

**Synthese und Strukturuntersuchungen des
membranaktiven Peptaibols Alamethicin
mittels
¹⁹F-Festkörper-NMR**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Chemiker Daniel Maisch

aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. S. Bräse
Referent: Prof. Dr. A. S. Ulrich
Korreferent: Prof. Dr. J. Podlech
Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2008

Ich erkläre hiermit wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine Hilfsmittel, außer den bereits angegebenen, benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher weder an dieser, noch an einer anderen Hochschule als Prüfungsschrift eingereicht.

Karlsruhe, den 19.12.2007

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2004 bis Dezember 2007 am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie der Universität Karlsruhe (TH), unter der Leitung von Prof. A. S. Ulrich angefertigt.

Danksagungen

Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich danke ich sehr herzlich für die sehr interessante Aufgabenstellung, Ihrem Vertrauen und Interesse an dem Fortgang dieser Arbeit.

Danken möchte ich weiterhin:

Dr. Sergii Afonin und Dr. Parvesh Wadhvani für ihre wertvolle Unterstützung zu jeder Stunde (Tag und Nacht), fruchtbaren Diskussionen und sonstigen Gesprächen, auch abseits der Forschung.

Fr. Kernert und Fr. Roßnagel sowie Fr. Lang und Fr. Kuiper für die Aufnahme einiger Massen- bzw. NMR-Spektren.

Herrn Dr. Jochen Bürck für seine Betreuung und Hilfe bei der Durchführung der CD- und OCD-Messungen.

Serge Ruden für seine Durchführung der antimikrobiellen und hämolytischen Tests.

Dr. Sergii Afonin, Dr. Jochen Bürck, Dr. Stephan Grage, Dr. Sonja Müller und Christian Mink für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dem gesamten Arbeitskreis Ulrich für die tolle Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft. Danken möchte ich vor allen Dingen den Mitstreitern, Praktikumsbetreuern und Vertiefungspraktikanten Marion Döbele, Susanne Fanghänel, Dr. Dorit Grasnack, Dr. Sonja Müller, Stefanie Vollmer, Dr. Ulrich Dürr und Dr. Christian Lange. Für die Erfahrung, Tipps, Tricks, Denkanstöße und nicht zuletzt den Spaß während und nach der Arbeitszeit.

Den Mitstreitern Marco Ieronimo (METAL!!!!) und Christian Mink („Schatzibär“), für die in jeglicher Hinsicht schöne gemeinsame Zeit.

Meiner Freundin Christiane, für Deine Liebe, für alles, was Du tust und bist.

Schließlich möchte ich besonders meinen Eltern und meinem Bruder danken, für Ihre fortwährende Unterstützung und all dem, das darüber hinaus geht.

„Lernen ist wie Rudern gegen den Strom. Hört man damit auf, treibt man zurück.“

Lao-Tse, Philosoph

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Motivation.....	1
1.2	Biologische Membranen.....	2
1.3	Das Peptaibol Alamethicin	5
1.3.1	Allgemeines zur Familie der Peptaibole	5
1.3.2	Biosynthese des Alamethicin	5
1.3.3	Das Alamethicin	6
1.3.4	Merkmale der Sekundärstruktur von Alamethicin.....	7
1.3.5	Alamethicin in Lipidmembranen	9
1.3.5.1	Allgemeines	9
1.3.5.2	Das Fassdaubenmodell	9
1.3.5.3	Topologie des Alamethicin im Kanal	10
1.4	Festkörper-NMR an Biomolekülen	12
1.4.1	Allgemeines.....	12
1.4.2	Kernspinwechselwirkungen im Festkörper.....	13
1.4.3	Strategie der Peptidstrukturanalyse via ¹⁹ F-Festkörper-NMR	14
1.4.4	Spinwechselwirkungen.....	16
1.4.4.1	Die Anisotropie der chemischen Verschiebung.....	16
1.4.4.2	Dipolare Kopplung	17
1.4.5	Einfluss der Beweglichkeit	18
1.4.5.1	Einfluss auf den CSA-Tensor.....	18
1.4.5.2	Einfluss auf die dipolare Kopplung.....	20
1.4.5.3	Einfluss der Molekülbewegung	21
1.4.5.4	Interpretation eines ¹⁹ F-Festkörperspektrums.....	22
1.5	Fluorierte, nicht-proteinogene Aminosäuren in Peptiden.....	24
2	Aufgabenstellung.....	26
3	Materialien und Methoden.....	27
3.1	Verwendete Materialien.....	27
3.1.1	Verwendete Chemikalien	27
3.1.2	Verwendete Geräte	28
3.1.2.1	RP-HPLC	28

3.1.2.2	Massenspektrometrie.....	29
3.1.2.3	NMR-Messungen.....	29
3.1.2.4	CD- und OCD-Messungen.....	29
3.2	Verwendete Methoden.....	30
3.2.1	Festphasenpeptidsynthese.....	30
3.2.1.1	Allgemeine Beschreibung der Peptidsynthese an fester Phase...	30
3.2.1.2	Peptidsynthese.....	31
3.2.1.3	Entschützen.....	32
3.2.1.4	Kupplung.....	32
3.2.1.5	Kaisertest.....	33
3.2.1.6	Standard-Abspaltungs-Prozedur.....	33
3.2.2	RP-HPLC-Analyse.....	34
3.2.2.1	Aufreinigung der Peptide.....	34
3.2.2.2	RP-HPLC mit chiralem Eluenten.....	34
3.2.3	Massenspektrometrie.....	35
3.2.4	Festkörper-NMR-Spektroskopie.....	35
3.2.5	Strukturmodelle zur Bestimmung der Orientierung von membranaktiven Peptiden.....	36
3.2.5.1	Bau der Modellstruktur und Standardorientierung.....	36
3.2.5.2	Orientierungsberechnung der Alamethicin-Modelle.....	38
3.2.6	CD-und OCD-Spektroskopie.....	39
3.2.6.1	Allgemeines.....	39
3.2.6.2	Probenvorbereitung.....	42
3.2.7	Antimikrobielle Untersuchungen.....	43
3.2.7.1	Prinzip.....	43
3.2.7.2	Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration.....	43
3.2.7.3	Bakterielle Testkulturen.....	45
3.2.7.4	Allgemeine Lösungen und Puffer.....	45
3.2.8	Hämolyse-Test.....	46
3.2.8.1	Prinzip.....	46
3.2.8.2	Durchführung.....	46
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Wahl der markierten Positionen und Synthesestrategie.....	47

4.2	Synthese der TfmAla-enthaltenden Tripeptide und Bestimmung der Stereochemie	51
4.2.1	Synthese	51
4.2.2	Identifikation der resultierenden Epimere	52
4.3	Synthese der ¹⁹ F-markierten Alamethicin-Analoga	53
4.4	Funktionelle Untersuchung der fluorierten Alamethicin-Analoga	55
4.5	Strukturelle Charakterisierung der fluorierten Alamethicin-Analoga mittels CD-Spektroskopie	57
4.6	Festkörper-NMR	59
4.6.1	³¹ P-Festkörper-NMR	59
4.6.2	¹⁹ F-Festkörper-NMR	60
4.6.2.1	Variation der Alamethicinkonzentration	60
4.6.2.2	Variation der Lipidkomposition	66
4.6.2.3	Variation der Temperatur	68
4.6.3	Zusammenfassung der Festkörper-NMR-Ergebnisse	71
4.7	OCD-Spektroskopie	72
5	Diskussion	75
5.1	Synthese der ¹⁹ F-markierten Alamethicin-Derivate	75
5.2	Einfluss der Trifluormethylgruppe auf Funktion und Topologie	76
5.3	¹⁹ F-Festkörper-NMR	77
5.4	CD-Spektroskopie	84
6	Ausblick	85
7	Zusammenfassung	86
8	Experimenteller Teil	87
8.1	Synthese des Z-TfmAla-OH	87
8.1.1	2-Benzoyloxycarbonylamino-3,3,3-trifluor-2-hydroxypropionsäuremethylester	87
8.1.2	2-Benzoyloxycarbonylimino-3,3,3-trifluorpropionsäuremethylester	87
8.1.3	<i>D/L</i> -N-Benzoyloxycarbonyl-2-trifluormethylaminosäuremethylester	88
8.1.4	<i>D/L</i> -N-Benzoyloxycarbonyl-2-trifluormethylalanin	89
8.2	Synthese der markierten Di- und Tripeptide	89
8.2.1	Peptidkupplung über TCTU-Aktivierung (Methode A)	89
8.2.2	N-terminales Entschützen: Hydrogenolyse (Methode B)	90

8.2.3	Peptidkupplung über das asymmetrische Anhydrid (Methode C).....	90
8.2.4	C-terminale Entschützen via TFA (Methode D).....	90
8.2.5	Fmoc-Ala-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Ala-OH.....	91
8.2.5.1	Z-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Ala-OtBu (1a).....	91
8.2.5.2	H-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Ala-OtBu (2a)	91
8.2.5.3	Fmoc-Ala-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Ala-OtBu (3a).....	92
8.2.5.4	Fmoc-Ala-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Ala-OH (4a)	93
8.2.6	Fmoc-Val-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Gly-OH.....	94
8.2.6.1	Z-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Gly-OtBu (1b)	94
8.2.6.2	H-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Gly-OtBu (2b)	94
8.2.6.3	Fmoc-Val-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Gly-OtBu (3b)	95
8.2.6.4	Fmoc-Val-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Gly-OH (4b)	96
8.2.7	Fmoc-Val-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Aib-OH.....	97
8.2.7.1	Z-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Aib-OtBu (1c).....	97
8.2.7.2	H-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Aib-OtBu (2c)	98
8.2.7.3	Fmoc-Val-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Aib-OtBu (3c).....	98
8.2.7.4	Fmoc-Val-(<i>R/S</i>)-TfmAla-Aib-OH (4c)	99
8.3	Synthese der fluorierten Alamethicin-Analoga	100
9	Literatur.....	101
10	Anhang.....	108
10.1	Abkürzungsverzeichnis	108
10.2	Auswerteprogramm Axis	110
10.3	Mathematica-Notebook	112
	Publikationsliste	118
	Lebenslauf.....	119

1 Einleitung

1.1 Motivation

Ein Pflanzensamen keimt inmitten von für ihn pathogenen Bodenmikroben ohne dabei abzusterben, bei Tieren ist die Hornhaut meist frei von Infektionen aller Art¹. Wie funktioniert in diesen Fällen der Mechanismus der Verteidigung vor schädlichen Kleinstlebewesen, welche Moleküle werden dabei verwendet und was sind deren Charakteristika?

Da gerade in der Medizin die Entwicklung von Resistenzen gegen Antibiotika zunehmend die Therapie erschwert, dienen einige dieser Moleküle als Leitstrukturen zum Verständnis ihrer Wirkungsweise und damit zur Entwicklung neuerer, besserer antibiotischer Pharmazeutika. Antimikrobielle Peptide (AMPs) stellen eine dieser Verteidigungslinien dar. Sie sind in großer Anzahl in der Natur vorhanden und werden in vielerlei Geweben und Zelltypen von Invertebraten, Prokaryoten, Pflanzen und Tieren produziert².

Um die Wirkweise eines antimikrobiellen Peptids im Detail zu verstehen, ist es notwendig, Erkenntnisse über die Dynamik und Struktur an seinem Wirkungsort, speziell an einer biologischen Membran, zu untersuchen. Gerade dynamische Prozesse wie Mobilität, Topologie und Oligomerisierung spielen hierbei eine große Rolle und sind auch stark abhängig von der Natur der Membran. Die Auswirkungen der antimikrobiellen Peptide auf eine Zellmembran sind generell unumstritten. