



Kapitel 1

EINLEITUNG

In der heutigen Vorstellung ist die zentrale Rolle von Membranen die Bildung von Kompartimenten für die Organisation biologischer Prozesse. Die selektive und steuerbare Ionenpermeabilität und die Leitfähigkeit sind dabei essentielle Funktionen in allen Zellen.^[1] Membranen generieren die Basis für die Regulierung der Zusammensetzung des intrazellulären Mediums, in dem diese den Transport von Nährstoffen, Abfallprodukten, Ionen usw. in und aus der Zelle kontrollieren. Nur Moleküle mit einer ausreichend geringen Größe, Gesamtladung und Polarität können die Membran mittels passiver Diffusion direkt passieren. Partikel, die diese Voraussetzungen nicht erfüllen, werden mit Hilfe von Kanälen und diversen Transportern wie den TRP-Kanälen (*Transient Receptor Potential*) durch die Membran geleitet. Letztlich umfassen diese Ionenkanäle oder -pumpen bzw. Transportsysteme porenbildende Transmembranproteine, deren Hauptfunktionen in der Regulierung der Ionenpermeabilität durch Zellmembranen, der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials sowie im Prozess der Signalweiterleitung liegen.^[1, 2]

Die Vielfalt der heute bekannten Transporter mit deren gekoppelten hochspezifischen physiologischen Funktionen ist enorm, wobei ihre Funktion teilweise sehr stark von der Membranzusammensetzung abhängt. Aufgrund starker hydrophober Interaktionen zwischen der Transmembrandomäne eines Proteins und dem lipophilen Teil einer Membran ist jede Art von Fehlanpassung (*mismatch*) mit einem hohen energetischen Aufwand gekoppelt. Diese Energie kann zur Modellierung bestimmter Peptidfunktionen^[3, 4] sowie zur Neuverteilung oder *clustering* innerhalb der Membran führen.^[5] Dabei dient das *clustering* z. B. der Erhöhung der lokalen Peptiddichte, die einen Einfluss auf die thermodynamische Peptid- bzw. Kanalaktivität sowie deren Funktion und Kinetik der konformerer Peptidzustände ausübt.^[6] Sobald Transmembranproteine bzw. -peptide Konformationsänderungen eingehen, passen sich die Membran und *vice versa* diesen Änderungen an. Diese Anpassung erfordert Energie, die mit Änderungen der physikalischen Membran- bzw. Lipideigenschaften wie der



Membrandicke sowie ihrer Krümmung einhergeht. Dabei entsteht eine Kopplung zwischen den Änderungen der Membran und denen der Peptide bzw. Kanäle.^[5] Die Aktivität der Ionenkanäle ist durch die Konformation, die diese in Membrandoppelschichten einnehmen, bestimmt. Kanäle können in zahlreichen offenen und geschlossenen Zuständen vorliegen, wobei ihre Mechanismen für den spezifischen Ionen- und Wassertransport sowie die jeweiligen *gating* Zustände zum größten Teil ungeklärt sind.^[7]

Somit ist die detaillierte Aufklärung der Struktur und Dynamik von transmembranen Peptiden essentiell für das Verständnis der Kanalfunktion und deren Interaktionen mit Membranlipiden. Welche strukturellen Mindestvoraussetzungen für einen Ionenkanal gegeben sein müssen, können mit dem Entwurf, der Synthese und einem Funktionstest artifizierender Ionenkanäle aufgeklärt werden.

