

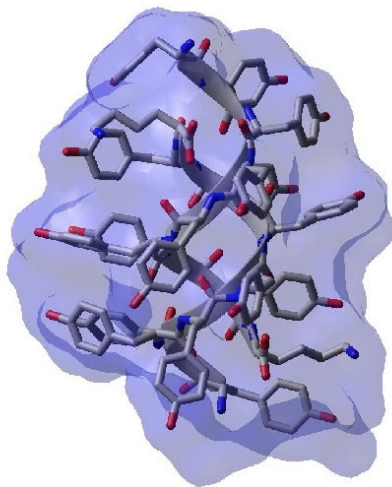


Andrea Küsel (Autor)

# Synthese und Untersuchungen von alternierend konfigurierten Peptiden im Hinblick auf funktionelle Eigenschaften

Andrea Küsel

Synthese und Untersuchungen von  
alternierend konfigurierten Peptiden im  
Hinblick auf funktionelle Eigenschaften



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2266>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Proteine (griechisch *protos* - Erster) gehören zu den wichtigsten Biomakromolekülen, da sie fast alle biochemischen Prozesse des Lebens regulieren.<sup>[1]</sup> Über einen langen Zeitraum wurden Proteine als ungeordnete Kolloide angesehen, deren katalytische Fähigkeiten auf unbekannte Komponenten zurückgeführt wurden. Erst als *J. D. Bernal* und *D. Crowfoot Hodgkin*<sup>1</sup> 1934 zeigten,<sup>[2]</sup> dass ein Pepsin-Kristall im Röntgenstrahl ein bestimmtes Beugungsmuster aufweist, wurde deutlich, wie einzigartig und strukturiert Proteine sind. *Pauling*<sup>2</sup> und *Corey* beschrieben 1951 die  $\alpha$ -Helix und das  $\beta$ -Faltblatt als erste zentrale Sekundärstrukturelemente von Proteinen<sup>[3]</sup> und ermöglichten dadurch das Verständnis der räumlich komplexen Strukturen aus einzelnen Polypeptidketten, die über Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrücken aggregieren.

Die Funktionsweise von Proteinen beruht auf dem Zusammenspiel von Primärstruktur, Konformation sowie intra- und intermolekularen Wechselwirkungen.<sup>[4]</sup> Das Verständnis dieser Wechselwirkungen ist notwendig, um die Ursache zahlreicher Krankheiten wie Viruserkrankungen, Alzheimer oder Parkinson zu verstehen und geeignete Therapiekonzepte zu entwickeln, weswegen sich in den letzten Jahren die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Aminosäuresequenz, Funktion und Eigenschaften von essentiellen Makromolekülen zu einem interdisziplinären Forschungsgebiet entwickelt hat. Ende 2003 brachte *Roche Enfuvirtide* (Fuzeon™), ein Peptid aus 34 Aminosäuren als HIV-Fusions Inhibitor einer neuen Klasse der antiretroviralen Wirkstoffe, auf den Markt. Durch Interaktion von *Enfuvirtide* mit der Zellmembran wird die Aufnahme des HIV-Virus in die Zelle verhindert.<sup>[5]</sup>

Dieses Beispiel illustriert die enorme Bedeutung der Wechselwirkung von Peptiden mit Lipiden, die auch für die Funktion von Membranproteinen verantwortlich ist. Diese nehmen in biologischen Systemen eine zentrale Rolle ein, da sie den Transport von Molekülen oder Ionen über die Zellmembran gewährleisten. Der Transport von Ionen ist essentiell für den Aufbau eines elektrischen Potentials an einer Membran und somit für jegliche Reizleitung in Nerven und Gehirn.

