Russell und Orndorff 1992)
ORN 178 <sup>a</sup>	ORN115 bis auf <i>tetR</i> inseriert ca. 200 bp am Ende von <i>fimH</i> , Pill1 <sup>+</sup>	(Russell und Orndorff 1992)
ORN 207	ORN174 bis auf <i>fimH304::kan</i>	Lineare Transformation von ORN174 mit <i>EcoRI</i> -verdautem pORN164
ORN 208 <sup>a</sup>	ORN115 bis auf <i>fimH304::kan</i> mit benachbartem <i>tetR</i> , Nal <sup>r</sup>	P1 Transduktion durch ORN207 zu ORN115 und Selektion durch Nalidixinsäureresistenz
<b>Bakteriophage</b>		
P1	<i>vir</i>	Laborbestand
<b>Plasmid</b>		
pORN164	pORN304 <i>fimH304::kan</i> , hat ein <i>kan</i> Gen von Tn5 inseriert in die <i>XhoI</i> Seite	Kan cassette inseriert in die <i>XhoI</i> Seite von pORN304 (Hamrick et al. 2000)

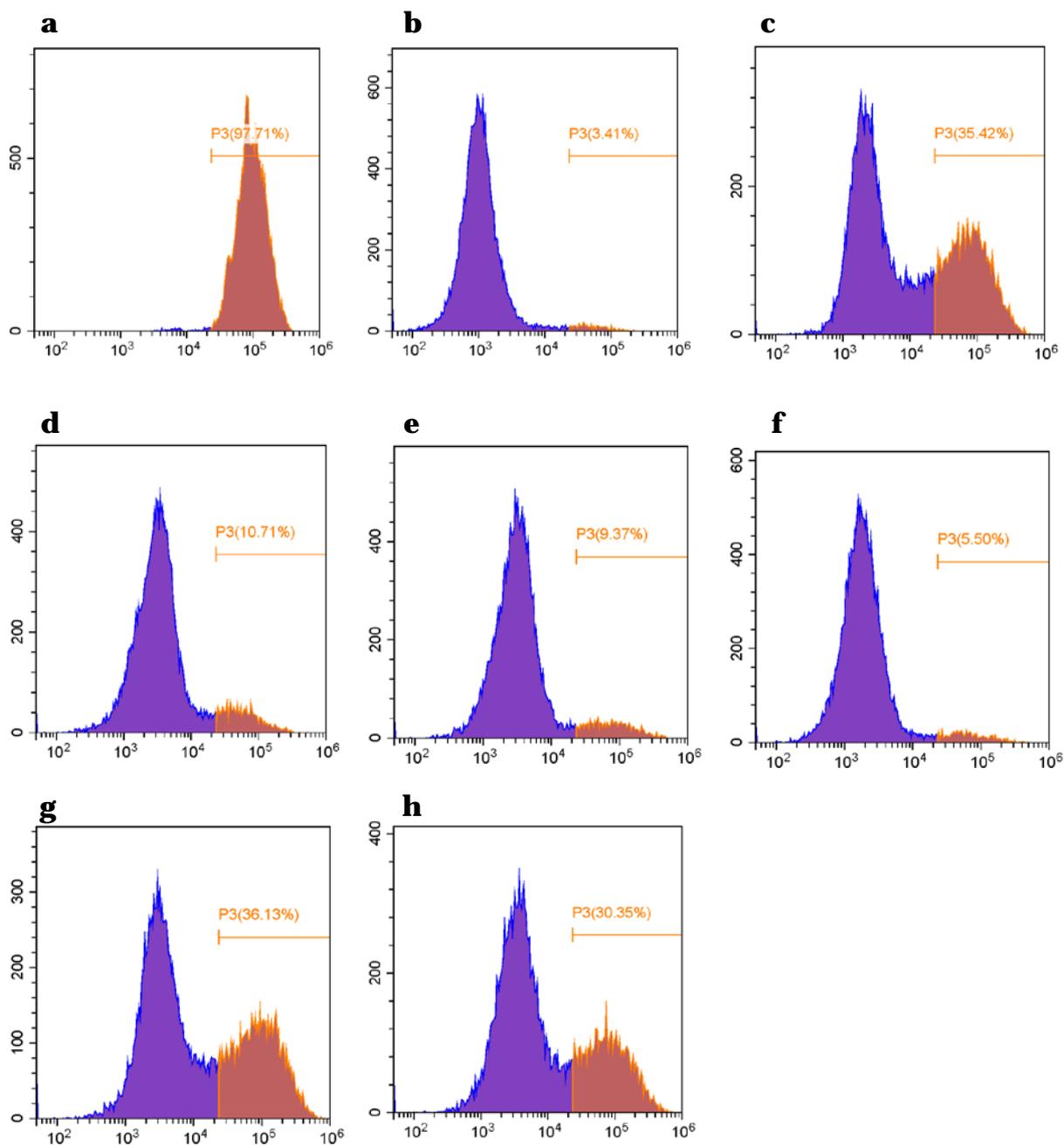
<sup>a</sup>Zur Verfügung gestellt von Dr. Behzad Rad, LBNL, Berkeley, USA.

**e) Antimikrobiell aktive Peptide gegen *S. aureus* ATCC 29737****Tabelle 25:** Peptoidnummer, Molekulargewicht und Sequenz antimikrobiell aktiver Peptide gegen *S. aureus* ATCC 29737.