1.1 Motivation

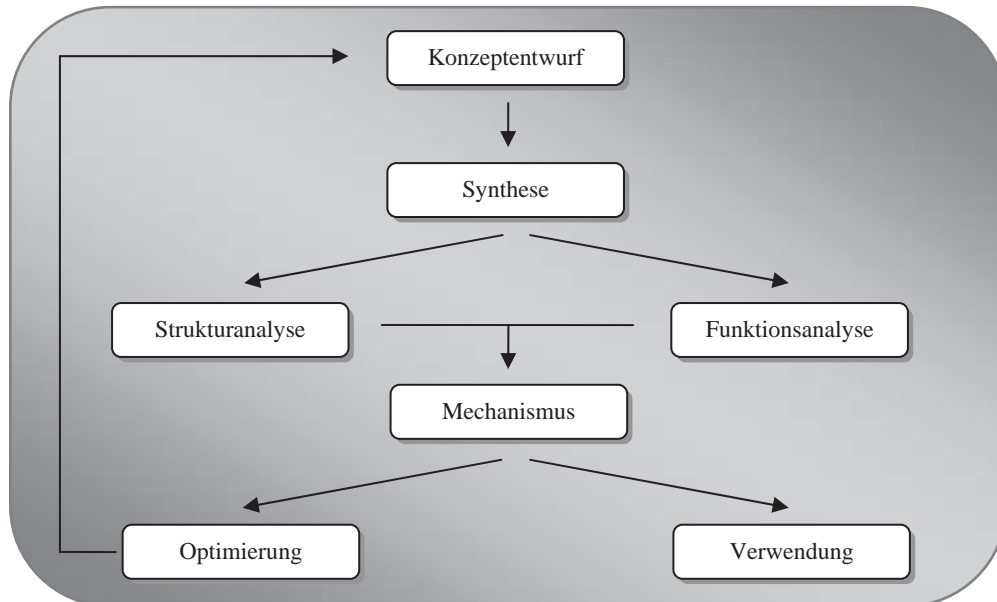
Im Rahmen dieser Arbeit diente der Ionenkanal Gramicidin A (gA) als Objekt intensiver Forschung, da er ein interessantes System zur Untersuchung von Struktur-Funktions- bzw. Struktur-Aktivitätsbeziehungen, Peptid-Lipid-Interaktionen sowie elektrischen Eigenschaften repräsentiert. Zur Aufklärung dieser Beziehungen dienen in dieser Arbeit moleküldynamische Computersimulationen, die eine detaillierte Sicht für den Entwurf neuer künstlicher Kanäle in Bezug auf Gramicidin A mit spezifischen Permeabilitäts- und Selektivitätscharakteristika geben. Die Circular dichroism-Spektroskopie trägt zur Analyse der funktionellen Rekonstitution der Gramicidinderivate in der Membran und zur Konformationsaufklärung innerhalb eines Lipidsystems bei. Mittels Mikroelektroden-technik können kompetitive Ionen- und Wasserflüsse durch Membranen gemessen und somit die Leitfähigkeit neuer artifizierender Ionenkanäle untersucht werden. Einzelkanalmessungen mit Hilfe der *planar patch-clamp* Methode liefern Erkenntnisse über die Kanal-Aktivitätsbeziehung. Abschließend wird mit Hilfe der Methode *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) die laterale Mobilität von fluoreszenzmarkierten Gramicidinpeptiden innerhalb einer Membran untersucht.

Das Ziel dieser Arbeit ist einerseits die Synthese, Struktur- und Funktionscharakterisierung neuer künstlicher Ionenkanäle basierend auf Gramicidin A und andererseits ein neues Modellsystem zur Charakterisierung von Membran-Peptid-Interaktionen vorzuschlagen. Dieser Ansatz verfolgt zwei Hauptziele: Aufschluss über Peptid-Lipid-Interaktionen, die den



neuen artifiziellen Ionenkanälen innerhalb einer Membran unterliegen und Erkenntnis über Mechanismen, die den Teilchentransport in einem bestimmten System ermöglichen.

Schema 1 beschreibt die Herangehensweise an die Synthese und die Analyse von Struktur und Funktion künstlicher Ionenkanäle, die wesentlich zum Verständnis natürlicher Membrankanäle beitragen.



Schema 1 Strategieverlauf zur Entwicklung neuer künstlicher Ionenkanäle.

Zunächst wurde ein Entwurf ausgehend von Gramicidin A als Basiskonzept für die Entwicklung neuer derivatisierter Kanalsysteme erstellt und im Laufe der Arbeit als Orientierung genutzt. Dieser Konzeptentwurf beinhaltet drei grundlegende Aspekte, die von neuen Kanalsystemen erfüllt werden müssen:

- i) Analyse von Peptid-Lipid-Interaktionen;
- ii) Zusammenhang zwischen Struktur und Kanalfunktion;
- iii) Aufschluss über Insertionsmechanismen und Verhalten

(Orientierung/Organisation) modifizierter Kanäle in artifiziellen Membranen.