Ein klassisches Beispiel für einen Ionenkanal ist Gramicidin A (**1**),<sup>[6]</sup> ein natürliches Pentadecapeptid, für das *Lipmann et al.* vor mehr als 60 Jahren gezeigt haben, dass

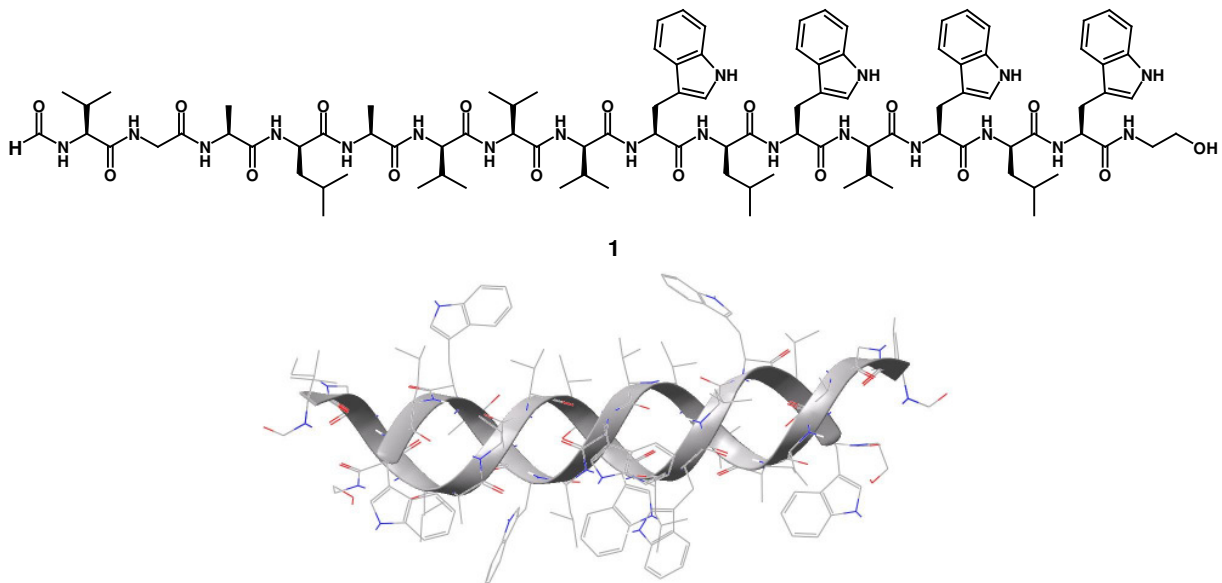
---

<sup>1</sup> Nobelpreis 1964: Strukturbestimmung biologisch wichtiger Substanzen mit Röntgenstrahlen.

<sup>2</sup> Nobelpreis 1954: Forschung über die Natur der chemischen Bindung/ Molekülstruktur der Proteine.

es D-konfigurierte Aminosäuren enthält.<sup>[7]</sup> Obwohl D-Aminosäuren nicht zu den proteinogenen Aminosäuren gehören, sind sie Bestandteil einiger bakterieller Polypeptide. Ihr Einsatz vergrößert die strukturelle Vielfalt von Proteinen und schützt sie gleichzeitig vor enzymatischem Abbau.

D,L-alternierende Peptide, wie Gramicidin A (**1**), werden seit mehr als 30 Jahren im Hinblick auf ihre Ionenleitfähigkeit in Abhängigkeit von der Umgebung und etwaigen Kofaktoren untersucht,<sup>[8]</sup> wobei die Fähigkeit verschiedene  $\beta$ -Helices auszubilden ein wichtiger Aspekt ist (Abb. 1).<sup>[9]</sup>

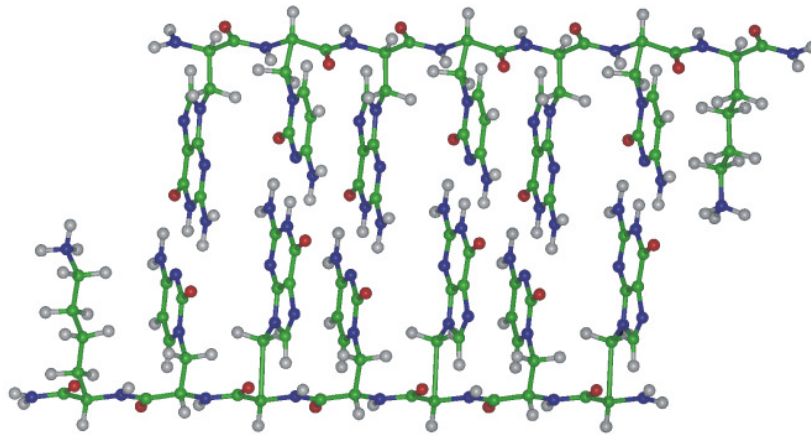


**Abbildung 1** Strukturformel des Gramicidin A (**1**) (oben) und Struktur der antiparallelen  $\beta^{5,6}$ -Doppelhelix (unten) des Gramicidins (PDB 1AL4).<sup>[9]</sup>