Nr.	MW <sup>a</sup>	Sequenz	MHK <sub>90</sub> <sup>b</sup> <i>S. aureus</i> ATCC 29737 [μM]
<b>Peptoidbibliothek 1<sup>c</sup></b>			
54	1046	NH <sub>2</sub> -Nprg-Nphe-Npcb-Npcb-RhodB	6,3
72	1046	NH <sub>2</sub> -Npcb-Nprg-Npcb-Nphe-RhodB	6,3
198	1046	NH <sub>2</sub> -Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-RhodB	6,3
200	1012	NH <sub>2</sub> -Nphe-Nprg-Npcb-Nphe-RhodB	6,3
<b>Peptoidbibliothek 2<sup>d</sup></b>			
293	1067	NH <sub>2</sub> -Npfb-Npfb-Nphe-Nphe-RhodB	1,6
297	1103	NH <sub>2</sub> -Npfb-Npfb-Npfb-Npfb-RhodB	1,6
321	1083	NH <sub>2</sub> -Nphb-Npfb-Nphe-Npfb-RhodB	1,6/0,8
322	1081	NH <sub>2</sub> -Nphb-Npfb-Nphe-Nphb-RhodB	6,3/3,1
324	1101	NH <sub>2</sub> -Nphb-Npfb-Npfb-Npfb-RhodB	1,6
332	1081	NH <sub>2</sub> -Nphb-Nphb-Npfb-Nphe-RhodB	1,6/0,8
<b>Peptoidbibliothek 3<sup>e</sup></b>			
360	1088	NH <sub>2</sub> -Mhe-Npcb-Npcb-Mhe-RhodB	3,1
361	1101	NH <sub>2</sub> -Mhe-Npcb-Npcb-Nphb-RhodB	3,1
374	1081	NH <sub>2</sub> -Mhe-Mhe-Npcb-Nprg-RhodB	1,6
378	951	NH <sub>2</sub> -Mhe-Mhe-Mhe-Nprg-RhodB	1,6
<b>Peptoidbibliothek Oktamere<sup>f</sup></b>			
414	1654	NH <sub>2</sub> -Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-Nphe-Nprg-Npcb-Npcb-H	3,1
415	1585	NH <sub>2</sub> -Nphe-Nprg-Npcb-Nphe-Nphe-Nprg-Npcb-Nphe-H	3,1
<b>Peptoidbibliothek Pentamer, Nonamere, Undekamere, Dodekamere<sup>g</sup></b>			
420	1477	NH <sub>2</sub> -Nphe-Ntrp-Mys-Ntrp-Ntrp-Mys-Mys-Ntrp-Mys-H	5
424	1819	NH <sub>2</sub> -(Nspe-Nspe-NLys) <sub>4</sub> -H	1

<sup>a</sup> MW, Molekulargewicht.<sup>b</sup> MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).<sup>c</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 22.<sup>d</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 1.<sup>e</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 2.<sup>f</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 3.<sup>g</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 4.

## f) Histogramme Durchflusszytometrie



**Abbildung 48:** Gating-Strategie von den gemessenen Durchflusszytometrie-Histogrammen. *S. aureus* ATCC 29737-Kulturen wurden 2 Stunden mit SYTOX Green Fluoreszenzfarbstoff und 35% Ethanol inkubiert (a), keine Behandlung (b), Peptoid 198 (c), Peptoid 200 (d), Peptoid 321 (e), Peptoid 322 (f), Peptoid 374 (g) und Peptoid 378 (h).

**g) Octanol-Wasser Koeffizient****Tabelle 26:** Octanol-Wasser Koeffizient von antimikrobielle aktiven und nicht aktiven Peptoiden. Log P wurde aus dem Durchschnitt von drei Messungen berechnet.

Peptoid	MHK <sub>90</sub> <sup>a</sup> [ $\mu$ M] <i>S. aureus</i> ATCC 29737	Log P aus drei Messungen
<b>Peptoidbibliothek 1<sup>b</sup></b>		
161	>100	-0,43
198	6,3	1,51
200	6,3	1,45
233	>100	0,02
<b>Peptoidbibliothek 2<sup>c</sup></b>		
293	1,6	1,52
297	1,6	1,49
321	1,6	1,19
322	3,1	1,25
324	1,6	1,14
333	>100	0,92
336	>100	1,39
<b>Peptoidbibliothek 3<sup>d</sup></b>		
348	>100	0,94
360	3,1	0,73
361	3,1	0,36
374	1,6	1,04
324	1,6	1,41
401	>100	0,95
<b>Peptoidbibliothek Oktamere<sup>e</sup></b>		
414	3,1	0,57
415	3,1	0,42

<sup>a</sup> MHK<sub>90</sub>, 90% antimikrobielle Dosis, kein visuelles Wachstum (CLSI 2006).

<sup>b</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 22.

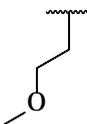
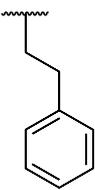
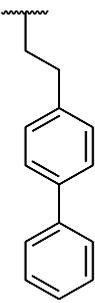
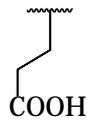
<sup>c</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 1

<sup>d</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 2

<sup>e</sup> Sequenz, Farb- und Zahlencode in Tabelle 3.

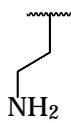
## h) Monomere glykosilierte Peptidnanosheets

**Tabelle 27:** Name, Abkürzung und Struktur der Monomere für die Peptidnanosheetsynthese.

Name	Abkürzung	Struktur/MW
<i>N</i> -(2-prop-2-yn-1-yl)glycin	<i>N</i> prg	 MW 39,06 g/mol
<i>N</i> -(2-methoxyethyl)glycin	<i>N</i> me	 MW 59,09 g/mol
<i>N</i> -(2-phenylethyl)glycin	<i>N</i> pe	 MW 105,16 g/mol
ND	<i>N</i> per	 MW 181,26 g/mol
<i>N</i> -(2-carboxyethyl)glycin	<i>N</i> ce	 MW 73,07 g/mol