Der zweite Schritt der Aufgabenstellung ist die Synthese der entworfenen Strukturmodelle. Die Voraussetzung für strukturelle Konformation und somit für bestimmte Funktionen ist die Entwicklung synthetischer Peptide mit einem voraussehbaren, kooperativen Falten (programmiertes Falten). Das Umsetzen der Inkorporation synthetischer Bausteine in die Gramicidinsequenz ist grundlegend für gezielte Kanalfunktionen. Des Weiteren erfolgt die



Analyse der Struktur und der Funktion von modifizierten Ionenkanälen, die die Aufklärung über die Beziehungen von Struktur-Funktion sowie Struktur-Aktivität ermöglicht. Die Korrelation beider Analysen erlaubt Schlussfolgerungen über den Funktionsmechanismus des jeweiligen Kanalsystems. Anschließend kann über die Verwendung der angestrebten Ionenkanäle und deren Optimierung diskutiert werden.

Die Gründe warum das Gramacidinpeptid zur Untersuchung vielfältiger Aufgabenstellungen in Bezug auf Peptid-Lipid-Interaktionen eingesetzt wird, sind sehr zahlreich:

1. gA besitzt eine bekannte und relativ einfache Struktur
2. gA dient als Leitmotiv zur Entwicklung neuer Kanalsysteme
3. die Struktur ist chemisch modifizierbar
4. *self-incorporation* in Lipiddoppelschichten
5. Basis für zahlreiche praktische und theoretische Studien:
 - 5.1 Permeabilität bzw. Ionenselektivität
 - 5.2 Peptid-Lipid-Wechselwirkungen
 - 5.3 Molekular dynamische Simulationen
 - 5.4 Konformationsstudien an Membranpeptiden

Das zweite Thema dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und der konformationsanalytischen Strukturaufklärung neuer synthetischer β -Peptide als Peptidmimetika sowie deren α -helikalen Analoga. Mittels Circular dichroismus-spektroskopischer Analyse und tryptophanabhängiger Fluoreszenzuntersuchungen sollen die artifiziellen β -Peptide sowie ihre α -helikalen Analoga auf ihre Konformation und Membrangängigkeit untersucht werden.

Im Vergleich zu den Sekundärstrukturen in Proteinen sind die der β -Peptide nicht nur stabiler, facettenreicher und kompakter, sondern auch vorhersagbar und folglich bzgl. der Struktur-Funktionsbeziehung planbar. Damit eignen sie sich besonders für den gezielten Aufbau biomimetischer Systeme mit maßgeschneiderten Eigenschaften.

Zentrales Anliegen in der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Lipiden und verschiedenen biologisch relevanten sowie artifiziellen Peptiden wie Gramacidin A, Gramacidin A Derivate, β -Peptide sowie deren α -helikale Analoga. Aufgrund der enormen Komplexität natürlicher Membransysteme wurden die Untersuchungen nicht an biologischen Membranen, sondern an Modellbiomembranen durchgeführt.



Kapitel 2

PEPTID-LIPID-INTERAKTIONEN

Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Peptiden sind von grundlegender Bedeutung für die Funktion vieler membranvermittelter biochemischer Vorgänge wie inter- und intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse, Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, virale Fusionsprozesse aber auch Permeabilität durch die Membran.^[1, 2] Dies verdeutlicht das große pharmazeutische Interesse an der Erforschung dieser Prozesse mittels gezielter Steuerung der Peptid-Lipid-Interaktionen. In diesem Zusammenhang ist das Langzeitziel moderner Forschung in diesem Bereich, Protein- und Lipidfunktionalitäten vorher zu sagen und allgemeingültige Struktur- und Funktionsmotive zu identifizieren, um auf diese Weise ein besseres Verständnis über die dynamischen Prozesse biologischer Membranen zu erlangen.

Eine typische Biomembran enthält mehr als 100 unterschiedliche Lipidsorten, die sich in ihrer Kettenlänge, dem Sättigungsgrad der Acylketten und der hydrophilen Kopfgruppe unterscheiden.^[8] Die Dicke einer Membran wird streng von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Lipide kontrolliert. Daneben erhöht Cholesterol die Membrandicke, indem es die Acylketten stabilisiert. Allgemein lassen sich Lipide in drei Hauptkategorien zusammenfassen: Glycerophospholipide, Sphingolipide und Sterole sowie lineare Isoprenoide. Darunter können diese Membranbestandteile in glycosylierter Form (Glycolipide) vorkommen. Generell bewegen sich Lipide innerhalb einer Membran in drei unterschiedlichen Modi: rotierend, lateral und transversal.^[8]

Die Ausprägung amphipathischer, membranähnlicher und selbstassemblierender Struktur- bildung hängt mit der Geometrie der verwendeten Lipidmoleküle zusammen (Abb. 2.1). Zylinderförmige Lipidmonomere mit zwei hydrophoben Ketten wie z. B. Phosphatidyl- choline und -glycerine bevorzugen die Ausbildung von planaren Lipiddoppelschichten, wohingegen konusförmige Lipidmonomere eher zur Ausbildung von gekrümmten Doppelschichten und zur Bildung von Vesikeln tendieren. Keilförmige Lipidmonomere mit einer Acylkette wie z. B. Lysophospholipide oder Detergenzien neigen in polarer Umgebung



zur Mizellenbildung und in apolarer zur Bildung von inversen Mizellen. Aggregierte Lipidstrukturen werden durch die kooperative Summe vieler schwacher Wechselwirkungen stabilisiert und unter anderem von Peptiden in Phasen wie der lamellaren oder den sogenannten *non-bilayer* H_I - und H_{II} -Phasenkonfigurationen organisiert.^[8, 9]

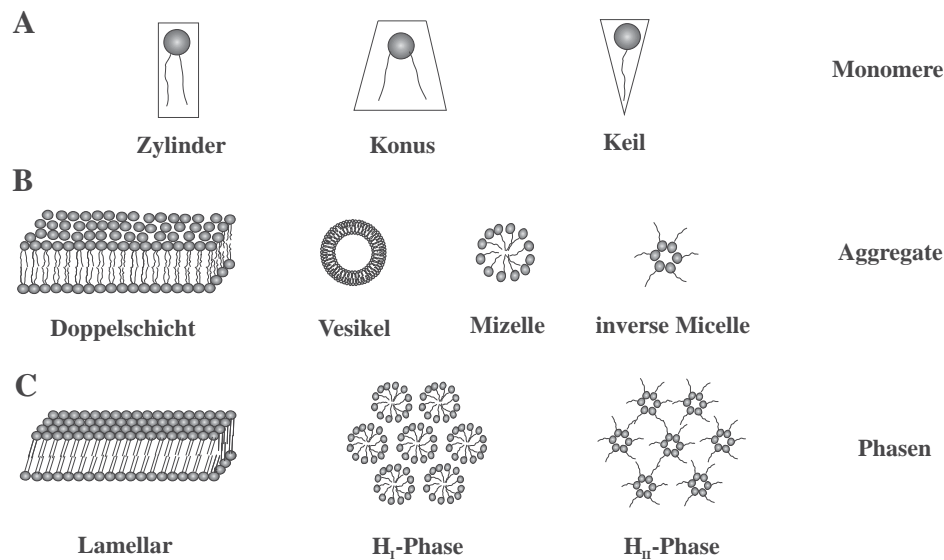


Abbildung 2.1 Polymorphes Phasenverhalten von Lipiden. **A** Unter Lipidmonomeren versteht man Molekülgeometrien wie Zylinder, Konus und Keil. **B** Lipidaggregate bestehen zumeist aus Doppelschichten, Vesikeln, Mizellen oder inversen Mizellen. Die Strukturausbildung der Lipide wird dabei von ihrem Packungsparameter vorgegeben. **C** Die Ausbildung von größeren Aggregatsystemen führt zur Phasenbildung, wie der lamellaren Phase, H_I -Phase und H_{II} -Phase. Modifiziert nach der Literatur von M. Luckey.^[8]