Eine weitere Möglichkeit D,L-alternierender Peptide transmembrane Poren auszubilden, wurde von *Ghadiri et al.* etabliert.<sup>[10]</sup> Er konnte zeigen, dass zyklische D,L-alternierende Peptide in der Lage sind, röhrenförmige Aggregate zu bilden, die verschiedenen Ionen bishin zu kleinen Molekülen durch Lipiddoppelschichten transportieren können. Diese Aggregate werden durch  $\beta$ -faltblattartige Wasserstoffbrücken stabilisiert und sind je nach Sequenzlänge in ihrem Durchmesser variabel, wodurch die Spezifität für die zu transportierenden Moleküle erreicht werden kann.<sup>[10]</sup>

Das Gerüst der Alanyl-Peptidnukleinsäuren (Alanyl-PNA) basiert ebenfalls auf den  $\beta$ -faltblattartigen Merkmalen des D,L-alternierenden Peptidrückgrates. Bei Alanyl-PNA handelt es sich um ein kurzes, alternierend aufgebautes Peptid, dessen Seitenketten mit Nukleobasen modifiziert sind. Die Seitenketten orientieren sich aufgrund der

Alternanz auf eine Seite des Rückgrates und forcieren durch Wasserstoffbrücken und Basenstapelung einen linearen Doppelstrang (Abb. 2).<sup>[11]</sup>



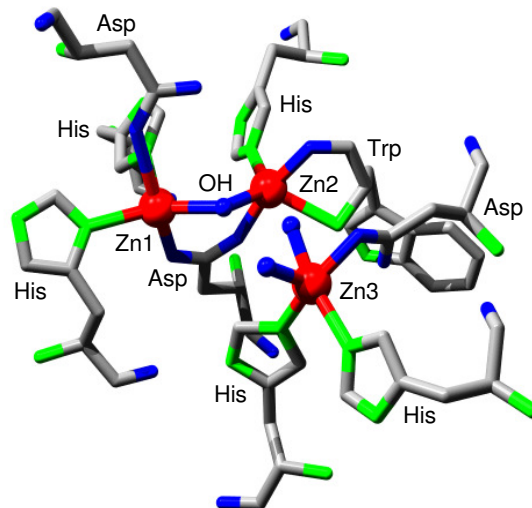
**Abbildung 2** Darstellung des linearen Doppelstranges der Alanyl-PNA.<sup>[11]</sup>

Die strukturelle Vielfalt  $D,L$ -alternierender Peptide ermöglicht es, gezielt peptidische funktionelle Einheiten aufzubauen, die gegenüber Enzymen eine erhöhte Stabilität aufweisen, aber dennoch die oft relevante peptidische Umgebung beinhalten.

Eine weitere herausragende Funktion von Proteinen ist ihre enzymatische Aktivität. Sie katalysieren eine Vielzahl biochemischer Prozesse, die ohne sie unter physiologischen Bedingungen nicht möglich wären. In der Enzymtasche werden die Substrate aktiviert und zueinander in räumliche Nähe gebracht, Mechanismen die häufig unter Komplexierung von Metallionen ablaufen.<sup>[12]</sup>

Ein prominentes Beispiel für ein Metalloprotein stellt die *P1-Nuklease*<sup>[13]</sup> dar, ein Enzym, das die Spaltung von Phosphodiestergruppen einzelsträngiger RNA und DNA zu 5'-Mononukleotiden katalysiert, aber auch als Monophosphatase an der 3'-Phosphatgruppe des erhaltenden Produktes agiert.<sup>[14]</sup> In ihrem katalytischen Zentrum befinden sich drei Zink-Kationen, die durch Aminosäureseitenketten koordiniert sind (Abb. 3) und sowohl für die Substratbindung als auch für die Aktivierung des Nukleophils verantwortlich sind.

