

1. Einleitung

Peptide, Proteine und Nucleinsäuren bilden die grundlegenden molekularen Elemente der Biologie und agieren u. a. als Botenstoffe, Katalysatoren und Informationsspeicher. Die funktionellen Eigenschaften werden dabei maßgeblich durch die Konformation bestimmt. Daher ist das Verständnis auf molekularer Ebene von entscheidender Bedeutung und eröffnet vielfältige Möglichkeiten biochemische Prozesse zu kontrollieren. Immer häufiger wird die chemische Synthese biologischer Moleküle einer Expressierung und Isolierung vorgezogen, da eine gezielte Modifikation mit nicht natürlichen Aminosäuren sowie weitere Funktionalisierungen möglich sind.^[1,2]

Ein Drittel aller Proteine sind Transmembranproteine und bilden neben den Lipiden die Hauptkomponente der biologischen Membran. Sie besitzen eine Vielzahl an Funktionen und fungieren dabei als Enzyme und Rezeptoren, Katalysatoren für den Transport von Ionen und kleinen Molekülen durch die Membran oder sind an inter- und intrazellulären Signaltransduktionsprozessen beteiligt.^[3-6] Die Wechselwirkung zwischen Lipiden und Peptiden nimmt dabei eine Schlüsselrolle ein und stellt bis heute ein intensives Forschungsziel in Medizin und Pharmazie dar.^[7] Die Aktivität von Membranproteinen hängt sowohl von der Erkennung und Anordnung ihrer unterschiedlichen Proteindomänen ab als auch von deren Wechselwirkungen mit der Membran.^[3] Um die Interaktion zwischen artifiziellen Peptiden und der Membran zu untersuchen, sollen in dieser Arbeit β -Peptide für das Design von Transmembranhelices genutzt werden. Bereits kurze β -Peptide von sechs Aminosäuren bilden stabile Sekundärstrukturen mit hohem Helixanteil aus und erweisen sich als besonders stabil gegenüber proteolytischem Abbau.^[8,9] β -Peptide wurden bereits von DEGRADO *et al.* genutzt, um eine Lipiddoppelschicht zu durchspannen und mit Transmembrandomänen zu interagieren.^[10,11]



In der vorliegenden Arbeit sollen β -Peptide mit verschiedenen hydrophoben Seitenketten synthetisiert und hinsichtlich ihrer Konformation vor und nach der Membraninkorporation mittels CD-Spektroskopie untersucht werden. Die Bestimmung von Lage und Orientierung innerhalb verschiedener Modellmembranen soll mittels Fluoreszenzemissions- und ATR-FTIR-Spektroskopie erfolgen. Durch das grundlegende Verständnis der Peptid-Membran-Interaktion könnte langfristig eine gezielte Steuerung der membranvermittelten biochemischen Prozesse möglich sein.

In einem weiteren Teilprojekt sollen Peptidnukleinsäuren reversibel mit Nucleobasen funktionalisiert werden. Peptidnukleinsäuren sind DNA-Analoga, welche zur spezifischen Erkennung von DNA eingesetzt werden.^[12] Um eine spezifische PNA-Sequenz mittels DNA-Templat zu generieren, ist ein reversibler Nucleobasenaustausch notwendig.^[13] Die von GHADIRI *et al.* entwickelte Thioester-Peptidnukleinsäure (tPNA) ermöglicht eine reversible Funktionalisierung mit Nucleobasen, was in dieser Arbeit angewendet werden soll.^[14] Dabei sollen α -helikale cysteinreiche Peptide durch einen Thioesteraustausch reversibel mit Nucleobasen funktionalisiert und die Gleichgewichtseinstellung mit und ohne Steuerung eines DNA-Templates beobachtet werden. Ein sequenzspezifischer Austausch der Nucleobasen könnte zu neuen Anwendungsmöglichkeiten in der enzymatischen Katalyse beitragen.

2. Peptid-Lipid-Wechselwirkung

2.1 Lipid-Lipid-Interaktionen

Biologische Membranen sind komplexe Mischungen aus einer Vielzahl unterschiedlichen Lipiden und Proteinen.^[15] SINGER und NICOLSON entwickelten das Flüssigmosaik-Modell zur Beschreibung biologischer Membranen,^[16] welches über die Jahre aufgrund neuer Erkenntnisse im Bereich der strukturierten Anordnung von Membranproteinen modifiziert wurde.^[17,18] Die Lipide in biologischen Membranen unterscheiden sich in ihrer Grundstruktur, der Länge, dem Sättigungsgrad der hydrophoben Acylketten und in der Struktur ihrer hydrophilen Kopfgruppen. Auf diese Weise bestimmen sie Membraneigenschaften wie Dicke, Elastizität und Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m .^[19,20] Dicke und Widerstandsfähigkeit der Membran werden zusätzlich durch die Einlagerung von Cholesterol erhöht, was zu einer Stabilisierung der Lipidmoleküle führt.^[21] In Biomembranen lassen sich die Lipide in drei Hauptklassen einteilen, in Glycerophospholipide, Sphingolipide sowie Sterole und lineare Isoprenoide. Innerhalb der Membran treten grundsätzlich laterale und transversale Bewegungen der Lipide auf.

Aufgrund ihres amphiphilen Charakters bilden Lipide abhängig von der Grundstruktur und der daraus resultierenden Geometrie unterschiedlich organisierte Aggregate im wässrigen Medium (Abb. 2.1).^[22] Die Packungseigenschaften der Lipide bestimmen somit die Lipidaggregation. Lipidmoleküle mit großen polaren Kopfgruppen (z. B. Lysophosphatidylcholin mit nur einer Acylkette) aggregieren im wässrigen Medium bevorzugt in Mizellen (positive Krümmung) und im apolaren Medium in inversen Mizellen (negative Krümmung). Inverse Mizellen entstehen auch durch eine konusförmige Lipidstruktur (Phos-



phatidylethanolamin). Durch eine zylindrische Geometrie bzw. eine abgeschnittene Kugelform, wie sie Phosphatidylglycerine oder -choline aufweisen, werden planare Lipiddoppelschichten bzw. Vesikel ausgebildet.^[23,24]

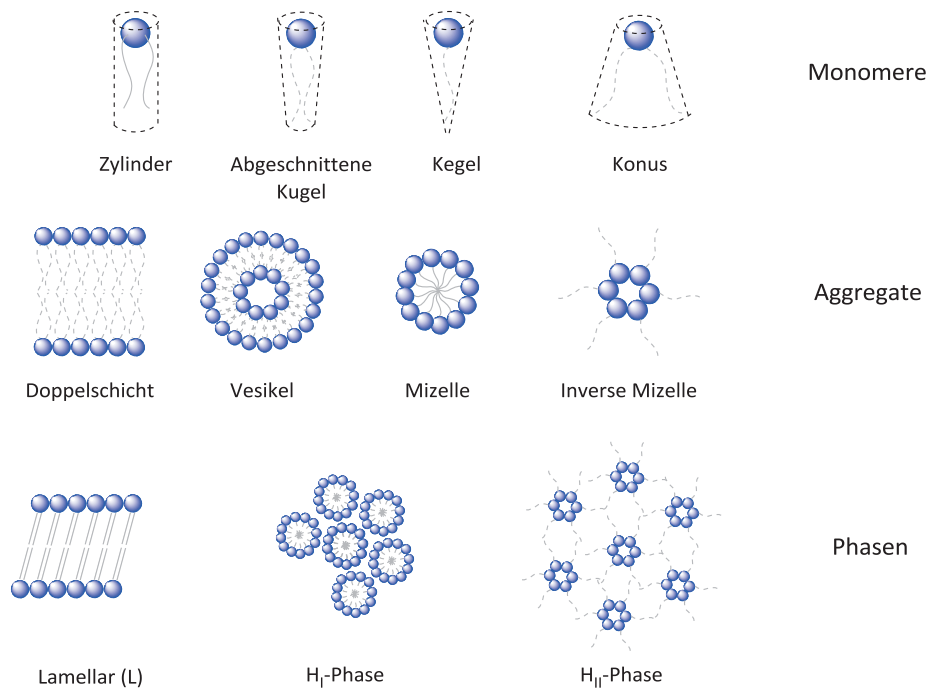


Abb. 2.1: Die Darstellung zeigt den Zusammenhang zwischen der Molekülgeometrie und den daraus resultierenden Aggregaten und Phasen. Lipidmonomere treten in unterschiedlichen Formen, wie Zylinder, abgeschnittene Kugel, Keil oder Konus auf und bilden durch Selbstaggregation häufig Doppelschichten, Vesikel, Mizellen oder inverse Mizellen aus. Die lamellare Lipidphase sowie die hexagonale Phase I und II resultieren aus den größeren Aggregaten. Verändert nach LUCKEY.^[22]

Durch eine zylindrische Geometrie bzw. eine abgeschnittene Kugelform, wie sie Phosphatidylglycerine oder -choline aufweisen, werden planare Lipiddoppelschichten bzw. Vesikel ausgebildet.^[23,24] Der Lipidaggregatbildung liegt der hydrophobe Effekt^[25] zugrunde, welcher zu einer Minimierung von Lipid-Wasser-Wechselwirkungen führt und eine entropische Begünstigung bewirkt.^[4] Durch Aggregation resultieren unterschiedliche Phasenzustände, wie die hexagonalen Phasen oder die lamellare Phase in Doppelschichten. Lipide, welche die Ausbildung der H_{II}-Phase bevorzugen,^[26,27] sind in Membranprozessen *in vivo* involviert, z. B. bei der Membranfusion während der Exocytose.^[23,28] Die in Lipiddoppelschichten beobachteten lamellaren Phasen L_β und L_α (Gelphase bzw. flüssig-kristalline Phase) sind für Proteininteraktionen essentiell. In der Gelphase L_β liegen die



Kopfgruppen dicht gepackt und die aliphatischen Lipidketten geneigt in einer *all-trans* Konformation vor. Aufgrund großer VAN-DEER-WAALS-Wechselwirkungen kommt es zur Bewegungseinschränkung der Lipidmoleküle. Steigende Temperatur führt zur Rotation um die C-C-Bindungen, wodurch eine höhere Dynamik der Lipidmoleküle gegeben ist. Die daraus resultierende fluide oder flüssig-kristalline Phase L_{α} weist eine geringere Membrandicke und eine schnellere Diffusion der Lipidmoleküle (seitwärts bzw. „Flip-Flop“) auf.^[4,23,29] Obwohl die Eigenschaften der fluiden Phasen für viele biologische Prozesse entscheidend sind, bilden sich in biologischen Membranen separierte cholesterolreiche Regionen aus.^[29] Die Interkalation von Cholesterol bevorzugt zwischen Sphingolipiden führt zu phasenseparierten Domänen, den sogenannten *lipid rafts*.^[30] Diese liegen aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit der Lipidmoleküle, in der Gelphase vor. Die daraus resultierende Mischphase – flüssig-geordneter Zustand – ist ein Intermediat zwischen Gelphase und fluider Phase.^[31] *Rafts* stabilisieren die Membran und begünstigen die Peptid-Lipid-Interaktion,^[30] weshalb diese essentiell beim Einbau und Transport von Proteinen in die Membran^[32] oder der Signalübertragung^[33,34] zwischen Zellen sind.

2.2 Peptid-Lipid-Interaktionen

Die Interaktion zwischen Lipiden und Proteinen beeinflusst entscheidend den Einbau und die Funktion von Membranproteinen und ist abhängig von der Lipidzusammensetzung und der Art der Proteine.^[35] Struktur und Funktion der Peptide werden durch die Aminosäuresequenz beeinflusst und lassen Rückschlüsse auf die Lokalisierung der Proteine zu. Periphere Membranproteine mit einem hohen hydrophilen Aminosäureanteil interagieren über elektrostatische Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrücken direkt mit den Lipiden oder über in der Zelloberfläche vorhandene Gruppen, wie G-Protein-Rezeptoren.^[23,36] Integrale Membranproteine mit einem hohen hydrophoben Aminosäureanteil durchspannen die Lipidschicht und interagieren über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Acylketten. Ein Unterschied in der Länge der hydrophoben Proteinregion und der Membrandicke resultiert in einem *hydrophobic mismatch*.^[37] Dabei kann eine Längenva-riation von zehn Aminosäuren, abhängig von deren Zusammensetzung, in einem membrandurchspannenden Segment toleriert und angepasst werden.^[37,38] Entsprechende An-



passungen an einen *hydrophobic mismatch* sind abhängig vom Größenunterschied zwischen der hydrophoben Region der Proteine und dem hydrophoben Membranbereich (Abb. 2.2).^[23]

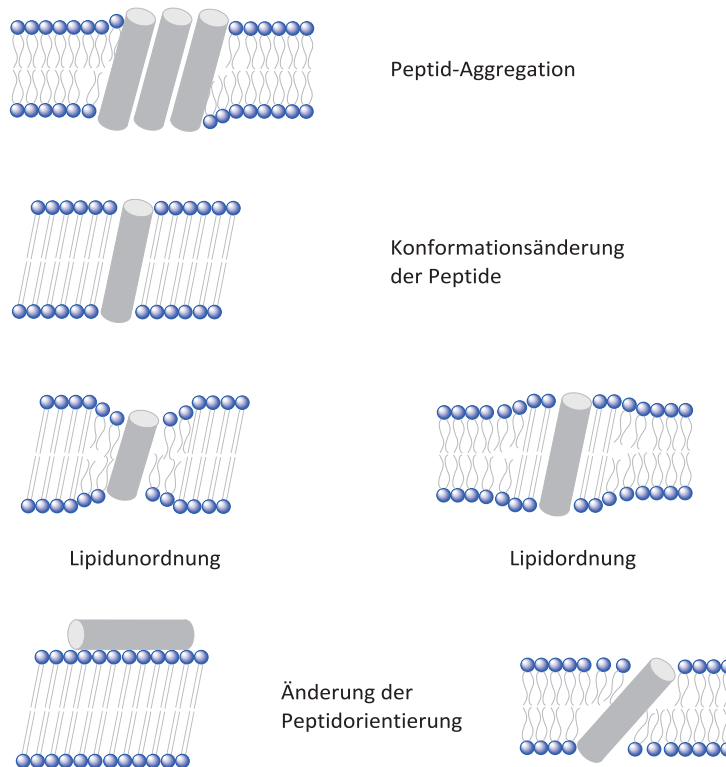


Abb. 2.2: Mechanismen zur Anpassung eines Peptid-Lipid-Systems an einen *hydrophobic mismatch*. Neben Aggregation, Konformations- und Orientierungsänderung der Peptide treten Modifizierungen der Membraneigenschaften auf. Verändert nach SANDERSON.^[23]

Der Anpassung der Proteine liegt entweder eine Konformationsänderung im Protein selbst oder eine Modifikation der Membraneigenschaften zu Grunde. Transmembranproteine, welche im Vergleich zur Membrandicke einen verhältnismäßig langen hydrophoben Bereich aufweisen, minimieren durch Aggregation die Wechselwirkung mit den hydrophilen Kopfgruppen. Alternativ kann die Länge der hydrophoben Sequenz durch Kippen oder durch eine Konformationsänderung im Protein (Stauchung) angepasst werden. Durch die Streckung der Acylketten ist eine Anpassung der Membrandicke möglich, die zu einer Lipidordnung führt. Bei einem zu kurzen hydrophoben Bereich der Proteine sind ebenfalls Aggregationen oder Konformationsänderungen im Rückgrat bzw. Änderungen der Seitenkettenorientierungen möglich. Die Membrandicke kann durch eine Lipidunordnung in den Acylketten oder eine Unterbrechung der lamellaren Phase angepasst werden.

Eine Oberflächenlokalisierung tritt nur bei zu kurzen Peptiden auf, bei denen eine Membrananpassung nicht möglich ist. Grundsätzlich treten auch Kombinationen der Anpassungseffekte auf.^[23,37]

Aufgrund der Heterogenität der Lipide in biologischen Membranen wird die Interaktion und Adaption der Proteine an den hydrophoben Bereich erleichtert.^[37] Dabei kann die Wechselwirkung zwischen Peptid und Membran durch Länge und Sättigungsgrad der Acylketten, Temperatur und Cholesterolgehalt beeinflusst werden und wirkt sich auf die Struktur, Mobilität und Funktion von Proteinen aus.^[35] Proteine, wie die Ca^{2+} -ATPase werden in ihrer Aktivität beispielsweise durch die Membrandicke entscheidend beeinflusst. Entsprechend erfordern viele Membranproteine spezifische Lipide für die Inkorporation und Funktion, was den komplexen Zusammenhang sowohl von Peptid- als auch Lipideigenschaften auf die Organisation deutlich macht.^[39,40] Untersuchungen dieser komplexen Wechselwirkungen an artifiziellen Lipiddoppelschichten liefern grundlegende Erkenntnisse zur spezifischen Organisation von Peptiden und damit der Steuerung biochemischer Vorgänge in der Membran.

2.3 Peptid-Erkennung innerhalb der Membran

Die Organisation hauptsächlich von α -Helices innerhalb der Membran führt zur Ausbildung von definierten Tertiärstrukturen in Proteinen mit entsprechenden Eigenschaften zur Steuerung zellulärer Prozesse. In welchem Ausmaß Polarität, Wasserstoffbrückenbindungen und VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen in der Faltung und Assoziation von Transmembrandomänen eine Rolle spielen, ist bisher nur wenig erforscht. Jedoch unterscheiden sich die thermodynamischen Kräfte zwischen der Wechselwirkung von wasserlöslichen Proteinen und Membranproteinen grundlegend.^[41]

Die Ausbildung von Membranproteinen durch die Organisation von Transmembrandomänen basiert auf dem von POPOFF und ENGELMAN postulierten und später angepassten Zweiphasen-Modell.^[42,43] Die erste Phase ist die über hydrophobe Seitenketten gesteuerte Einführung in die Membran. Dabei verankern aromatische und positiv geladene Seitenketten an den *N*- und *C*-terminalen Enden die Peptide und richten diese senkrecht zur Membran



aus. Die Helixinteraktion innerhalb der Membran, welche auch als *knobs-into-holes* beschrieben wird,^[44] stellt die zweite Phase im Modell dar und wird maßgeblich von elektrostatischen und VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen beeinflusst.^[45]

Der membrandurchspannende Bereich von Proteinen ist hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut, in denen hydrophile Reste eher selten vorkommen.^[46] Polare bzw. geladene Aminosäuren sind dennoch in den Sequenzen zu finden und sollen essentiell zur Struktur und Funktion beitragen.^[47–49] Grundsätzlich vermitteln Packungsmuster, wie GxxxG in Kombination mit polaren Resten die Interaktion innerhalb der Membran.^[50–52] Dabei induzieren polare Seitenketten, wie z. B. Gln, Arg, Glu, Asp und Asn eine starke Helixassoziation. Interaktionen zwischen einzelnen Seitenketten mit weniger polaren Gruppen, wie Ser und Thr, sind dagegen zu schwach für eine Erkennung zwischen zwei Helices.^[53] Die spezifischen Wechselwirkungen sind bevorzugt, wenn entsprechende Reste auf dem gleichen Level innerhalb der Membran verankert sind.^[54]

Wasserstoffbrücken-vermittelte und elektrostatische Interaktionen sowie Wechselwirkungen zwischen neutralen polaren Seitenketten wurden bereits zur Peptiderkennung innerhalb von Lipiddoppelschichten genutzt. Dabei bildeten mit komplementären Nukleobasen oder unterschiedlich geladenen Aminosäuren funktionalisierte *Hairpin*-Strukturen das zu organisierende Grundgerüst (Abb. 2.3).^[55]

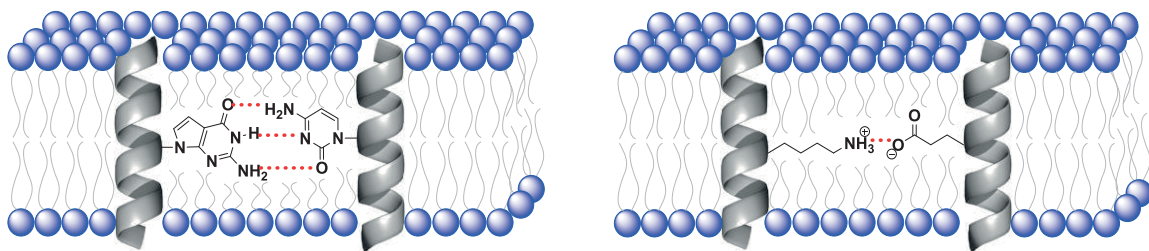


Abb. 2.3: Schematische Darstellung von verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten innerhalb von Membranen. Basenpaarererkennung zwischen Guanin und Cytosin (links) als auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einem positiv geladenen Lysin und einer negativ geladenen Glutaminsäure sollen Peptidaggregationen ermöglichen. Verändert nach MÜLLAR.^[55]

Eine verbesserte Steuerbarkeit dieser Interaktionen auf Grundlage konformationell stabiler β -Peptide stellt eine gute Möglichkeit zur Bildung von Dimerstrukturen dar und könnte weitere Erkenntnisse über die komplexen Zusammenhänge zwischen Peptid-Lipid-Wechselwirkungen und der Organisation von Peptiden innerhalb der Membran liefern.

3. β -Peptide

Peptide und Proteine sind an lebenswichtigen biologischen Prozessen beteiligt und vermitteln verschiedene Funktionen, wie z. B. enzymatische Katalyse, Signalübertragung und Transport. Die kleinste funktionelle Einheit in Proteinen bilden die 20 proteinogenen Aminosäuren. Während sich Proteine in Wasser in wohldefinierte dreidimensionale Strukturen falten, ist es kürzeren Peptiden oft erst durch die Bindung an passende Rezeptoren möglich entsprechende Strukturen auszubilden. Die biologischen Eigenschaften und Funktionen beider hängen jedoch von der Ausbildung gefalteter Konformationen ab. Gebildet werden diese tertiären Konformationen ausgehend von Sekundärstrukturelementen, wie α -Helices, β -Faltblättern und Schleifen.^[4,56]

Während der letzten Jahrzehnte zeigte sich jedoch, dass nicht nur α -Aminosäuren alleine in der Lage sind, einzigartige Strukturen auszubilden. β -Aminosäuren stellen weitere essentielle Bausteine zur Ausbildung einer Vielzahl an stabilen Sekundärstrukturen dar. Dabei zählt das β -Alanin zu den wohl bekanntesten natürlichen Vertretern der Aminosäureanaloga und ist Bestandteil des Coenzym A. In der Natur kommen β -Aminosäuren weiterhin in vielen hochaktiven Bestandteilen bestimmter Pflanzen, als Zwischenprodukte einiger Stoffwechselwege oder als makrocyclische Peptide, sogenannte Jasplakinolide^[57], in marinen Schwämmen vor.^[58] Natürlich vorkommende oligomere β -Peptide, sogenannte Foldamere (*fold*, engl. falten) sind jedoch nicht bekannt.^[8] β -Peptide zeichnen sich durch ihre hohe Stabilität hinsichtlich eines proteolytischen Abbaus aus, d. h. sie können durch Proteasen und Peptidasen nicht zersetzt werden.^[59,60] Dies führt zu einer hohen Bioverfügbarkeit, weshalb großes Interesse an der Herstellung pharmazeutisch wirksamer β -Peptidmimetika als neuartige Antibiotika besteht. Nicht nur aus diesem Grund stellen



die Synthese und der Vergleich von β -Peptiden zu ihren α -Analoga ein intensives Forschungsziel dar. Neue Erkenntnisse über Peptid-Peptid- bzw. Peptid-Protein-Wechselwirkungen bilden die Grundlage für das Design neuer biomimetischer Strukturen.^[61]

3.1 β -Aminosäuren

Die β -Aminosäuren unterscheiden sich durch eine zusätzliche Methylen-Einheit von ihren natürlich vorkommenden α -Analoga. Durch die Homologisierung ergeben sich eine zusätzliche Rotationsachse und der Torsionswinkel θ . Die daraus resultierende Möglichkeit vier anstatt zwei Substituenten zu variieren, führt zu einer weitaus größeren Vielfalt an Konstitutions- und Konformationsisomeren (Abb. 3.1).^[62]

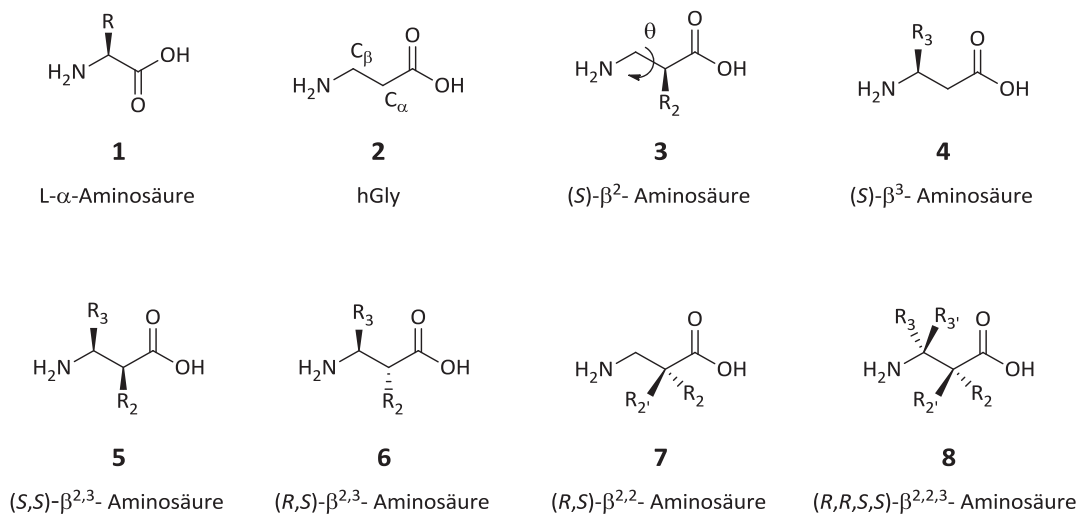


Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer α -Aminosäure **1** im Vergleich zu den möglichen β -Aminosäuren **2-8**.

Die Aminfunktionalität befindet sich in β -Position zur Carboxylgruppe, was die Nomenklatur der β -Aminosäuren bedingt. Das β -Alanin **2** stellt den einfachsten Vertreter dar, weist keine Seitenketten auf und ist demzufolge achiral. In der Literatur ist häufig auch die Bezeichnung hGly - Homoglycin - anstelle von β -Alanin zu finden. Eine Substitution mit einem Seitenrest ist an den Positionen C_α und C_β möglich und führt zu der von SEEBACH verwendeten Bezeichnung β^2 -Aminosäure **3** bzw. β^3 -Aminosäure **4**.^[8] Eine Mehrfachsubstitution der β -Aminosäuren ist ebenfalls möglich (**5-8**). Vor allem der C_α - C_β -Bindungswinkel θ und



die Position und Anzahl der Substituenten bedingen die Ausbildung unterschiedlicher Sekundärstrukturen.^[62] Damit können entsprechend der α -Peptide ebenfalls Vorüberlegungen getroffen werden, um gewünschte Strukturen zu erreichen (Abschnitt 3.2).

Neben den gerade beschriebenen azyklischen β -Aminosäuren, welche sich durch Homologisierung ihrer entsprechenden α -Analoga generieren lassen, existieren zyklische Bausteine ohne natürliche Vorlage. Sowohl *trans*-2-Aminocyclohexancarboxylsäure (ACHC) als auch *trans*-2-Aminocyclopentancarbonsäure (ACPC) werden häufig verwendet, um bestimmte Sekundärstrukturen zu induzieren.^[63]

3.2 Sekundärstrukturen

Trotz der Verlängerung im Rückgrat sind β -Peptide in der Lage, stabile Sekundärstrukturen auszubilden. Durch strukturelle Untersuchungen von kurzen β -Peptiden mittels Kristallographie, CD- und NMR-Spektroskopie konnten die Arbeitsgruppen von SEEBACH und GELLMAN die Ausbildung unterschiedlicher helikaler Strukturen klassifizieren.^[64,65] Dabei erfolgte die Synthese der Oligomere ausgehend von den enantiomerenreinen β -Aminosäuren. Die Analysen zeigen, dass verglichen mit den α -Peptiden eine größere Vielfalt der Sekundärstrukturen durch die zusätzliche Rotationsmöglichkeit der Methylengruppe resultiert. Konfigurationsabhängig bilden sich unterschiedliche helikale Strukturen wie z. B. die 12-Helix, 14-Helix oder 10/12-Helix, sowie weitere in Abb. 3.2 dargestellte Konformationen aus.^[9]

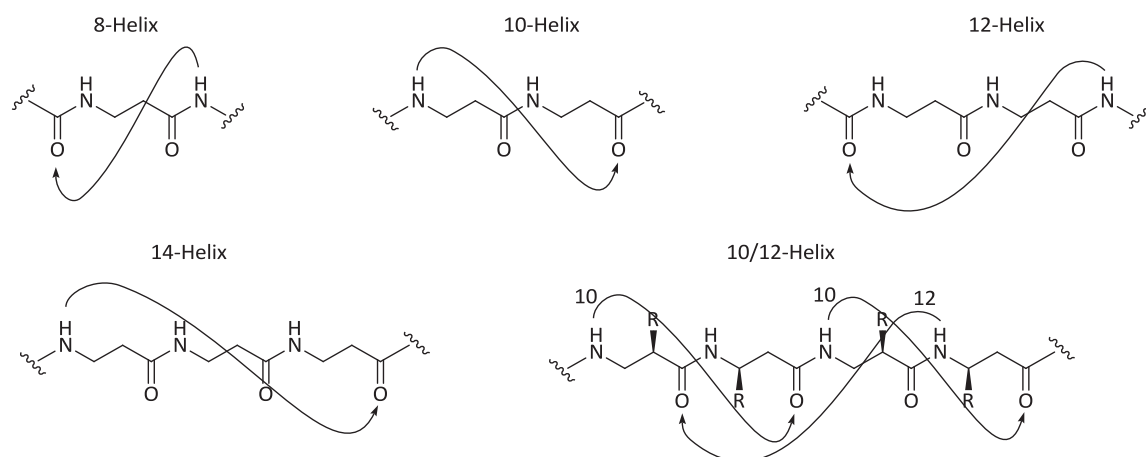


Abb. 3.2: Schematische Darstellung möglicher Sekundärstrukturen für β -Peptide. Die Ausbildung über entsprechende Wasserstoffbrückenbindung bedingt die Nomenklatur.^[9]



Die Nomenklatur der Helices liegt begründet in der Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen, welche zu verschiedenen großen Ringstrukturen führen und der Sekundärstruktur zugrunde liegen. Eine 14-Helix bildet einen 14-gliedrigen Ring durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Amidproton N-H der Aminosäure i und der Carbonylfunktion C=O der Aminosäure $(i+2)$ aus. Folglich entsteht ein 12-gliedriger Wasserstoffbrückenring zwischen der NH-Gruppe der i -ten Aminosäure und der $(i-3)$ Aminosäure entfernten C=O Funktionalität bei der Ausbildung einer 12-Helix.^[9,66] Analog dazu bilden sich die 8- und 10-Helices mit 8- bzw. 10-gliedrigem Ring. Die 8-Helix konnte durch Cyclopropanringe an C_α realisiert werden,^[67] wohingegen die 10-Helix von FLEET *et al.* unter Verwendung vier-gliedriger Ringe dargestellt wurde.^[68] Eine besondere Sekundärstruktur stellt die 10/12-Helix dar, da diese aus alternierenden 10- und 12-gliedrigen Wasserstoffbrückenringen aufgebaut ist. Erreicht wird die 10/12-Helix durch eine Peptidsequenz mit wechselnden β^2 - und β^3 -Aminosäuren der gleichen Konfiguration. Der signifikante Unterschied zu den anderen Helixformen liegt in der Orientierung der Carbonylgruppen, welche abwechselnd nach oben bzw. unten ausgerichtet sind. Dies resultiert in einem fehlenden Dipolmoment der Helix.^[69,70] Die Anzahl und Konfiguration der Substituenten in C_α - und C_β -Position bedingt den Torsionswinkel θ . Dabei nehmen monosubstituierte β -Aminosäuren und $\beta^{2,3}$ -Aminosäuren der (S,S) - bzw. (R,R) -Konfiguration bevorzugt die *gauche*-Konformation ein. Die dadurch favorisierte helikale Sekundärstruktur weist einen Torsionswinkel von 60° für θ auf.^[61] Dagegen bilden (R,S) - bzw. (S,R) konfigurierte $\beta^{2,3}$ -Aminosäuren bevorzugt Faltblattstrukturen aus, bedingt durch die Einnahme der *trans*-Konformation mit einem Torsionswinkel von $\theta = 180^\circ$.^[71] Auch weitere Sekundärstrukturen für β -Peptide, wie Schleifen^[72,73], Haarnadeln^[74–76] und parallele und antiparallele Faltblätter^[77,78] wurden bereits gefunden.

Die 14-Helix und 12-Helix der β -Peptide sind in dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung, weshalb beide Strukturen im Folgenden näher beschrieben und mit einer α -Helix verglichen werden (Abb. 3.3). Die Beschreibung und Klassifizierung der β -Peptide ist nach BALARAM^[79] anhand der Torsionswinkel ω , ϕ , θ und ψ analog zu den α -Peptiden möglich. Aufgrund der Ausbildung unterschiedlich großer Wasserstoffbrückenringe resultieren verschiedene Sekundärstrukturen, welche sich in der Anzahl der Aminosäurereste pro Win-

dung, dem Radius und der Ausrichtung des Dipolmomentes unterscheiden. In einer Windung der α -Helix sind 3.6 Aminosäurereste enthalten, bei der 12-Helix sind es 2.5 und in der 14-Helix 3 Aminosäuren. Damit weist die 14-Helix eine abgeschlossene Windung auf, wodurch die Position jedes dritten Seitenkettenrestes über einander orientiert vorliegt. Durch Kristallstrukturanalyse und molekulardynamische Simulationen wurde eine Ganghöhe von ca. 5 Å bei der 14-Helix gefunden.^[8,80] Bei drei Aminosäuren pro Windung resultiert dies in einem Anstieg von ca. 1.7 Å pro Aminosäure. Dagegen ist in der 12-Helix ein Anstieg von ca. 2.1 Å pro Aminosäure gegeben. Bei gleicher Sequenzlänge führt dies bei der 12-Helix zu einer Verlängerung der Helixachse.

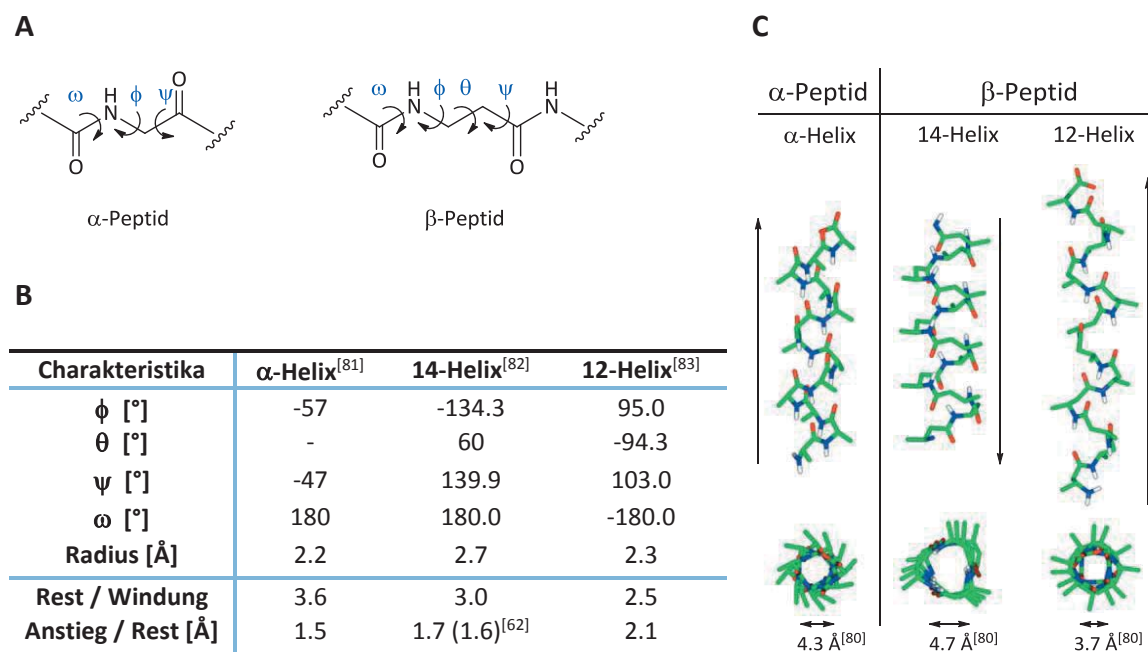


Abb. 3.3: Die strukturellen Unterschiede zwischen α - und β -Peptiden. **A** Schematische Darstellung eines beliebigen α -Peptids (links) sowie eines β -Peptids (rechts) mit den zugehörigen Torsionswinkeln ω (Omega), θ (Theta), ϕ (Phi) und ψ (Psi). **B** Tabelle der entsprechenden Torsionswinkel und Helixparameter für α - und β -Peptide. **C** Vergleich der Sekundärstrukturen von α -Peptiden mit zwei möglichen β -Peptiden (14- und 12-Helix) mit der jeweiligen Dipolmomentausrichtung (beschrieben durch die Pfeilrichtung vom N- zum C-Terminus bei der α - und 12-Helix sowie entgegengesetzt für die 14-Helix. Verändert nach POLUPANOW.^[84]

Der Radius steigt in der Reihenfolge 12-Helix < α -Helix < 14-Helix und ist in der Ausbildung unterschiedlich großer H-Brückenringe begründet.^[80] Die gleichgerichteten N-H-Bindungen und C=O-Bindungen sowohl in der α -Helix als auch in beiden β -Helices führen zu ei-



nem gerichteten Dipolmoment. Die Pfeile verdeutlichen die Ausrichtung des Dipolmoments, welches für die α -Helix und 12-Helix vom *N*-Terminus zum *C*-Terminus orientiert ist und entgegengesetzt für die 14-Helix verläuft.^[9]

Die einzigartige Struktur der 14-Helix mit der Orientierung von jedem dritten Aminosäurerest zur gleichen Seite macht diese zu einem außerordentlich effektiven Grundgerüst für Funktionalisierungen. Durch die Verwendung von *trans*-Aminocyclohexancarbonsäure (**9**, ACHC) kann nach der Beschreibung von GELLMAN eine 14-Helix induziert werden (Abb. 3.4).^[85] Aufgrund der präorganisierten Ringstruktur des ACHC-Bausteins wird eine *gauche*-Konformation bevorzugt, die in einer stabilen und starren 14-Helix resultiert.^[86] Bereits durch die Verwendung eines ACHC-Restes wird die 14-Helix enorm stabilisiert.^[8]

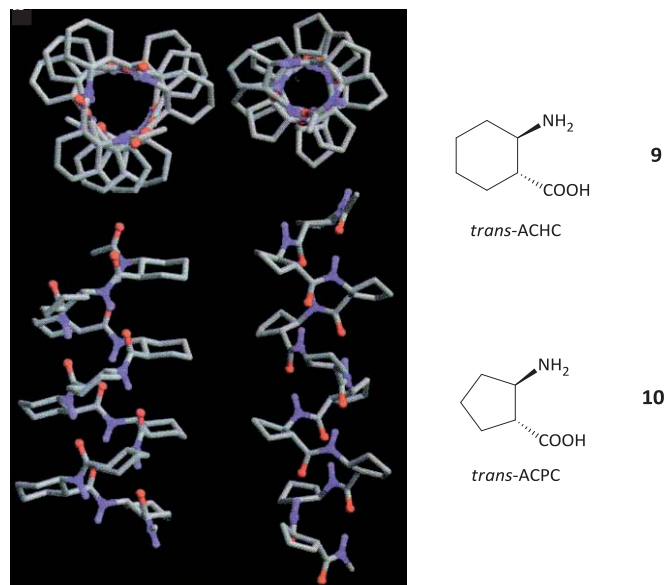


Abb. 3.4: Dreidimensionale Darstellung einer durch *trans*-Aminocyclohexancarboxylsäure (**9**, ACHC) induzierten 14-Helix (links) und einer durch *trans*-Aminocyclopentancarboxylsäure (**10**, ACPC) generierten 12-Helix (rechts). Verändert nach GELLMAN *et al.*^[85]

Die 14-Helix ist durch die Funktionalisierung mit Ammoniumgruppen in wässrigem Medium löslich und behält ihre Struktur bei.^[87] Eine (*S,S*)-Konfiguration in ACHC-Oligomeren bedingt eine linksgängige 14-Helix mit einer Dipolrichtung vom *C*-Terminus zum *N*-Terminus. Dagegen erzeugen (*S,S*)-ACPC-Bausteine **10** eine rechtsgängige 12-Helix mit inversem Dipol.^[8] GELLMAN beschreibt ein amphipiles β -Peptid mit beachtlicher antibakterieller Wirkung aufgebaut aus ACPC-Einheiten, bei der eine Seite positiv geladen ist. Die ACPC reichen Oligomere sind nur schwach hämolytisch und können daher verwendet werden, um neue Therapeutika zu entwickeln.^[88]

4. Design und Synthese

4.1 β -Peptiddesign

Transmembranpeptide (TMP) weisen einen großen Anteil an hydrophoben Aminosäuren auf, welche mit den Acylketten der Lipiddoppelschicht interagieren. Hydrophile Aminosäuren an den *N*- und *C*-terminalen Enden führen zur Wechselwirkung mit der Lipid-Wasser-Schicht und damit zur Verankerung und Ausrichtung der TMP innerhalb der Membran. Die Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur ist sowohl für die Inkorporation als auch für die Interaktion innerhalb der Membran entscheidend.^[4] β -Peptide, welche bereits ab einer Länge von sechs Aminosäuren eine stabile Sekundärstruktur ausbilden,^[9] eignen sich daher besonders für die Synthese artifizierender Transmembranpeptide.

β -Peptidsequenzen, welche eine 14-helikale Sekundärstruktur aufweisen, stellen dabei ein ausgezeichnetes Grundgerüst für Modifikationen dar (Abb. 4.1).^[89]

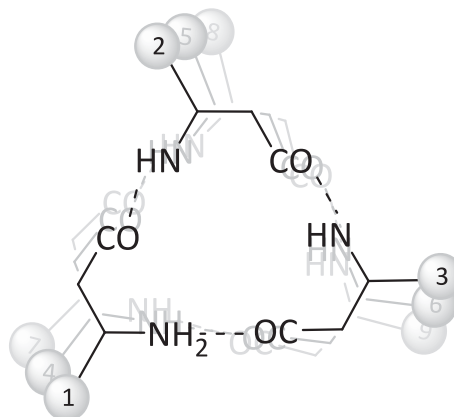


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Draufsicht einer 14-Helix, bei der jeder dritte Aminosäurerest zur gleichen Seite ausgerichtet ist. Verändert nach DIEDERICHSEN *et al.*^[90]

Da die 14-Helix eine durch drei Aminosäuren abgeschlossene Windung besitzt, ist eine Funktionalisierung mit interagierenden Gruppen an einer Flanke des Peptides möglich.