## Appendix

---

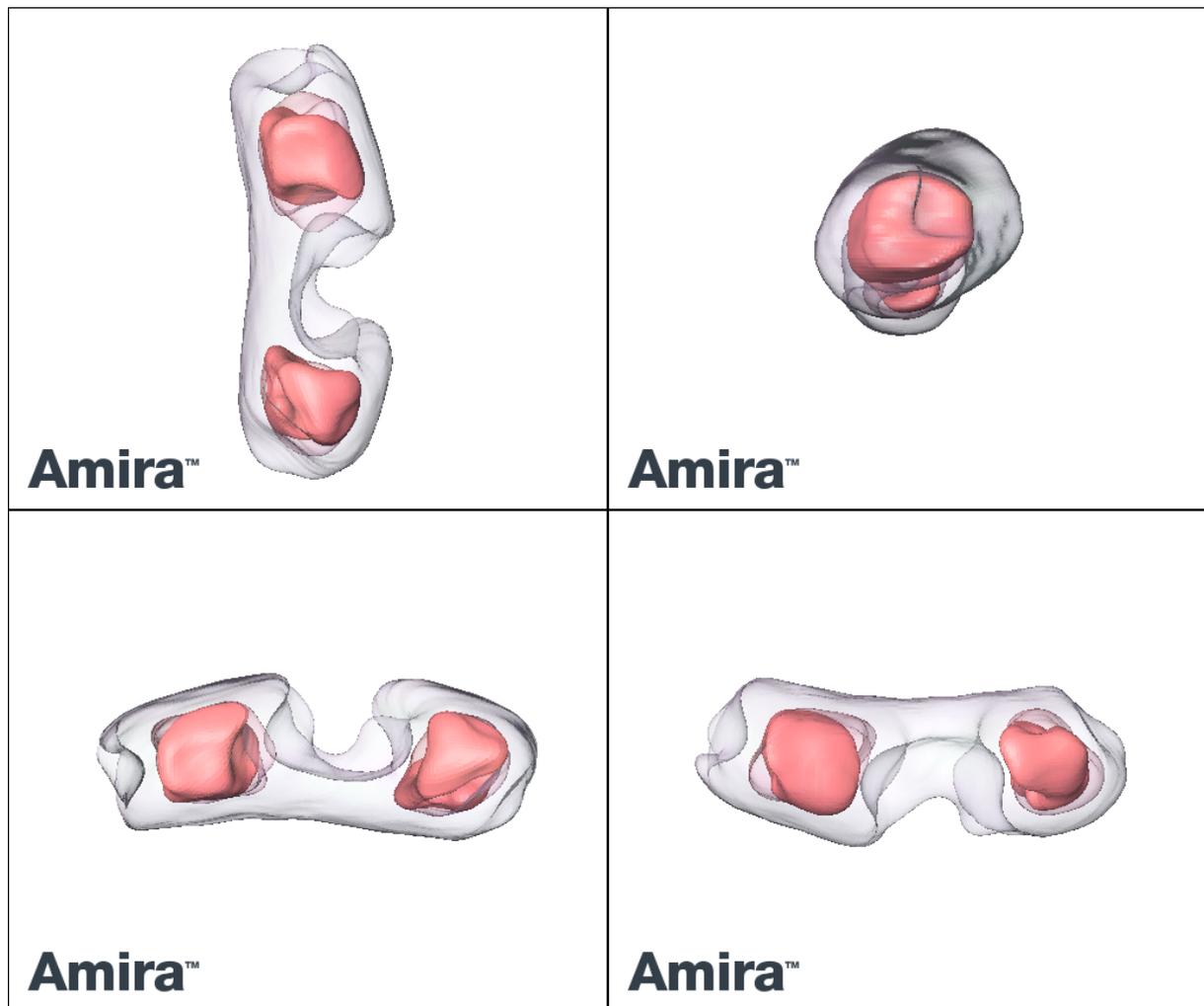
Name	Abkürzung	Struktur/MW
<i>N</i> -(2-aminoxyethyl)glycin	<i>Nae</i>	 MW 44,08 g/mol

---

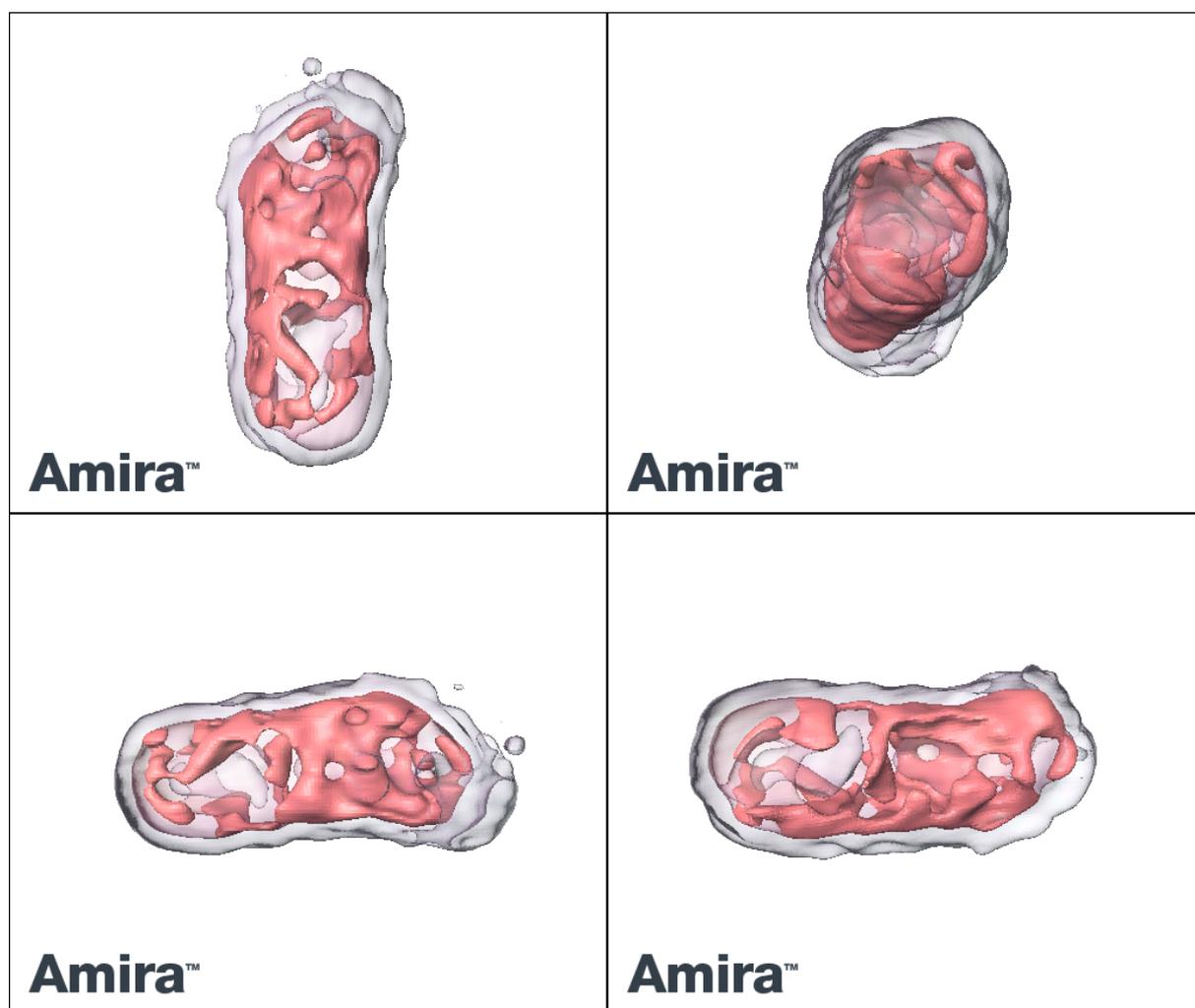
**i) soft X-ray Tomographie****Kontrolle unbehandelt**

**Abbildung 49:** Soft X-ray Tomographie von *E. coli* (unbehandelt). Segmentiert wurden die Membran, das Cytosol, sowie die DNA mit Hilfe der Software Amira. Rot: DNA.