Die Komplexität von Metalloenzymen macht es attraktiv, einfache Modellsysteme zu entwickeln und zu untersuchen, um ihre Funktionsweise im Hinblick auf eine spätere Anwendung als Pharmakon oder für biotechnologische Prozesse zu verstehen.



**Abbildung 3** Katalytisches Zentrum der P1-Nuklease.<sup>[13]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Aufbau einer Metallionenbindungstasche durch Kombination peptidischer Gerüstmotive und selbstorganisierender Strukturelemente angestrebt. Dazu werden modifizierte, rigide, selbstorganisierende Systeme der Alanyl-PNA und Modifikationen der D,L-alternierenden Zyklopeptide synthetisiert und auf Metallionenbindungseigenschaften untersucht.

Das rigide, selbstorganisierende System der Alanyl-PNA scheint als Mimetikum geeignet, da es eine hydrophobe Tasche in einer enzymverwandten Umgebung sowie die Möglichkeit der Substraterkennung durch verschiedene Wechselwirkungen aufweist. Die Alanyl-PNA wird so modifiziert, dass innerhalb des apolaren Basenstapels Metallionen koordiniert werden können. Durch Seitenkettenhomologisierung der Alanyl-PNA wird die Darstellung ein- und zweikerniger Komplexe ermöglicht.

Die ausgeprägte Organisation der D,L-alternierenden Zyklopeptide soll durch Störung der Alternanz aufgehoben werden. Durch den Einbau von Metallionenbindungsstellen soll eine Reorganisation der Peptide durch Metallionenkoordination ermöglicht werden, wodurch eine Regulierung der Struktur erlaubt wird.

Aus der Relevanz peptidischer Interaktionen mit der Zellmembran für die Entwicklung von Pharmaka leitete sich die Untersuchung des Verhaltens von D,L-alternierenden Peptiden in Modellmembranen ab. Dazu wurden lineare D,L-alternierende Peptide verschiedener Länge aufgebaut und ihr Verhalten in verschiedenen Lipiddoppelschichten untersucht. Die Abhängigkeit der Sekundärstruktur D,L-

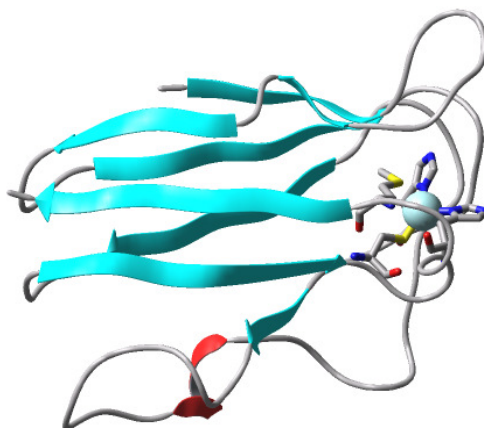
alternierender Peptide mit rein aromatischen Seitenketten von der Umgebung, der Kettenlänge und der Gestalt der Termini wird mittels CD-Spektroskopie und Röntgenbeugung untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Synthese und Untersuchung dieser verschiedenen D,L-Sequenzen im Hinblick auf ihre konformellen und funktionellen Eigenschaften sowie koordinativen Fähigkeiten vorgestellt und diskutiert.