Die Asymmetrie und Heterogenität der Biomembran bestimmen die Aktivität der einzelnen Membranbestandteile.^[8] Besondere Aufmerksamkeit wird dabei der Frage nach der Existenz von Lipid-Domänen und dem Zusammenhang zwischen Konformation und funktionellen Eigenschaften von Membranpeptiden gewidmet. AFM-Studien (*atomic force microscopy*) zeigten laterale Organisation von Lipiden und Proteinen in Membranen, die geringfügig dicker als andere Membranbereiche sind.^[10] Diese sogenannten *lipid rafts* weisen einen hohen Anteil an Sphingolipiden und Cholesterol auf und sind in Prozesse wie *lipid trafficking* und *protein targeting* involviert.^[8] *Rafts* unterscheiden sich in ihrer Lipid- sowie Protein-zusammensetzung und somit auch in ihrer Funktion, der Lebensdauer und Größe. So ist die Heterogenität von Domänen die direkte Konsequenz aus Lipid-Lipid und Protein-Lipid-Interaktionen, die diese formieren.^[11, 12]



Bei der Formierung biologischer Membranen ist der hydrophobe Effekt ein essentieller Faktor, da dieser die Haupttriebkraft für die Assoziation von Lipid- sowie Peptidverbänden zu Membranen darstellt. Demnach versteht man unter dem hydrophoben Effekt die Tendenz unpolare Moleküle, sich in Wasser zu größeren Aggregaten zusammenzulagern, um die Entropieabnahme durch die Ausbildung geordneter Wasserstrukturen möglichst gering zu halten.^[13, 14] Daher muss zur Stabilisierung der aggregierten Struktur die Oberfläche, die mit dem wässrigen Medium in Kontakt kommt, so minimal wie möglich gehalten werden. Die thermodynamische Stabilität einer Membran bzw. der hydrophobe Effekt maximieren die Wasser-Wasser-Wechselwirkungen außerhalb und Lipid-Lipid-Wechselwirkungen innerhalb der Membran, während die entropisch ungünstige, direkte Interaktion zwischen dem Wasser und den Lipidketten minimiert wird. So erklärt der hydrophobe Effekt die zur Membranbildung nötige Energetik. Neben den hydrophoben und hydrophilen Effekten sind darüber hinaus auch Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte in die Bildung von Membranen involviert.^[8, 15]

Das Wechselspiel von Membranlipiden und -proteinen bildet die Grundlage für das Verständnis vieler struktureller und funktioneller Vorgänge auf molekularer Ebene. Diese Interaktionen sind vielfältiger Natur und unterliegen diversen Faktoren, die für ein gegebenes Peptid in gegebenen Lipidzusammensetzungen einzeln zu betrachten sind.

Porenbildende Mechanismen beschreiben sehr effektiv die Wechselwirkungen zwischen Peptiden und Lipiden.^[16] Zur Charakterisierung dieser Peptid-Lipid Assoziationen werden drei Modelle, die sogenannten *carpet*, *toroidal* und *barrel stave* Mechanismen herangezogen (Abb. 2.2).^[16]

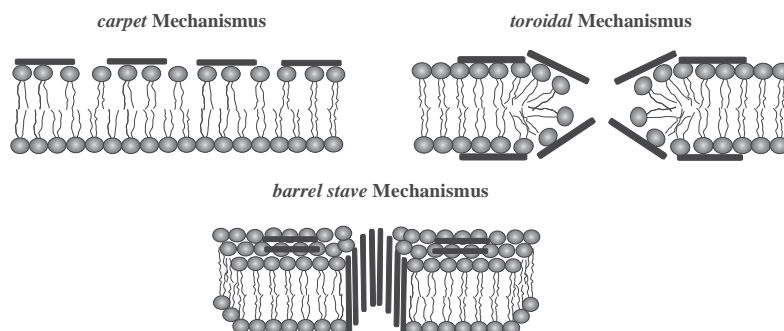


Abbildung 2.2 Porenbildende Mechanismen antimikrobieller Peptide. *Carpet*, *toroidal* und *barrel stave* Mechanismen stellen die gängigsten Aktivitätsmechanismen zur Beschreibung der Peptid-Lipid-Assoziationen dar. Modifiziert nach der Literatur von J. M. Sanderson.^[16]



Hierbei ist der Initialschritt dieser Mechanismen die Bindung von Peptiden an die Membranoberfläche. So sind viele antimikrobielle Peptide, die als Kationen vorliegen, in der Lage, mittels Coulomb-Anziehungskräften an die Oberfläche von negativ geladenen Membranen zu binden und sich in diese einzulagern.^[16] Dabei geht bei Oberflächenkontakt ein Großteil der Peptide Konformationsänderungen ein. Der *carpet* Mechanismus beschreibt dabei zunächst die Anlagerung der Peptide an die Membranoberfläche und bei einer ausreichend hohen Peptidkonzentration die Einlagerung in die Membran. Bei *toroidal* und *barrel stave* Mechanismen führt die Selbstassoziation der Peptide zur Ausbildung von Poren (Abb. 2.2). Die jeweiligen Mechanismen hängen von der Beschaffenheit der Peptide und Lipide sowie von ihrem Verhältnis zueinander ab.^[16, 17]

Nach langjährigen Studien von Peptiden bzw. Proteinen in Membranen ist man zur Schlussfolgerung gekommen, dass Peptid-Lipid-Interaktionen sich zwar durch enorme Komplexität und Vielfalt auszeichnen, aber im Einzelnen dennoch gezielt steuerbar sind. Faktoren wie die Kettenlänge und der Sättigungsgrad der Matrixlipide, Additive wie Cholesterol, Temperatur u. v. a. können variiert werden und daher Einfluss auf die Peptide und die Gesamtheit der Membran ausüben.^[8] EPR- und FRET-Studien (*Electron Paramagnetic Resonance* und *Fluorescent Resonance Energy Transfer*) an diversen Proteinen zeigten, dass viele Membranproteine bzw. Enzyme spezifische Lipide oder Lipidklassen erfordern, um sich in eine Membran einzubauen bzw. Aktivität auszuüben.^[18-20] Denn nicht nur Membranlipide beeinflussen Peptid- und Proteinkonformationen sowie ihre Organisation und Aggregationsverhalten innerhalb dieser, sondern auch Proteine bzw. Peptide die Lipide in ihrer Struktur und ihrem Phasenverhalten. So bedeutet die gegenseitige Einflussnahme eine induzierte Selbstorganisation der Peptide und der Lipide innerhalb von Membranen.^[21, 22] Dabei werden Struktur und Funktion eines Polypeptids sowie seine integrale oder periphere Anordnung in der Membran entscheidend durch die Aminosäuresequenz geprägt.^[1] Ein hydrophob aufgebautes Peptid lagert sich daher integral in die Membran ein, da die Einlagerung durch die hydrophobe Umgebung der Alkylketten energetisch begünstigt wird. Ein hydrophil aufgebautes Peptid hält sich bevorzugt peripher an der Membranoberfläche bzw. im wässrigen Milieu auf. Peptide, aufgebaut sowohl aus hydrophoben als auch aus hydrophilen Aminosäuren, weisen aufgrund vielfältiger Seitenketten-Lipid-Interaktionen auch unterschiedliches Verhalten in der Membran auf. So stellen Wechselwirkungen zwischen Peptiden und Lipiden nichtkovalente Kräfte dar. Dazu gehören spezifische Bindungskräfte wie Van-der-Waals-Kräfte zwischen den hydrophoben Acylketten der Lipide und



transmembranen Domänen der Peptide sowie Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Anziehungskräfte zwischen Phosphatkopfgruppen der Lipide und hydrophilen Einheiten der Peptide.^[1, 2] Seitenketten-Seitenketten sowie Seitenketten-Lipid-Interaktionen steuern und beeinflussen auch die Mobilität von Peptiden sowie die Beweglichkeit der Seitenketten von Peptiden innerhalb einer Membran.^[8]

Das Wissen über Struktur und Dynamik biologischer Membranen sowie die darin enthaltenen Peptide basiert zu großen Teilen auf biophysikalischen Studien an künstlichen Lipiddoppelschichten. Durch die definierte Lipidzusammensetzung der Modellmembranen ist es möglich, spezifische physikalisch-chemische Membraneigenschaften wie zum Beispiel die Membranfluidität festzulegen.^[23]

Dieses Kapitel lässt die Schlussfolgerung zu, dass Membran-Peptid-Interaktionen so vielfältig sind und in ihrer Natur von der jeweiligen Membranzusammensetzung sowie von den betrachteten Peptiden abhängen, dass kein allgemeingültiges Modell gegeben werden kann; es können jedoch Ansätze und Annahmen zu dieser Thematik postuliert werden.