Peptoid 198

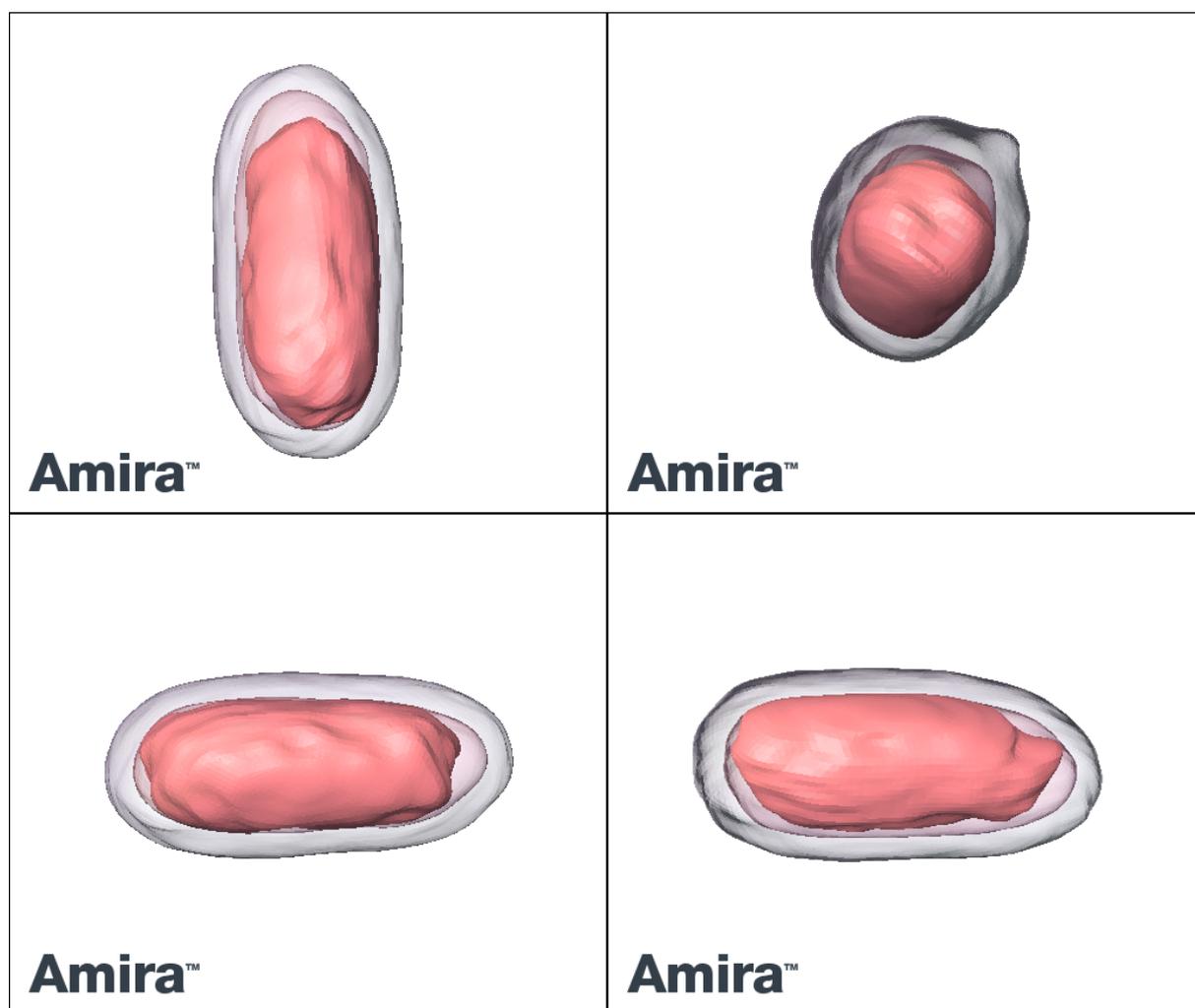


**Abbildung 50:** Soft X-ray Tomographie von *B. subtilis* nach Inkubation mit Peptoid 198. Segmentiert wurden die Membran, das Cytosol, sowie die DNA mit Hilfe der Software Amira. Rot: DNA.

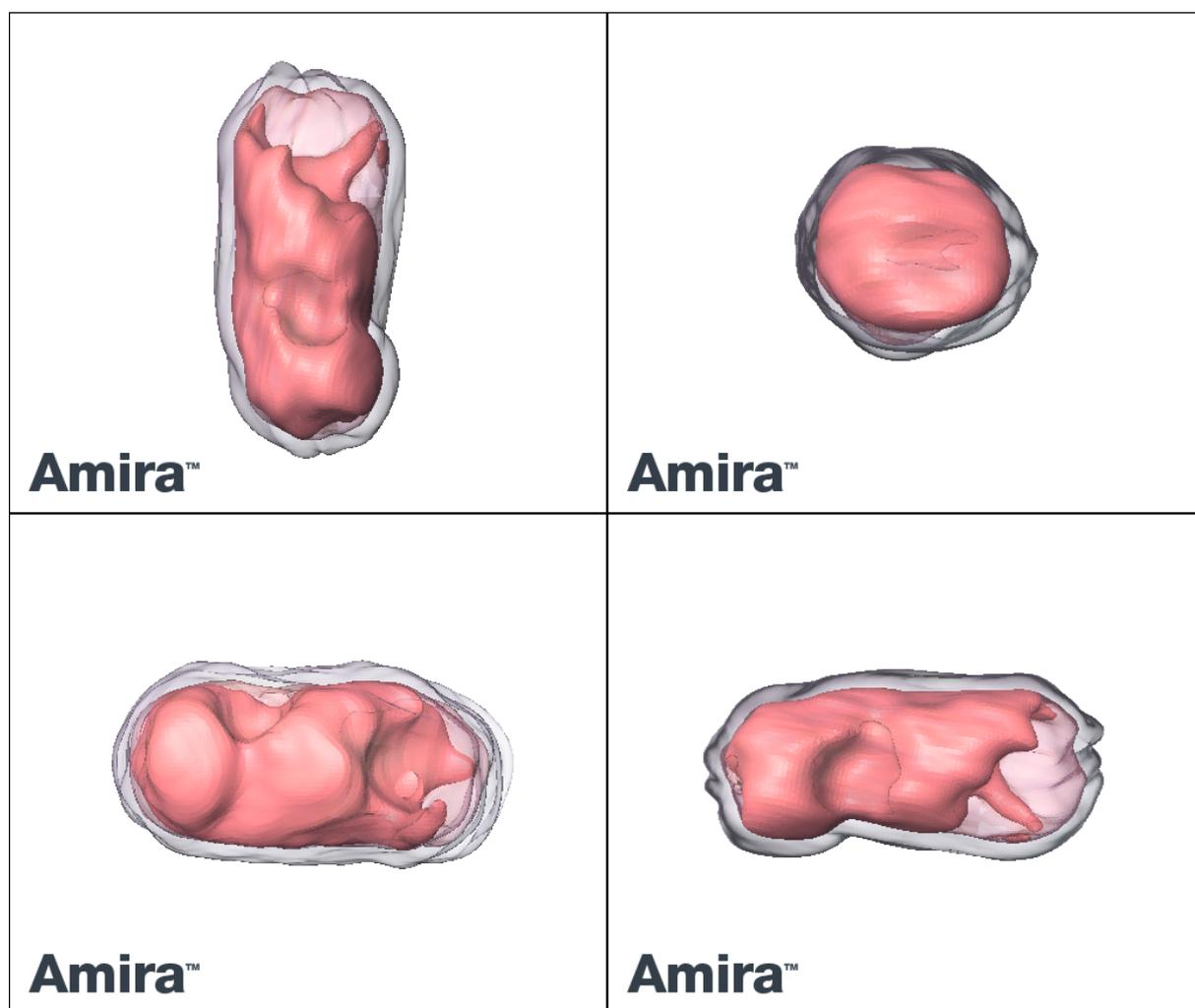
Peptoid 374

**Abbildung 51:** Soft X-ray Tomographie von *B. subtilis* nach Inkubation mit Peptoid 374. Segmentiert wurden die Membran, das Cytosol, sowie die DNA mit Hilfe der Software Amira. Rot: DNA.

Peptoid 418

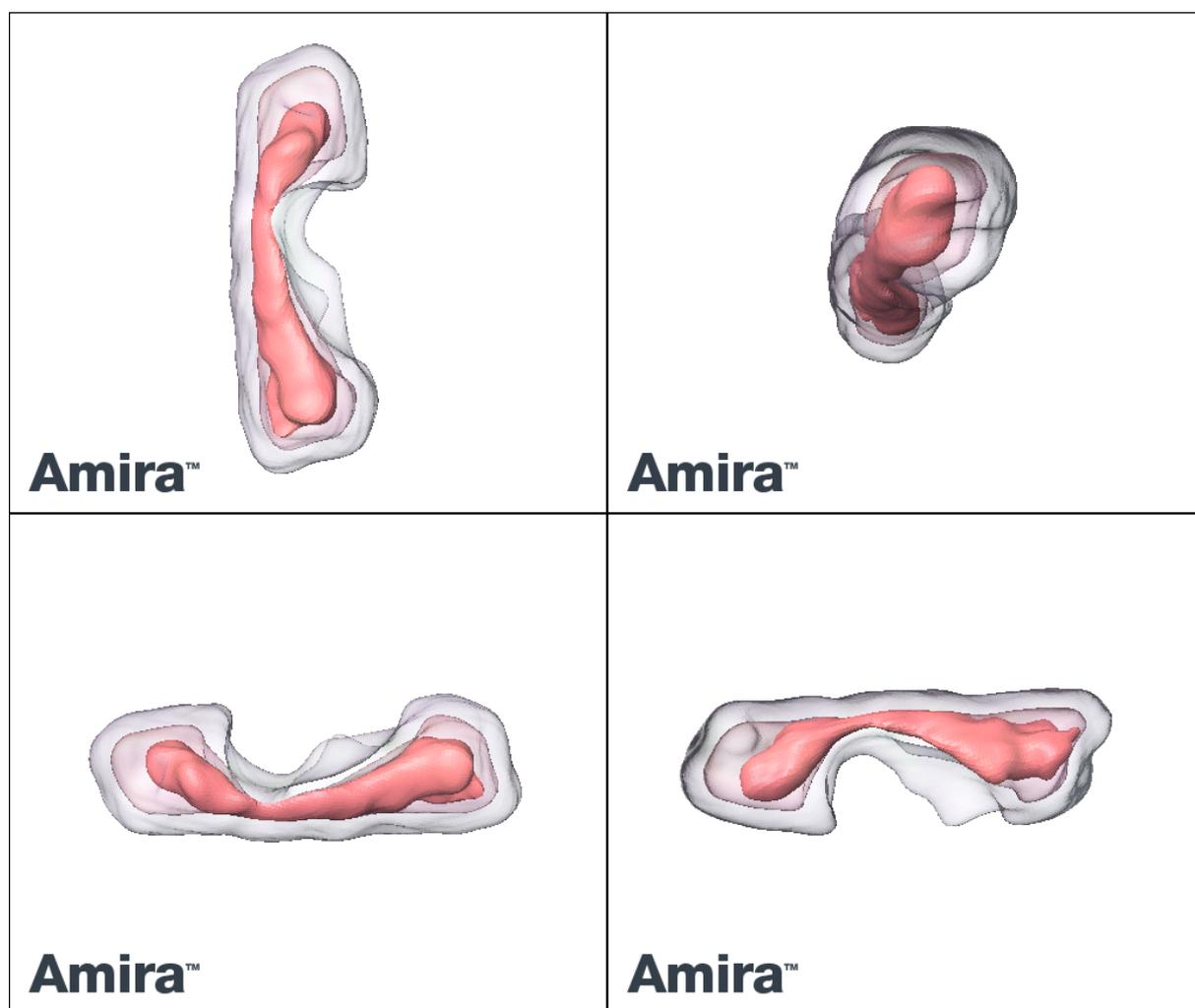


**Abbildung 52:** *Soft X-ray Tomographie* von *E. coli* nach Inkubation mit Peptoid 418. Segmentiert wurden die Membran, das Cytosol, sowie die DNA mit Hilfe der Software Amira. Rot: DNA.