## 2 Grundlegende Aspekte

### 2.1 Metallionen bindende Peptide

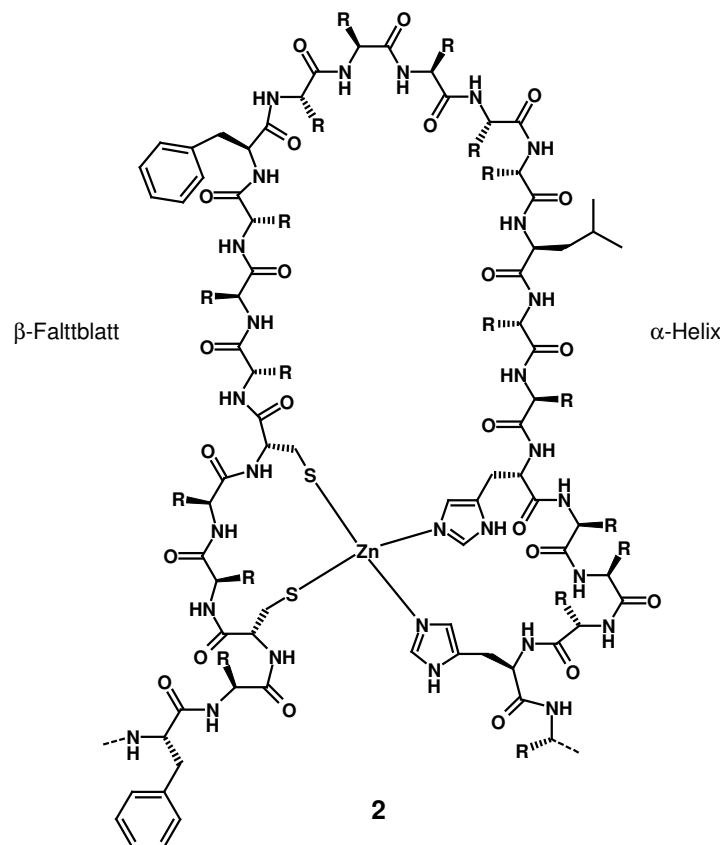
Die Primärstruktur von Proteinen und Peptiden wird durch ihre Aminosäuresequenz festgelegt, welche aufgrund zwischenmolekularer Wechselwirkungen und sterischer Faktoren die räumliche Anordnung von Polypeptiden und damit ihre Sekundär- und Tertiärstruktur bestimmt. Metalle spielen eine grundlegende Rolle in Peptiden und Proteinen, da sie deren katalytische Aktivität, Strukturausbildung, Elektronentransfer, Transport und Ligandenbindung unterstützen. Die Metallionenbindungsstellen können in zwei Klassen unterteilt werden. Einerseits gibt es die präorganisierten Bindungsstellen, in denen die Metallkoordinierung nur bei entsprechender Konformation vorkommt, wie zum Beispiel bei den ‚*blue copper proteins*‘. Sie liegen in Abwesenheit von Metallionen bereits komplett gefaltet vor (Abb. 4), wodurch eine unübliche Geometrie am Metallzentrum hervorgerufen wird, die jedoch die entsprechende Funktionsweise fördert.<sup>[15]</sup> Das Plastocyanin, ein bekannter Vertreter der ‚*blue copper proteins*‘, ist für Elektronentransferleistungen zuständig. Es ist in einer  $\beta$ -Faltblatt Struktur gefaltet. Das kupferenthaltende Redoxzentrum wechselt zwischen seinen Oxidationsstufen Cu(I) und Cu(II). Kupfer liegt in einer verzerrt tetraedrischen Koordinationsgeometrie vor, in der es von zwei Histidinen, einem Cystein und einem Methionin koordiniert wird. Die Spannung die das Protein auf die tetraedrische Koordination des  $\text{Cu}^{2+}$  ausübt,<sup>3</sup> fördert dessen Reduktion zu  $\text{Cu}^+$  und dadurch den Elektronentransport.



**Abbildung 4** Kristallstruktur des *blue copper proteins*, Plastocyanin PDB 1AG6.<sup>[16]</sup>

<sup>3</sup>  $\text{Cu}^{2+}$  weist gewöhnlicherweise eine quadratisch planare Konformationsgeometrie auf, während  $\text{Cu}^+$  die tetraedrische Konformationsgeometrie bevorzugt.

Bei der anderen Art der Metallionenbindungsstellen ist die Proteinfaltung von der Anwesenheit der entsprechenden Metallionen abhängig. Die Metallionen dienen ausschließlich zur Strukturausbildung des Proteins. Sie sind verantwortlich für die Proteinfaltung und Stabilität und haben nur selten katalytische Aktivität.<sup>[17]</sup> Die bekannteste auf Metallionen basierende Struktur eines Proteins ist das Motiv des Zinkfingers **2**. Das Zinkfinger-Motif erkennt eine bestimmte Basensequenz in Nukleinsäuren und dient der selektiven Aktivierung und Regulation genetischer Transkription.<sup>[18]</sup> In Abwesenheit von Metallionen liegen sie komplett ungefaltet vor. Das Strukturmotiv des Zinkfingers (Abb. 5) kommt in einer Vielzahl von nukleinsäurebindender und genregulierender Proteine vor. Die spezifische Faltung des Zinkfinger Motivs wird durch Koordination von  $Zn^{2+}$ -Ionen an invarianten Histidinen und Cysteinen verursacht, welche in einer ca. 30 Aminosäuren langen Protein-Domäne vorliegen.<sup>[19]</sup> Im  $Cys_2His_2$ -Zinkfinger liegt die Cystein-Seite in einer  $\beta$ -Faltblatt-Struktur vor und die His-AS<sub>3</sub>-His Sequenz in einer  $\alpha$ -Helix.<sup>[1]</sup> Durch Protein/Basenpaar Wechselwirkungen wird eine spezifische DNA-Erkennung ermöglicht.



**Abbildung 5** Repräsentation der Zinkfinger Domäne des Transkriptions Faktors IIIA. Aminosäuren mit einem R entsprechen variablen Resten.<sup>[20]</sup>



Eine kürzlich beschriebene Modifikation der Zinkfingerdomäne, in der ausschließlich Histidin als Koordinationsstelle dient,<sup>[21]</sup> zeigt ebenso wie eine an ein Ni<sup>2+</sup>-koordinierendes Tripeptid GlyGlyHis gebundene Zinkfinger-Domäne<sup>[22]</sup> eine vielversprechende Nuklease-Aktivität. Es gibt zahlreiche Arbeitsgruppen, die sich mit der Thematik der Metalloenzyme beschäftigen. In den letzten Jahren wurden mehrere Modellkomplexe synthetisiert und hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität getestet.<sup>[23]</sup> Als Modellkomplexe werden niedermolekulare Komplexverbindungen angesehen, die dem Protein in möglichst vielen Eigenschaften gleichen. Demnach sollte ein Modellkomplex in seinem Aufbau, seinen elektronischen und chemischen Eigenschaften seinem biologischen Vorbild entsprechen.

Zahlreiche hydrolytische Enzyme benötigen Metallionen für ihre Funktionsweise. Der Einfluss der Aminosäureseitenketten auf die katalytischen Funktionen ist aus der wachsenden Anzahl von Protein-Kristallstrukturen ersichtlich. Die enorme katalytische Effizienz ist Ergebnis der perfekt koordinierten Metallionen und ihrer Kooperation mit weiteren funktionellen Gruppen.<sup>[12]</sup> Einige Beispiele für Metallionen gestützte Enzyme und ihre für die Aktivität relevanten Aminosäuren werden in Tabelle 1 dargestellt.<sup>[aus 12]</sup>

Enzym	Metallionen	Beteiligte Aminosäuren
<i>Staphylokokken Nuklease</i>	Ca <sup>2+</sup>	2 Arg, 1 Glu
<i>Nuklease S1</i>	Zn <sup>2+</sup>	Lys, Glu
<i>Carboxy-Peptidase A</i>	Zn <sup>2+</sup>	Glu, Arg
<i>Alkalische Phosphatase</i>	2 Zn <sup>2+</sup>	Arg, Ser
<i>Purple acid Phosphatase</i>	Zn <sup>2+</sup> + Fe <sup>3+</sup>	His

**Tabelle 1** Einige Metalloenzyme und ihr aktives Zentrum.

Die Aktivität in Nukleasen und Peptidasen beruht auf dem kooperativen Effekt der Metallionen mit sauren, basischen oder nukleophilen Aminosäureseitenketten. Metallionen und funktionelle organische Gruppen fördern die hydrolytische Spaltung nach folgenden Prinzipien:

- elektrostatische Aktivierung des Substrates oder Stabilisierung des Übergangszustandes durch Metallionenkoordination, Wasserstoffbrücken oder Protonentransfer
- Stabilisierung der Abgangsgruppe durch Metallionenkoordination, Wasserstoffbrücken oder Protonentransfer
- Bildung des Nukleophils