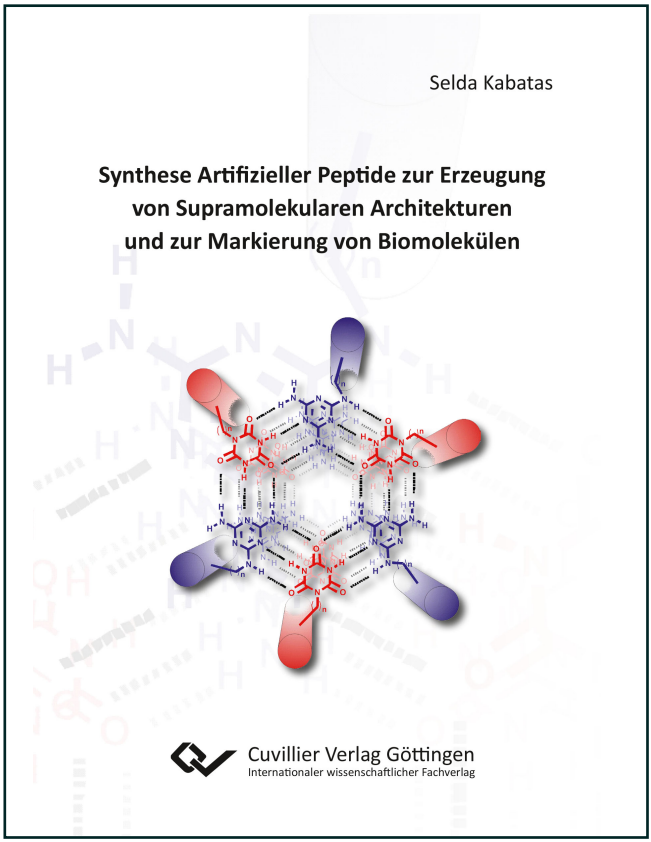
Selda Kabatas (Autor)

Synthese Artifizieller Peptide zur Erzeugung von Supramolekularen Architekturen und zur Markierung von Biomolekülen



https://cuvillier.de/de/shop/publications/7277

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: https://cuvillier.de

1. Einleitung und Zielsetzung

Die vielseitigsten Makromoleküle in Lebewesen stellen ohne Zweifel die Proteine, abgeleitet vom griechischen *proteios* – der Erste, dar. Diese molekularen Maschinen verfügen über eine große und weitreichende Vielfalt an komplexen Funktionen, in denen die biologische Aktivität jedes Proteins durch seine dreidimensionale Struktur bestimmt wird.[1] Sie werden zum Aufbau von biologischem Material genutzt, dienen als Speicher von Substanzen, werden zum Transport von Molekülen eingesetzt und fungieren in Form von Enzymen als Katalysatoren von chemischen Vorgängen. Weiterführend besitzen sie regulative Funktionen als Botenstoffe, den Hormonen, und üben eine Schutzfunktion als Antikörper zur Abwehr aus. Als Vermittler in Form von Membranproteinen, Rezeptoren sowie Ionenkanälen halten sie die Kommunikation von Zellkompartimenten aufrecht.[1,2] Da sie in nahezu allen essentiellen Prozessen des Lebens involviert sind, können bereits geringfügige Veränderungen der Proteinstruktur zu einem Verlust der biologischen Aktivität führen und eine Vielzahl an Krankheiten sowie pathogen ablaufenden Prozessen auslösen. Eine große Anzahl an Therapeutika, die heutzutage eingesetzt werden, entfaltet ihre Wirkung durch die Interaktion mit Proteinen, Enzymen und Rezeptoren, die mit der jeweiligen Krankheit einhergehen.[3] Basierend auf diesem Sachverhalt müssen gezielt effektive und hoch selektive Wirkstoffe entwickelt werden. Ohne die Kenntnisse über die exakten Abläufe in biologischen Systemen ist das Design von Wirkstoffen mit therapeutischer Aktivität undenkbar. Zur Beantwortung solch komplexer Fragestellungen werden in der Chemie und Biologie verschiedene Strategien verfolgt.

Eine chemische Herangehensweise zum Verständnis der biologischen Prozesse, in denen Proteine beteiligt sind, ist die Entwicklung von vereinfachten Modellsystemen. Proteinmimetika stellen hier eine gute Möglichkeit dar, Informationen über die Funktion natürlich vorkommender Proteine zu erhalten. Dabei spielt die Proteinstruktur eine wichtige Rolle, die Information der Aminosäuresequenz allein ist jedoch nicht ausreichend um Rückschlüsse auf die spezifische Funktion zu ziehen.[4–6] Von besonderer Bedeutung ist das Verständnis der vorherrschenden intermolekularen nichtkovalenten Kräfte, die an der Faltung und Selbstorganisation beteiligt sind. Zum Verständnis sowie zur Steuerung dieser nichtkovalenten Kräfte und der infolgedessen entstehenden Überstrukturen wurden viele Modellsysteme konzipiert. Anfänglich wurden für das *de novo*-Design α-Aminosäuren und ihre Peptide in Anlehnung an natürliche Systeme verwendet. Allerdings weisen α-Peptide Defizite aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem enzymatischen Abbau *in vivo* und der inhärenten Flexibilität des Peptidrückgrats kurzer Sequenzen auf.[7–9] Um diese Problematik für therapeutische Anwendungen zu umgehen, sind Foldamere eine vielversprechende Alternative. Foldamere, aus flexiblen synthetischen Kettenmolekülen aufgebaut, weisen durch nichtkovalente Wechselwirkungen eine stabile Sekundärstruktur in Lösung auf.[10] Somit können sie sogar über die gleiche biologische Funktion ihrer natürlichen Leitstrukturen verfügen. Eine Unterklasse der Foldamere sind die β-Peptide, welche zu den wichtigsten Vertretern der bioinspirierten Foldamere gezählt werden.[11] In der Natur sind sie meist in marinen Pflanzen und Mikroorganismen und vereinzelt im Metabolismus von Säugern zu finden.[12] Sie besitzen eine höhere Resistenz gegenüber thermischen Einflüssen und dem enzymatischen Abbau *in vivo*. In wässrigen Systemen werden stabile Sekundärstrukturen für β-Peptide bereits ab einer Kettenlänge von sechs Aminosäuren beobachtet.[11,12] Des Weiteren verfügen β-Peptide über ein sehr großes Repertoire an möglichen natürlichen und nichtnatürlichen Sekundärstruktur-

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

motiven.[12] Eine der wichtigsten Sekundärstrukturen der β³-Peptide ist die 14-Helix. [12,13] Die aus β³-Aminosäuren aufgebaute Helix besteht aus einem 14-gliedrigen Ring, der durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. Durch die Funktionalisierung der Flanken einer 14-Helix mit Erkennungseinheiten in *i* und *i*+3 Abständen kommen die eingeführten Einheiten mit einem Stapelungsabstand von 5 Å übereinander zu liegen. So konnten komplementäre Nukleobasen-funktionalisierte β-Peptide durch WATSON-CRICK- und HOOGSTEEN-Basenpaarung stabile Helix-Dimere bilden.[14–16] Prinzipiell können mit Hilfe von geeigneten Erkennungseinheiten an den β³-Peptiden mit 14-helikaler Struktur gezielt höhere Aggregate aufgebaut werden.[17] In dem zweiten Kapitel wird beschrieben, wie komplementäre Janusmolekül[1]-funktionalisierte β³-Aminosäuren hergestellt und anschließend in Peptide integriert werden. Dabei besitzen die Janusmoleküle Cyanursäure (CYA) und Triaminotriazin (TAT) zwei gleichwertige Bindungsseiten, d. h. Donor- und Akzeptorposition sind jeweils auf beiden Seiten vorhanden.[18] Dies befähigt die Moleküle mit weiteren Donor-Akzeptor-Spezies zu interagieren. Die Bildung einer stabilen 14-Helix und die Erkennung zwischen CYA und TAT sollen zu einer molekularen Selbstorganisation der beiden Komponenten führen und eine Aggregation zu tubulären Strukturen ermöglichen (Abb. 1.1). Die angestrebten supramolekularen Aggregate hätten aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu porenbildenden Transmembranproteinen das Potential als künstliches System in Modellmembranen implementiert zu werden.

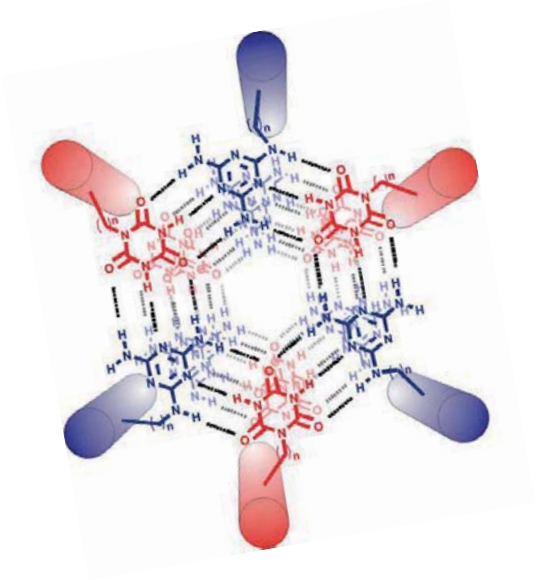


Abbildung 1.1: Molekulare Selbstorganisation von komplementären β³-Peptiden, erzeugt mittels Induktion durch die Janusmoleküle Cyanursäure (CYA) und Triaminotriazin (TAT), deren Erkennung durch Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt wird.

Neben dem Einsatz in Modellsystemen eignen sich β³-Peptide in cyclischer Form aufgrund ihrer rigiden Struktur als Träger für strukturelle und funktionelle Eigenschaften.[19] Cyclo-β³-Tripeptide, die drei Verankerungspositionen aufweisen, können als zelluläre Transportmoleküle von Wirkstoffen fungieren. Des Weiteren kann ihre Tendenz zur Selbstaggregation ausgenutzt werden, da durch vertikale Stapelung mehrerer Cyclo-β³-Tripeptide Nanoröhren entstehen und zur Amplifikation der horizontal orientierten Funktionalitäten führen. Die erzeugten

[1] Inspiriert wurde die Bezeichnung Janusmolekül von der römischen Gottheit Janus, dargestellt durch einen Kopf mit zwei Gesichtern.[257]

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Nanoröhren mit neuartigen Eigenschaften könnten als künstliche Ionenkanäle in biologischen Studien eingesetzt werden oder in materialwissenschaftlichen Bereichen elektrochemische Anwendung finden.[20] In einem weiteren Projekt wird der synthetische Zugang eines literaturbekannten trifunktionalen Cyclo-β^3-Peptids[19] von der Festphasen-Peptidsynthese in die Lösung übertragen, um größere Maßstäbe zur Herstellung zu realisieren (Kapitel 3). Die Generierung größerer Mengen mit reduzierten Materialkosten wäre ein großer Fortschritt, vor allem für pharmazeutische Hochdurchsatz-Screenings zur Identifizierung biologisch aktiver Verbindungen funktionalisierter Cyclo-β^3-Peptide.

Die biologische Vorgehensweise zur Aufklärung von Struktur und Funktion zellulärer Proteine beinhaltet bildgebende Verfahren als Methode der Wahl. Vor allem durch die rasanten Fortschritte der Technik und die Entwicklung selektiver Fluorophore werden Lichtmikroskope weitverbreitet eingesetzt. Den Durchbruch brachte die STED (*stimulated emission depletion*)-Mikroskopie, wodurch die Auflösungsbegrenzung nach dem ABBE´schen Gesetz umgangen und durch das An- und Ausschalten von Fluoreszenzsignalen markierter Zielobjekte eine höhere Detailschärfe erzielt wird.[21] Dabei ermöglichen die bildgebende Verfahren die Visualisierung und Lokalisierung zellulärer Proteine. Seit mehr als einer Dekade ist die bildgebende Massenspektrometrie (*mass spectrometry imaging*, MSI) stärker in den Fokus gerückt, da diese im Gegensatz zu anderen bildgebenden Verfahren neben der räumlichen Information auch die chemische Zusammensetzung der Probe wiedergibt.[22] Die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) ermöglicht eine Auflösung, die den Bereichen von Lichtmikroskopen nahe kommt.[23] Für den Kontrast werden in Lichtmikroskopen Fluorophore eingesetzt, während die MSI eine Isotopenmarkierung zur Differenzierung erfordert. In bisherigen biologischen Studien wurde die isotopische Markierung überwiegend durch metabolische Anreicherung erzielt.[24] So werden durch das Füttern lebender Organismen oder Inkubation von Zellen mit isotopenangereicherten Verbindungen nach mehreren Zyklen der Proteinbiosynthese isotopenmarkierte zelluläre Proteine erhalten. Im Anschluss wird der Isotopengehalt visualisiert. Dies jedoch erschwert die Unterscheidung einzelner Proteine von der zellulären Gesamtheit. In diesem Zusammenhang wird in dem vierten Kapitel beschrieben, wie in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe RIZZOLI eine Strategie ausgearbeitet und in einer Teilaufgabe die Entwicklung von selektiven isotopenangereicherten Markern erzielt wird. Somit wird die Möglichkeit zur Differenzierung einzelner zellulärer Proteine unter Verwendung der Ionen-Mikrosonde NanoSIMS 50L von *Cameca* aufgezeigt und der Weg für metabolische und Protein-Turnover Studien geschaffen.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sind eine beliebte Methode in zellbiologischen Studien. Mittlerweile gibt es eine Bandbreite an kommerziell erhältlichen Fluorophoren, die meistens über bestimmte chemische Reaktionsarten eingeführt werden können.[25] Zur Visualisierung von Protein-Antikörper/Antigen-Konjugaten wird neben chemischer eine enzymatische Einführung der Fluorophore wegen der hohen Spezifität sowie Sensitivität bevorzugt. In Kapitel 5 wird beschrieben, wie die literaturbekannte Sortase A-Erkennungseinheit synthetisiert und mit Fluorophoren sowie einem Biotin verknüpft wird.[26] Diese soll im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt werden. Sortase A ist ein bakterielles Enzym, dessen Struktur und Funktion bekannt ist und dessen natürliche Funktion als biotechnologisches Hilfsmittel zur Markierung und Ligation von Proteinen übertragen worden ist.[27] Demzufolge sollen die markierten Erkennungseinheiten in einer Sortase A-vermittelten Reaktion mit Proteinen verknüpft werden, um immunocytochemische Experimente zu ermöglichen.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

2. Janusmolekül-funktionalisierte β^3-Peptide zur Ausbildung höher geordneter Aggregate

Die molekulare Selbstorganisation von Molekülen ist ein spontaner Assoziationsvorgang unter Gleichgewichtsbedingungen, aus der dreidimensionale Überstrukturen resultieren. Angetrieben durch intermolekulare nichtkovalente Kräfte oder koordinativer Wechselwirkungen werden in ubiquitären Prozessen des Lebens unter Bildung komplexer Strukturen verschiedene Biomoleküle involviert. Neben der Duplexbildung der DNA durch Nukleobasenpaarung, ist die Proteinfaltung ein repräsentatives Beispiel für molekular selbstorganisierende Systeme. Für das gezielte Design von höheren Strukturen muss der Vorgang vollständig verstanden werden und kontrollierbar sein. Durch den Einsatz peptidischer Aggregate definierter Geometrie kann eine Vielzahl an supramolekularer Strukturen, wie Käfigstrukturen oder Nanoröhren, erzeugt werden, um über das Verständnis hinaus weitere Anwendungsmöglichkeiten für biologische und materialwissenschaftliche Bereiche zu ermöglichen.

Inspiriert von den integralen Membranproteinen, den α-Helix-Bündel- und β-Fassproteinen, soll ein artifizielles porenbildendes Modellsystem mit molekular selbstorganisierenden Eigenschaften entworfen werden. Zum Aufbau komplexer Strukturen eignet sich das bioinspirierte Foldamer β^3-Peptid aufgrund dessen 14-helikaler Vororganisation und gezielter Adressierung der Flanken für Erkennungseinheiten. Die Kontrolle über Geometrie, Stöchiometrie und Spezifität der Selbstassoziation kann mit Hilfe von Erkennungseinheiten gesteigert werden. Aus der molekularen Erkennung des Janusmolekülpaars Cyanursäure (CYA) und Triaminotriazin (TAT) mit komplementären Akzeptor/Donor-Positionen (ADA/DAD) können planare hexamere Strukturen realisiert werden, die sich durch die Verwendung eines präorganisierenden β^3-Peptidrückgrats im dreidimensionalen Raum zu tubulären Strukturen ausrichten können. In diesem Kapitel werden die Eigenschaften der β^3-Peptide wiedergegeben (Kapitel 2.1) und die Janusmoleküle als potentielle Erkennungseinheiten aufgezeigt (Kapitel 2.2). Des Weiteren werden Design und Synthese Janusmolekül-funktionalisierter β^3-Peptide vorgestellt (Kapitel 2.3) und die Ergebnisse aus den Aggregationsstudien präsentiert (Kapitel 2.4).

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

2.1 β-Aminosäuren und ihre Peptide

Angelehnt an die natürlichen Vorbilder, den α-Peptiden, werden synthetisch erzeugte Oligomere mit charakteristischer Tendenz zur Faltung und Ausbildung von stabilen Sekundärstrukturen in Lösung als Foldamere bezeichnet.[10,28,29] Trotz abweichendem Aufbau verglichen mit natürlichen Strukturen, besitzen sie ein ähnliches Verhalten in Assoziation und Faltung, welche durch nichtkovalente Kräfte induziert werden. Darüber hinaus zeichnen sie sich durch ihre Fähigkeit aus, definierte Sekundärstrukturen bereits mit kürzeren Oligomeren auszubilden. Heutzutage ist eine Vielzahl von Foldameren bekannt, welche erfolgreich synthetisiert und überdies auf ihre Eigenschaften zur Faltung und Assoziation untersucht worden sind (Abb. 2.1).[10,29,32,33] Dabei werden Foldamere in zwei Klassen eingeteilt, die bioinspirierten Foldamere und die abiotischen Foldamere. Nichtnatürliche Foldamere beinhalten typischerweise aromatische Ringe in ihrem Rückgrat.[30,31] Im Gegensatz zu den natürlichen oder bioinspirierten Foldameren sind in den nichtnatürlichen Foldameren π-π-Stapel-Wechselwirkung und die geometrische Spezifität der Aromaten vorhanden, die zu einer spezifischen Ausbildung von räumlichen Strukturen führen.

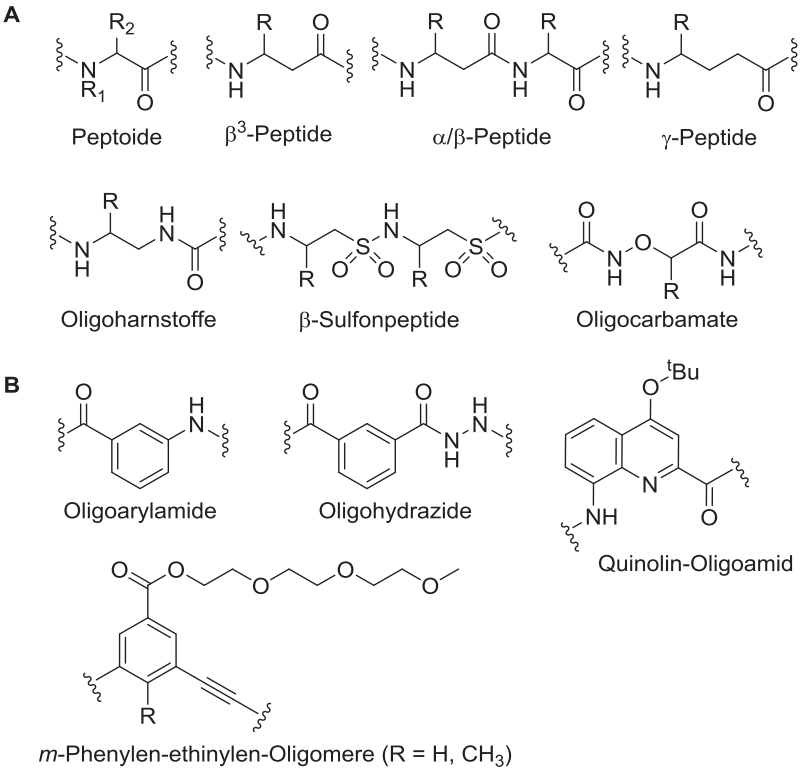


Abbildung 2.1: Beispiele für bioinspirierte Foldamere (**A**) und abiotische, nichtnatürliche Foldamere (**B**).[10,29,32,33]

β-Peptide werden zu den bioinspirierten Foldameren gezählt, welche in der Natur bisher vereinzelt in hochaktiven Naturstoffen und insbesondere in marinen Lebewesen identifiziert worden sind.[10,12] Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften, wie thermische und enzymatische Stabilität, bieten diese interessante Forschungsbereiche auch im Hinblick auf Wirkstoffentwicklung.[34,35]

Im Gegensatz zu α-Aminosäuren werden in β-Aminosäuren durch die Verlängerung um eine Methyleneinheit zwischen der Amino- und Carboxylgruppe, zusätzlich zwei weitere Positionen

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

für Substitutionen zur Verfügung gestellt (Abb. 2.2). Die Anzahl an möglichen Stereoisomeren steigt somit von zwei auf vier und verdeutlicht die große strukturelle Vielfalt der β-Aminosäuren.[12]

Abbildung 2.2: Mit R markierte mögliche Substitutionsstellen für α-Aminosäuren und β-Aminosäuren.

Zur besseren Unterscheidung der Substitutionspositionen von β-Peptiden wurden Indizes eingeführt. Die Monosubstitution an C_β wird als β^3-Aminosäure und die an C_α als β^2-Aminosäure bezeichnet.[12] Demzufolge wird eine Disubstitution an beiden C-Atomen als $\beta^{2,3}$-Aminosäure benannt (Abb. 2.3).

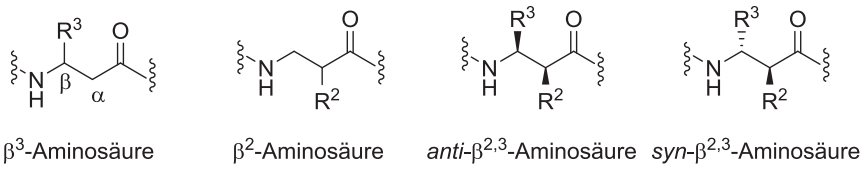


Abbildung 2.3: Substitutionsmuster in β-Aminosäuren.

Die Torsionswinkel ω, Φ, θ und φ in β-Aminosäuren werden nach der Konvention von BALARAM festgelegt (Abb. 2.4).[36,37] Hierbei repräsentiert ω den Winkel der CO-N-Bindung, Φ den Winkel der CN-C_β (CN-C_α für α-Peptide), θ den Winkel der C_α-C_β und φ den Winkel der CO-C_α-Bindung. Dabei hat der Winkel θ einen hohen Einfluss auf die Ausbildung von Sekundärstrukturen der β-Peptide.[36]

Abbildung 2.4: Torsionswinkel von α-Peptiden (**links**) und β-Peptiden (**rechts**) nach der Konvention von BALARAM in Anlehnung an die RAMACHANDRAN-Diagramme.[36,37]

Des Weiteren hat das Substitutionsmuster einen starken Einfluss auf die Konformation. Die monosubstituierten β^2- und β^3-Aminosäuren sowie die *anti*-konfigurierten $\beta^{2,3}$-Aminosäuren bevorzugen die *gauche* Konformation.[36,38] Mit einem Diederwinkel θ von 60 ° werden hierbei helikale Strukturen präferiert. Im Gegensatz dazu neigen die *syn*-konfigurierten $\beta^{2,3}$-Aminosäuren durch die *trans*-Konformation mit einem Winkel θ von 180 ° zur Ausbildung von β-Faltblatt-Motiven. Bei $\beta^{2,2}$- und $\beta^{3,3}$-Aminosäuren hingegen werden statt der helikalen oder *turn*-artigen Strukturen, wie sie in α-Aminosäuren vorkommen, *reverse turn* Konformationen stabilisiert. che β-Aminosäuren mit einem Ringschluß über C_α-C_β begünstigen aufgrund der Starrheit der Bindung eine *gauche*-Konformation mit Präferenz zur Helix-Bildung. Dabei wird der Torsionswinkel durch die Ringgröße bestimmt.

Die Annahme, dass β-Peptide aufgrund des zusätzlichen C-Atoms und der dadurch „frei-drehbaren“ C_α-C_β σ-Bindung eine geringe Neigung zur Bildung von übergeordneten Strukturen haben, erwies sich als nicht zutreffend.[38,39] Bereits mit einer Sequenz von sechs β-Aminosäuren können in wässrigen Medien oder Methanol Sekundärstrukturen erhalten werden, wohingegen

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

15–20 α-Aminosäuren notwendig sind um stabile Sekundärstrukturen auszubilden. Durch Zuhilfenahme der Konformationsdiagramme wird deutlich, dass die C_α-C_β-Bindung eine große Energiebarriere aufweist. Die Folge ist die erschwerte Rotation um die sp^3-sp^3-hybridisierte σ-Bindung der β-Aminosäure im Vergleich zu gewöhnlichen sp^3-sp^3-hybridisierten Bindungen.

Das Vorhandensein einer stabilen Sekundärstruktur ist eine wichtige Voraussetzung zur Bildung von Tertiärstrukturen, die eine definierte Funktion bei der Protein-Substrat-Interaktion beinhalten.[38] Dabei sind β-Peptide nicht nur in der Lage stabile Sekundärstrukturen zu bilden, sondern weisen neben natürlichen Sekundärstrukturen (Helices, parallele und antiparallele Faltblätter und *turn*-artige Strukturen) auch in der Natur selten anzutreffende Motive auf, wie tubuläre, bandartige Strukturen oder unnatürliche Helixkonformationen.[9] Durch das Substitutionsmuster der β-Peptide wird in erster Linie die Sekundärstruktur induziert. Zur Differenzierung der Helixrichtung ist in der Literatur keine eindeutige Nomenklatur vorgegeben. Während SEEBACH anhand der Helixsymmetrie zwischen M und P (links- oder rechts-drehend) unterscheidet, beruht SUBIRANAS und APPLEQUISTS Konvention auf dem Drehsinn (R und L) der Helix.[36] Eine weitere Möglichkeit zur Helix Nomenklatur beschreibt die Anzahl an Seitenketten pro Windung mit einem Index, der in der Nomenklatur von GELLMAN Verwendung findet.[36] GELLMAN klassifiziert die verschiedenen Helices über den durch intramolekulare Wasserstoffbrücken gebildeten Ringschluß zwischen einem Akzeptor- und einem Donoratom, in diesem Fall zwischen dem Carbonylsauerstoff am Peptidrückgrat und dem Amidproton.[2] Folglich beinhalten die Nummern die Anzahl, der in dem Ring enthaltenen Atome, zur Differenzierung der Helix-Typen. Die bekanntesten und weitgehend untersuchten Helices sind die 14-, 12-, 10/12-, 10- und 8-Helices (Abb. 2.5). Im Vergleich dazu sind für α-Peptid-Helices nur drei Wasserstoffbrücken-bildende Strukturen bekannt (α-, 3_{10}- und π-Helix).[40]

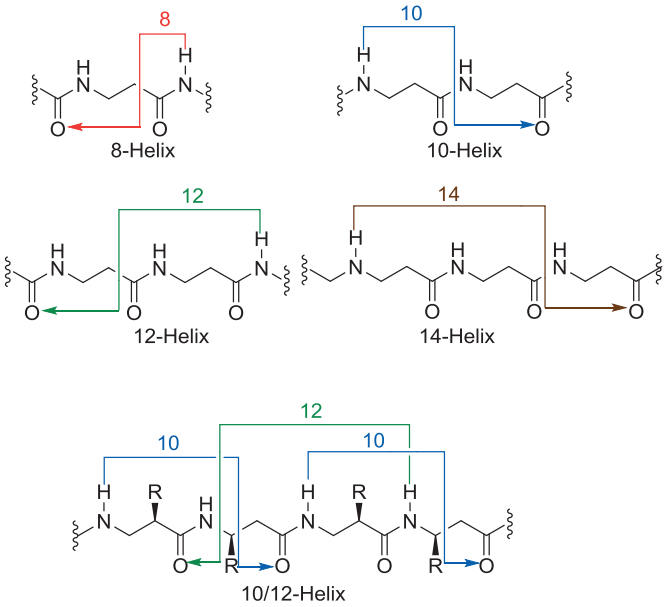


Abbildung 2.5: Darstellung der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und die daraus resultierenden Helixtypen. Die Anzahl der Atome innerhalb des gebildeten Ringes ist namensgebend für den Helixtyp.[36]

[2] Im weiteren Verlauf wird die GELLMAN-Nomenklatur verwendet.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Die strukturelle Charakterisierung der einzelnen Helix-Typen erfolgt mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR)-Spektroskopie, der Röntgenkristallstrukturanalyse sowie der Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie.[12] Die Kristallstrukturanalyse liefert genaue strukturelle Informationen. Allerdings ist diese Methode auf feste Phasen limitiert und die Bildung eines Einkristalls meist erschwert. Für strukturelle Aussagen in Lösung sind zweidimensionale NMR-Spektroskopie sowie CD-Spektroskopie unerlässlich. Durch die CD-Spektroskopie können zusätzliche Aussagen über Veränderungen in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur oder anderen Lösungsmitteln getroffen werden. Sie bietet oft eine gute Möglichkeit zur Abschätzung der α-Peptid-Konformationen an.[32] Sind bereits Referenzen der unterschiedlichen Typen an helikaler Konformation vorhanden, wie im Fall der β^3-Peptide, können Vergleiche zu neuartigen Oligomeren gezogen werden.

Die Stabilität der β-Peptid-Helix ist je nach Substitutionsmuster unterschiedlich. In Studien von SEEBACH konnte gezeigt werden, dass β^3-Peptide (C_β-substituiert) eine höhere Stabilität in ihren Helices aufweisen als β^2-Peptide (C_α-substituiert).[12] In β^3-Peptiden befinden sich die Substituenten neben der Aminofunktion des Rückgrats, wohingegen sich die Substituenten der β^2-Peptide neben der Carbonylgruppe befinden. Die Nachbarschaft zur Carbonylfunktion führt aufgrund sterischer Hinderungen zu einer Schwächung der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung und infolgedessen tritt ein destabilisierender Effekt auf.

Für helikale β-Peptide ist die 14-Helix (Helix-Nomenklatur: 3_{14}) die am besten untersuchte Sekundärstruktur, deren Gesamtdipolmoment invers zu dem einer α-Helix ist (Abb. 2.6).[12]

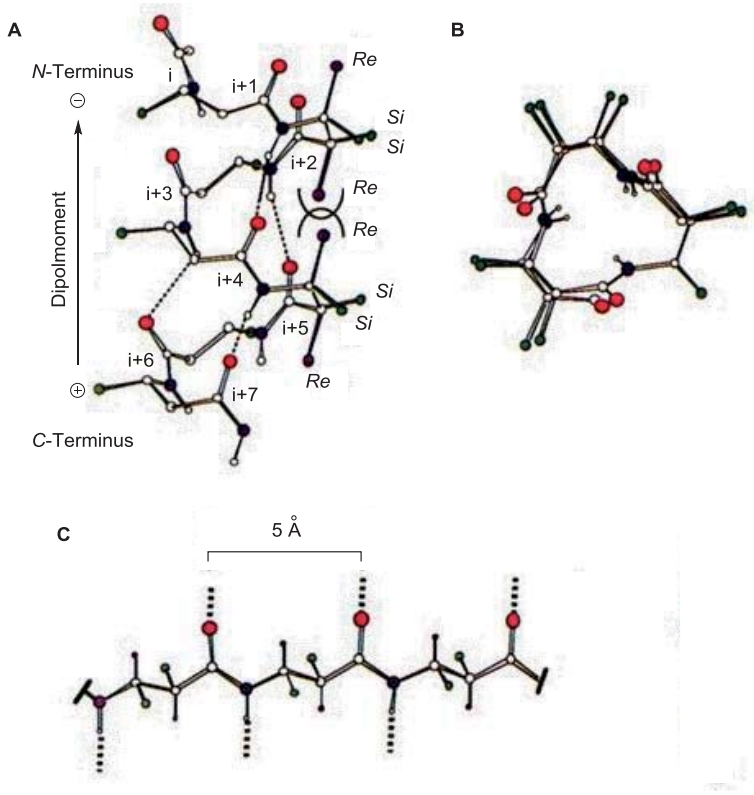


Abbildung 2.6: A Seitenprofil der linksgängigen 14-Helix (farblich hervorgehoben sind Stickstoffatome = blau, Sauerstoffatome = rot und Kohlenstoffatome = weiß).[12] Axiale Substituenten (*Re*, violett) verhindern die Helixbildung. Laterale Substituenten (*Si*, grün) sind begünstigte Positionen für die Ausbildung der 14-Helix. **B** 14-Helikales β^3-Peptid von oben betrachtet. Die Substituenten bilden drei Flanken. **C:** Gestreckte Konformation eines β-Peptids mit Seitenansicht.[12]

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Die Stabilisierung der 14-Helix erfolgt über einen 14-gliedrigen Ring der durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Amidproton an der Position *i* und dem Carbonylsauerstoffatom, das sich in *i*+2 Stellung am Rückgrat befindet, ausgebildet wird.[12,39,41] Dabei sind pro Windung näherungsweise drei Aminosäuren vorhanden, deren Seitenketten mit einem Abstand von 5 Å an der Position *i* und *i+3* übereinander zu liegen kommen. An jedem sp^3-hybridisierten Kohlenstoffatom entlang des Rückgrats der Helix sind Positionen für laterale oder axiale Substituenten vorhanden. Die laterale Bindung ist näherungsweise senkrecht und die axiale parallel zur Helixachse ausgerichtet. Seitenkettenreste sind aufgrund sterischer Hinderungen nur in lateraler Position erlaubt, während in axialer Position ausschließlich Wasserstoffatome auftreten dürfen. Die linksgängige Helix (M) wird gebildet, wenn die Seitenketten an den Positionen C_α und/oder C_β der β-Aminosäuren sich in den *Si*-Sphären befinden. Folglich formen β^3-Peptide, die aus natürlichen L-Aminosäuren aufgebaut sind, eine linksgängige 14-Helix. Dahingegen müssen für eine rechtsgängige Helix (P) die Wasserstoffatome in *Si*-Positionen und Seitenkettenreste in *Re*-Positionen angeordnet werden. Helices für disubstituierte β-Peptide in C_α- oder in C_β-Position wurden dementsprechend bisher nicht erhalten.

Die stabilisierenden Effekte von acyclischen β-Peptiden wurden bisher meist in organischen Lösungsmitteln nachgewiesen. In organischem Milieu herrschen oft sehr starke struktur-stabilisierende Effekte, aufgrund der Bevorzugung von intramolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen relativ zu wässrigen Systemen.[38] Die Abnahme der Helix-Stabilität in wässrigen Medien wäre aus pharmakologischer Sicht von Nachteil in Bezug auf die Entwicklung von Arzneimitteln. Mit gezielter Wahl der Seitenkette kann jedoch die Rückgrat-Flexibilität minimiert und so eine hohe Population der helikalen Konformation in wässrigen Medien erzielt werden.[8] GELLMAN zeigte, dass die cyclische Aminosäure *trans*-2-Aminocyclohexancarbonsäure (ACHC) (**1**) prädestiniert ist für die 14-Helix-Bildung (siehe Abb. 2.7). Durch einen Cyclohexanring wird die C_α-C_β-Bindung fixiert und die Rotation um diese Bindungsachse verhindert. Der Torsionswinkel θ beträgt in diesem Fall etwa 55 °.[8,36,41,42] Somit wird die Helix unabhängig vom Lösungsmittel stabilisiert, das in moleküldynamischen Berechnungen bestätigt wird.[42,43]

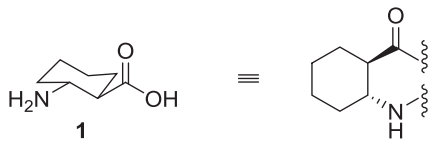


Abbildung 2.7: Die cyclische $\beta^{2,3}$-Aminosäure ACHC (**1**). Die *trans*-Konfiguration bevorzugt eine *gauche*-Konformation und somit die Ausbildung einer stabilen 14-Helix.[36]

Um eine verbesserte Löslichkeit im wässrigen Milieu zu erreichen, ist es notwendig, neben der Aminosäure ACHC (**5**) auch geladene β^3-Aminosäuren in die Peptidsequenz einzubeziehen.[44] GELLMAN, SEEBACH und DEGRADO konnten unabhängig voneinander zeigen, dass alternativ geladene β^3-Peptide ebenfalls eine erhöhte helikale Population in wässrigem Medium aufweisen.[45,46] Durch die positiven und negativen Ladungen an den Positionen *i* und *i*+3 werden Salzbindungen entlang dieser Flanken ausgebildet. Für jede dritte Aminosäure wurden β^3-Aminosäuren mit einer unpolaren, aliphatischen Seitenkette verwendet, welche durch intramolekulare hydrophobe Wechselwirkung die Gesamtstruktur stabilisieren. Arbeiten von SCHEPARTZ haben gezeigt, dass nicht unbedingt zwei der drei Flanken mit geladenen Resten besetzt werden müssen. Es ist ausreichend wenn eine Flanke geladen ist und die anderen zwei Flanken für hydrophobe Interaktionen zur Verfügung stehen.[47–49] Infolgedessen entsteht durch

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

die Wahl entgegengesetzt geladener Reste an beispielsweise jeder *i*-ten Position, bzw. an der Position *i* und *i*+3, mehr Freiraum bei der Sequenzwahl.

2.2 Janusmoleküle als Erkennungseinheiten

Die Präorganisation von interagierenden Gruppen in einem Netzwerk von nichtkovalenten Wechselwirkungen führt zu einer Erkennung mit hoher Selektivität sowie Systemen mit positiver Kooperativität.[50] Die Verwendung von reversiblen Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, ermöglicht komplementären Molekülen die Ausbildung von supramolekularen Aggregaten.[51] Das Anfangs von WHITESIDES vorgeschlagene einfache Modell sind die präorganisierten Derivate der Cyanursäure (CYA, **2**) und des Triaminotriazins (TAT, **3**) (Abb. 2.22).[52] Weitere bekannte und potentielle Vertreter dieser Molekülklasse sind Barbitursäure (BAP, **4**) und Triaminopyrimidin (TAP, **5**) (Abb. 2.8). Die komplementären Moleküle besitzen jeweils zwei Bindungsseiten mit alternierenden Akzeptor- und Donorpositionen, um simultan über beide Seiten zu binden. Dabei geht jede Bindungsseite eines Moleküls drei Wasserstoffbrückenbindungen in einem Bindungswinkel von etwa 120 ° ein.[50] Die CYA/TAT-Aggregate besitzen eine geringe Löslichkeit in Wasser (pH = 7) und zeigen erst über 350 °C eine Zersetzung, welches auf eine hohe thermodynamische Stabilität hinweist.

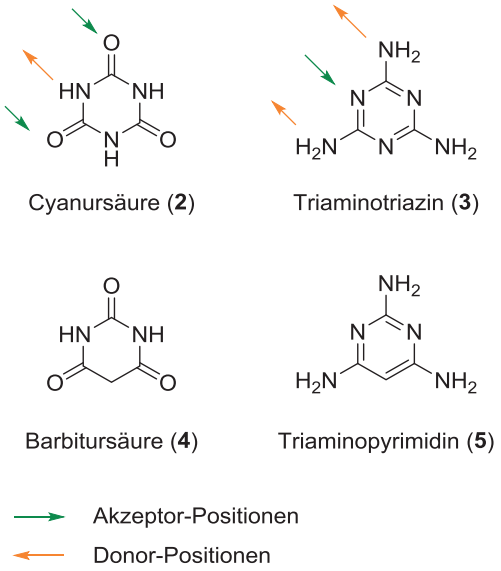


Abbildung 2.8: Cyanursäure (CYA, **2**) und Barbitursäure (BAP, **4**) sind komplementär zu Triaminotriazin (TAT, **3**) und Triaminopyrimidin (TAP, **5**). Die Erkennung für Wasserstoffbrückenbindungen wird durch die alternierenden Donor- und Akzeptorpositionen gegeben.

Die Überstrukturen sind abhängig von den Seitenketten des komplementären Molekülpaares. Die möglichen Motive sind das cyclische Hexamer (Rosette), das lineare Band und die Zickzackstruktur, welche unendlich fortgesetzt vorliegen (Abb. 2.9).[53]

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

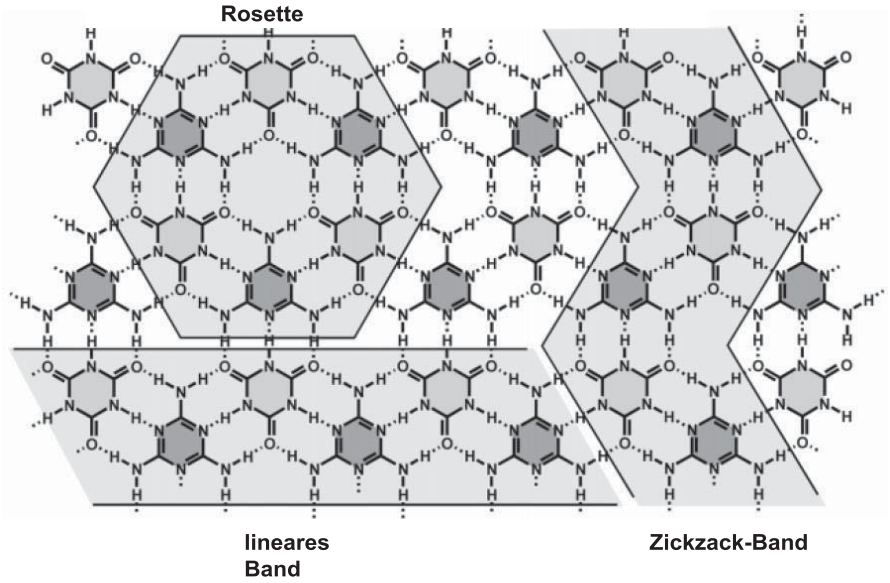


Abbildung 2.9: Vorhandene Strukturmotive für die Triaminotriazin-Cyanursäure (TAT/CYA)-Aggregate.[18,50]

Die Stapelung cyclischer Hexamere zu porenartigen Strukturen erfordert eine Minimierung des entropischen Aufwands der Selbstorganisation und eine Kontrolle über die Form der Nanostruktur.[51,53] Um diese Bedingungen zu erfüllen, wurde von WHITESIDES das Konzept der kovalenten Präorganisation sowie das Konzept der peripheren Hinderung vorgeschlagen (Abb. 2.10 **A**, **B**). Bei Ersterem wird durch kovalente Knüpfung eine molekulare Erkennung zwischen den zu vernetzenden Systemen geschaffen und der entropische Aufwand minimiert (präorganisierendes Rückgrat der TAT-Einheit). Für das Letztere werden sperrige Gruppen an CYA substituiert und auf die zu aggregierende Fläche gebracht, um so das Band-Motiv oder Zickzack-Strukturen zu vermeiden und die Rosettenstruktur zu begünstigen.[53–55]

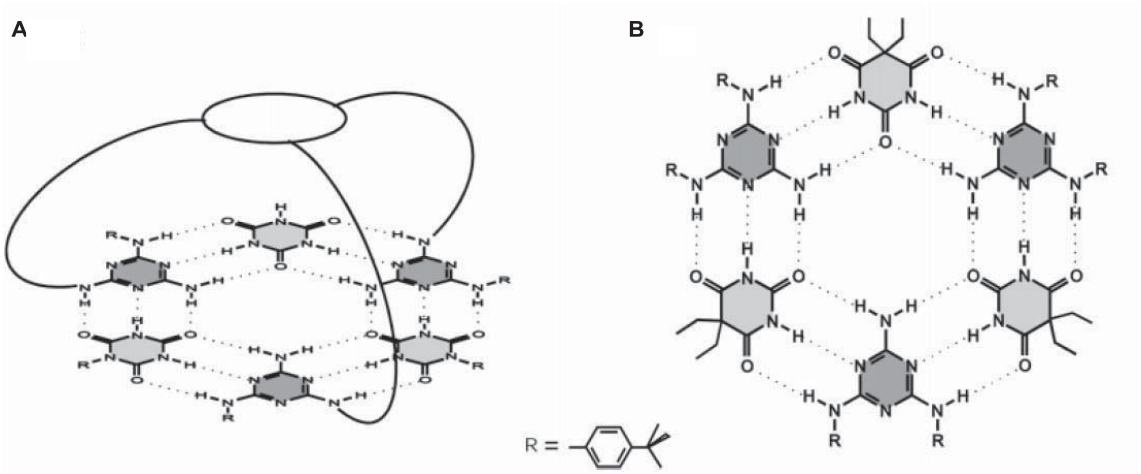


Abbildung 2.10: Das Konzept der kovalenten Präorganisation (**A**) sowie der peripheren Hinderung (**B**) zur Ausbildung der Rosettenstruktur.[18,50]

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

2.3 Cyanursäure- und Triaminotriazin-funktionalisierte β^3-Peptide

Biologische Systeme streben eine hohe Präzision an, in der Strukturen entweder geordnet oder ungeordnet vorliegen und inkorrekte strukturbildende Elemente wieder in das dynamische Gleichgewicht zurückgewiesen werden.[53] So können Proteine in einer *random coil*-Struktur vorliegen oder aber durch Faltung eine biologisch aktive Form annehmen. Für die molekulare Selbstorganisation sind nichtkovalente Interaktionen wie Wasserstoffbrücken-bindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte, π-π- und elektrostatische Wechselwirkungen sowie Metallkoordination ausschlaggebend. Durch das Zusammenspiel dieser einzelnen Kräfte wird die ungünstige Entropie zur Anordnung überwunden und ein Aggregat im thermodynamischen Minimum erhalten.[53] Hierfür sind präorganisierte Untereinheiten eine wichtige Voraussetzung, wie stabile Sekundärstrukturen. Weiterführend wird der Prozess durch eine reduzierte Anzahl an Biomolekültypen begünstigt, wodurch das System nur eine geringe Menge an Information verarbeiten muss. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die positive Kooperativität, in der das Zusammenschließen einzelner Komponenten die Affinität zum Anbringen weiterer steigert.[53]

Die molekulare Selbstorganisation ist der Schlüsselschritt zur Generierung von supramolekularen Strukturen in der Natur, aber auch in künstlichen Systemen, die natürliche Strukturen nachahmen sollen. Die β^3-Peptide besitzen die Fähigkeit, diese besondere Aufgabe zu bewerkstelligen. Ein β^3-Peptid bildet bevorzugt eine 14-helikale Sekundärstruktur aus, welche durch den Einbau der artifiziellen Aminosäure (1*R*,2*R*)-*trans*-Aminocyclohexancarbonsäure (ACHC) zusätzlich Stabilität findet. Aus der molekularen Erkennung von Cyanursäure (CYA) und Triaminotriazin (TAT) resultieren cyclisch hexamere Strukturen, die sich durch die Verwendung des präorganisierenden β^3-Peptid-Rückgrats im dreidimensionalen Raum gezielt ausrichten sollen. Dies soll durch die Positionierung der Erkennungseinheiten in Position *i* und *i*+3 erreicht werden, wodurch jede dritte Seitenkette eines β^3-Peptides mit einem Abstand von 5 Å übereinander zu liegen kommt.

Die Hauptaufgabe dieser Arbeit bestand somit aus dem Aufbau eines supramolekularen Aggregats basierend auf Cyanursäure- und Triaminotriazin-funktionalisierten β^3-Peptiden. Dies sollte in vier Etappen erzielt werden:

1. Generieren der CYA- und TAT-funktionalisierten β^3-Aminosäuren durch kovalente Synthese.
2. Kovalente Polymerisation, d. h. Inkorporation der Monomerbausteine in Peptide definierter Primärsequenz unter Erhalt zweier komplementärer Peptidstränge.
3. Selbstorganisation der einzelnen β^3-Peptide durch intramolekulare Wechselwirkung, in der durch Faltung eine stabile Sekundärstruktur ausgebildet wird.
4. Molekulare Selbstorganisation äquimolarer Mischungen der komplementären Peptide, induziert durch die Erkennungseinheiten CYA und TAT über intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen.

Bedingung an das gebildete Aggregat ist seine Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen (pH = 7.4), um als verlängerte Version in zukünftigen Applikationen als künstliches porenbildendes Protein in Modellmembranen integriert zu werden.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

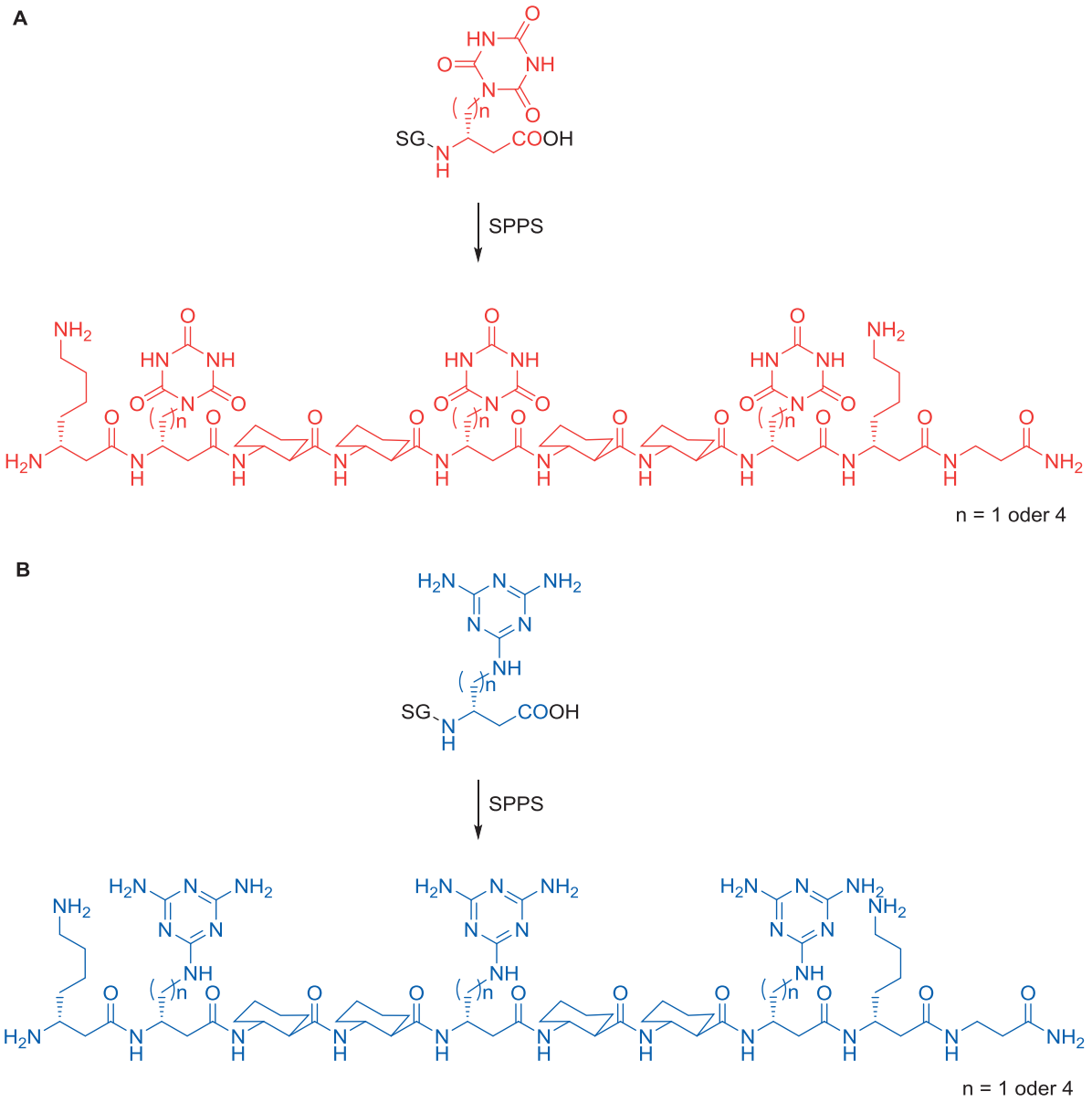


Abbildung 2.11: Inkorporation der zueinander komplementären Janusmolekül-funktionalisierten Monomerbausteine in die ausgewählte β³-Peptidsequenz (**A** und **B**), jeweils flankiert von zwei β³-Homolysinen zur Erhöhung der Löslichkeit. Die Inkorporation von (1*R*,2*R*)-*trans*-Aminocyclohexancarbonsäure (ACHC) steigert die Stabilität der rechtsgängigen 14-helikalen Sekundärstruktur. Dargestellt sind jeweils die Primärstrukturen, die in Lösung bevorzugt 14-Helices ausbilden. SG = Schutzgruppe, SPPS = *solid phase peptide synthesis*.

Somit ergaben sich folgende Teilaufgaben:

- Die Ansätze aus der dieser Arbeit vorangegangenen Dissertation[17] sollten übertragen werden. Diese bestanden aus der Synthese einer *tert*-Butoxycarbonyl (Boc)-geschützten CYA-funktionalisierten β³-Aminosäure und ihr Einbau in die hier übernommene Peptidsequenz über Festphasen-Peptidsynthese nach Boc-Strategie.
- Synthese von 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-geschützten CYA- und TAT-funktionalisierten β³-Aminosäuren mit jeweils einer CH_2-Einheit zwischen Heteroaromat und β³-Rückgrat sowie einer verlängerten Version (Kapitel 2.3.1) und deren

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Inkorporation in Peptide über Festphasen-Peptidsynthese nach Fmoc-Strategie (Kapitel 2.3.2) (Abb. 2.11).

- Strukturelle Voranalysen der jeweiligen Peptide, um Aussagen über die Ausbildung der 14-Helix treffen zu können (Kapitel 2.3.3).
- Untersuchungen der äquimolaren Peptidmischungen auf ihr Aggregationsverhalten (Kapitel 2.3.3) (Abb. 2.12).

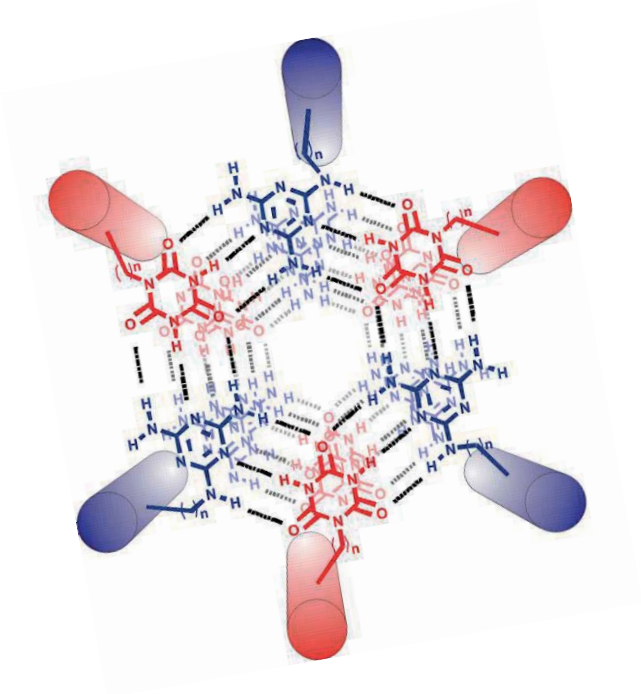


Abbildung 2.12: Molekulare Selbstorganisation einer äquimolaren Mischung der zueinander komplementären CYA- und TAT-β^3-Peptide zu einer tubulären Struktur, induziert durch die Wasserstoffbrücken-vermittelte Erkennung der Janusmoleküle CYA und TAT.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.