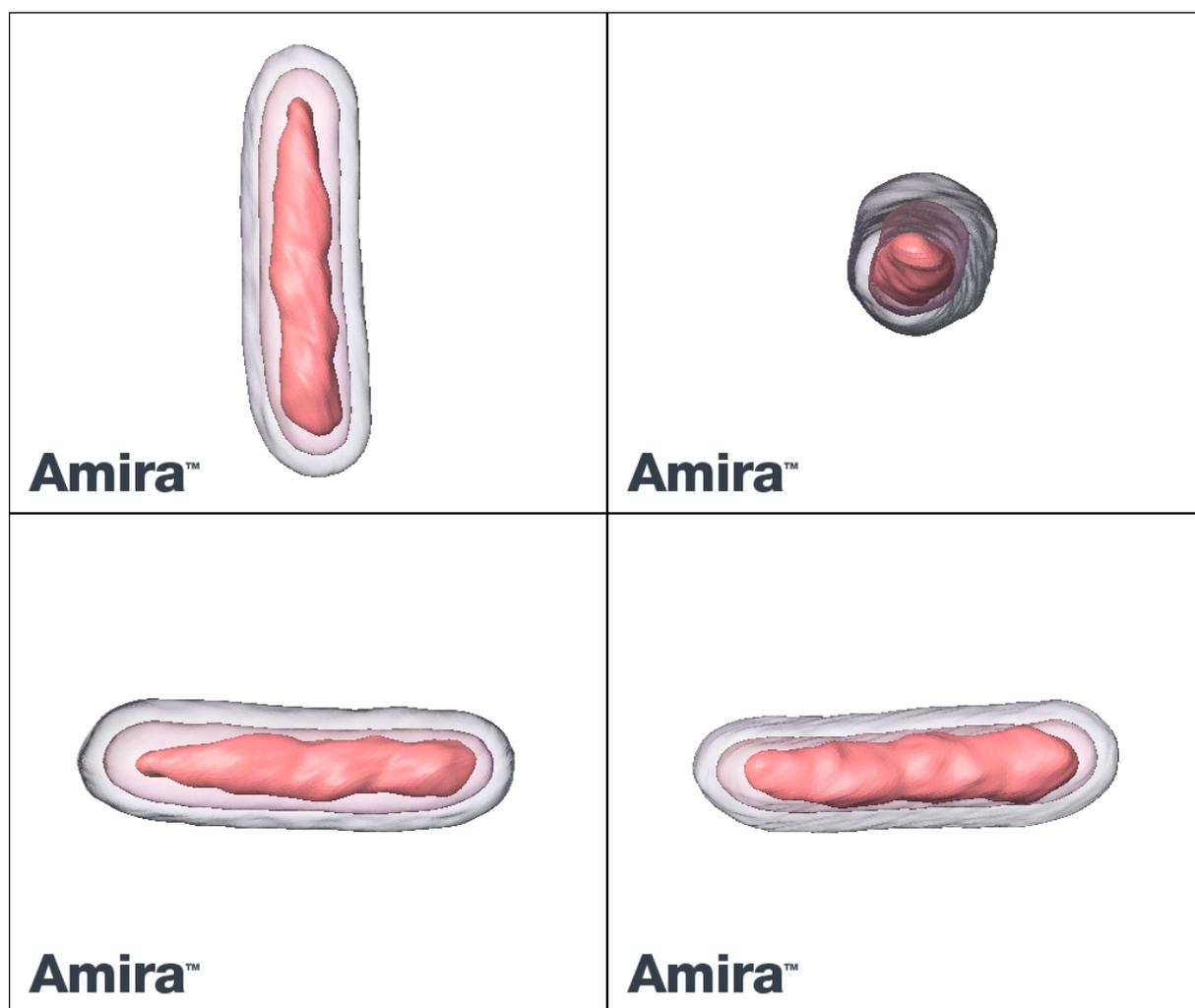
Peptoid 419

**Abbildung 53:** Soft X-ray Tomographie von *E. coli* nach Inkubation mit Peptoid 419. Segmentiert wurden die Membran, das Cytosol, sowie die DNA mit Hilfe der Software Amira. Rot: DNA.

Peptoid 424

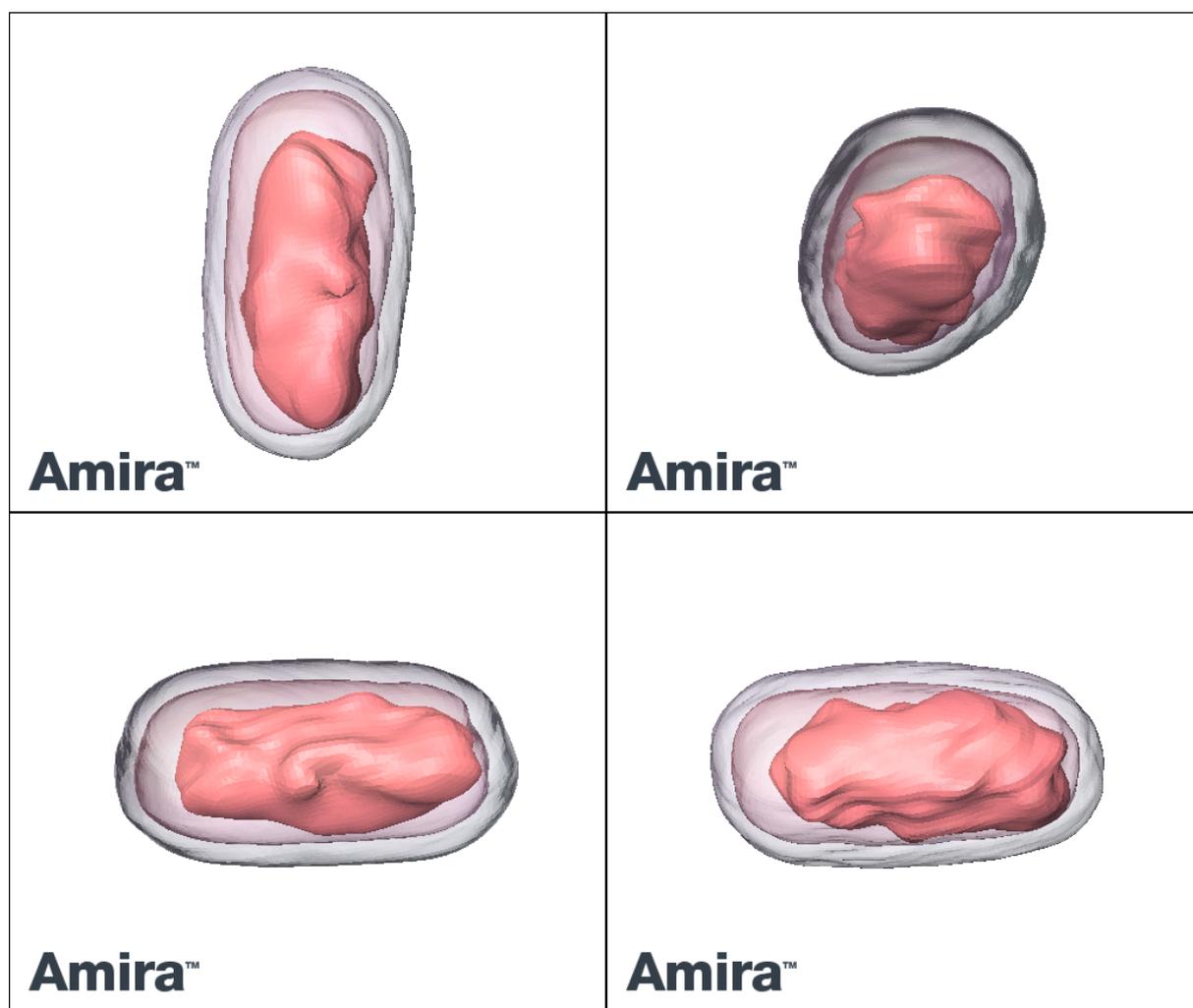


**Abbildung 54:** Soft X-ray Tomographie von *E. coli* nach Inkubation mit Peptoid 424. Segmentiert wurden die Membran, das Cytosol, sowie die DNA mit Hilfe der Software Amira. Rot: DNA.

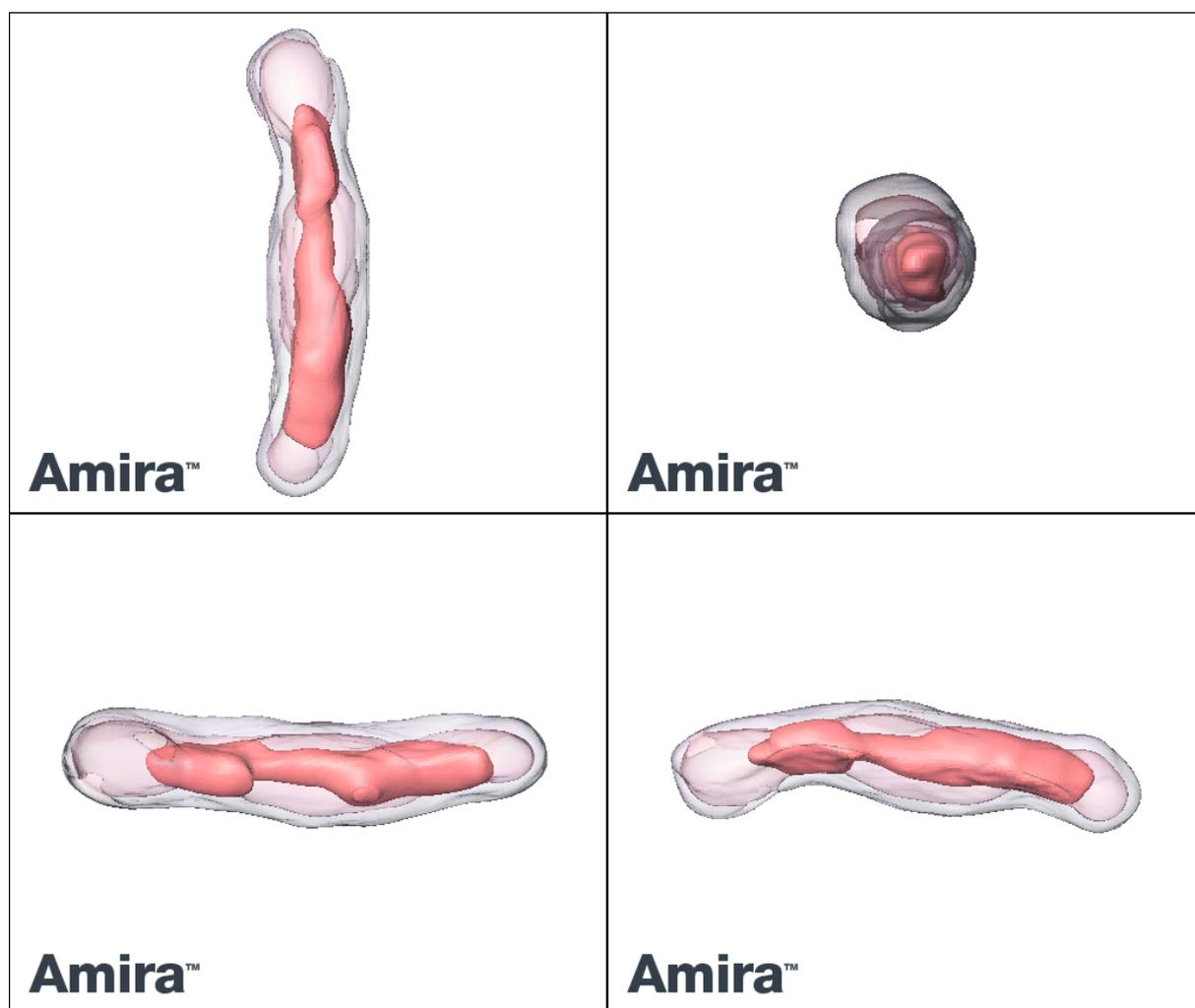
LL-37

**Abbildung 55:** Soft X-ray Tomographie von *E. coli* nach Inkubation mit Peptid LL-37. Segmentiert wurden die Membran, das Cytosol, sowie die DNA mit Hilfe der Software Amira. Rot: DNA.

Magainin-2

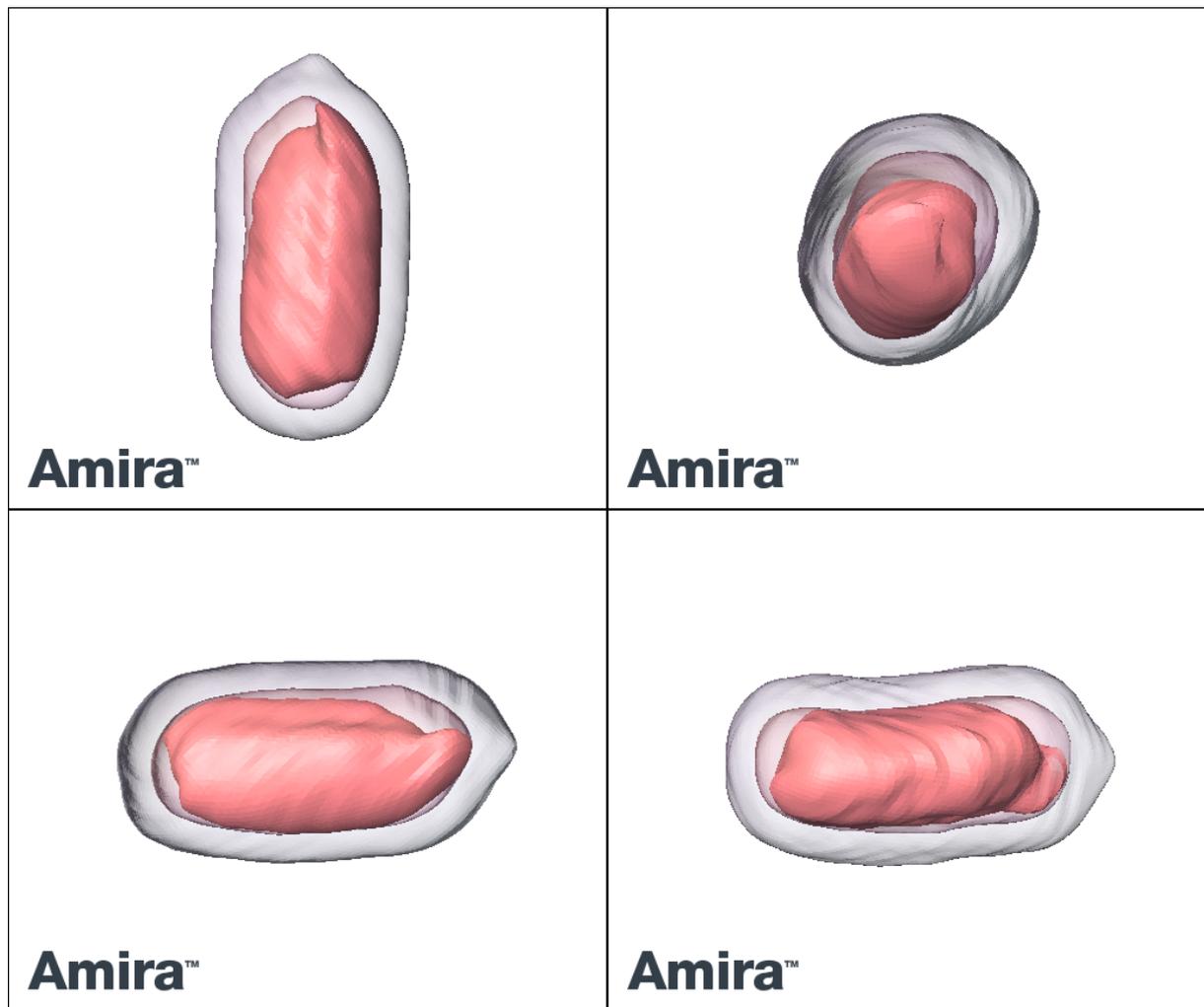


**Abbildung 56:** Soft X-ray Tomographie von *E. coli* nach Inkubation mit Peptid Magainin-2. Segmentiert wurden die Membran, das Cytosol, sowie die DNA mit Hilfe der Software Amira. Rot: DNA.

Melittin

**Abbildung 57:** Soft X-ray Tomographie von *E. coli* nach Inkubation mit Peptid Mellitin. Segmentiert wurden die Membran, das Cytosol, sowie die DNA mit Hilfe der Software Amira. Rot: DNA.

Tobramycin



**Abbildung 58:** Soft X-ray Tomographie von *E. coli* nach Inkubation mit dem Antibiotikum Tobramycin. Segmentiert wurden die Membran, das Cytosol, sowie die DNA mit Hilfe der Software Amira. Rot: DNA.

# Publikationsliste

## Publikationsliste

---

FLECK, B S, MUKHERJEE, D, THIEN, N T D, SCHEPERS, U, EE, P L R. Efficacy of antimicrobial peptoids against gram-positive bacteria and *Mycobacterium bovis* (BCG), in preparation

FLECK, B S, CHEN, J, LIN, J, MCDERMOTT, G, SCHEPERS, U, BARRON, A E. *Soft X-ray tomography imaging to correlate the antimicrobial properties and morphology changes by peptoids in E. coli*, in preparation

SELTENREICH, J E, FLECK, B S, KÖLMEL, D K, MÜLLEN, K, BRÄSE, S, SCHEPERS, U. Polyamines and peptoid dye chromophore conjugates to control oxidative stress in mammalian cells, in preparation

## Konferenzvorträge und Konferenzposter

---

### Vorträge

Fleck, B S. Advances in the development of peptidomimetics as potential antimicrobials, 3rd Peptides and Proteins Symposium. Singapur. 26.09.-29.09.2018.

### Poster

Fleck, B S, Wehl, I, Rönicke, F, Ee P L R, Schepers, U. Fluorescent peptoids as alternative antibiotics against MRSA and other bacteria. 10th Peptoid summit, Lawrence National Laboratory, Berkeley, USA. 10.08.-11.08.2017.

Fleck, B S, Wehl, I, Rönicke, F, Schepers, U. Fluorescent peptoids with antimicrobial properties. Symposium on Molecular Architectures for Fluorescent Imaging of Cells. Karlsruhe. 4.10.-6.10.2017.

Fleck, B S, Schepers, U, Ee P L R. Advances in the development of peptidomimetics as potential antimicrobials peptoids, 3rd Peptides and Proteins Symposium. Singapore. 04.12.-05.12.2017.

Fleck, B S, Schepers, U, Ee P L R. Fluorescent peptoids with antimicrobial properties, The Globalization of Pharmaceutics Education Network (GPEN). Singapore. 26.09.-29.09.2018.



## Danksagung

---

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2016 bis Juli 2019 am Institut für Toxikologie und Genetik des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Ute Schepers. Ich danke ihr herzlich für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung meiner Arbeit. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Frank Breitling für die Übernahme des Korreferats. Diese Arbeit wurde finanziell durch ein Stipendium der Jürgen Manchot Stiftung unterstützt. Des Weiteren war diese Arbeit Teil des Graduiertenkollegs 2039. Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Rachel Pui Lai Ee und ihren Arbeitskreis für die enge und kooperative Zusammenarbeit und für die Möglichkeit, an der *National University of Singapore* einen Teil meiner Experimente durchführen zu können. Ich bedanke mich zudem bei Dr. Devika Mukherjee für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre immer hilfreiche Erfahrung bei Problemen aller Art. Für die experimentelle Unterstützung geht ein weiterer Dank an Nhan Dai Thien Tram. Ich bedanke mich bei dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die finanzielle Unterstützung während meines Auslandsaufenthalts in Singapur. Ein Dank geht an das *Karlsruhe House of Young Scientists* für die finanzielle Unterstützung meines Auslandsaufenthalts in den USA durch den *Research Travel Grant*. Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Annelise Barron und ihrer wissenschaftlichen Mitarbeiterin Dr. Jennifer Lin für die ergebnisreiche Kollaboration und die Chance, am Lawrence Berkeley National Laboratory in den USA meine wissenschaftliche Expertise weiter ausbauen zu können. Für die große Hilfe bei den *soft X-ray Tomographie* Aufnahmen bedanke ich mich bei Dr. Gerry McDermott und Jianhua Chen. Ich bedanke mich zudem bei Prof. Dr. Ronald Zuckermann und Dr. Behzad Rad für die Gelegenheit an dem Projekt *Nanosheet* mitwirken zu dürfen. Für die Hilfe bei der Synthese der Oktamere und die Kooperation bei chemischen Fragen bedanke ich mich bei Dr. Stephan Münch. Ein besonders großer Dank geht an den Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Ute Schepers (Anna Becker, Hannah Buntz, Dominik Feser, Maike Fischer, Christoph Grün, Tobias Göckler, Dr. Vanessa Kappings, Sonja Haase, Xenia Kempter, Anna Meschkov, Tamara Molitor, Rebecca Pfister, Nicole Pleschka, Ludwig Pollich und Dr. Eva Zittel) für die stetige Unterstützung auf wissenschaftlicher und freundschaftlicher Ebene selbst über Kontinente hinweg.

Der größte Dank geht an meine Familie, die mir diesen Weg ermöglichte.



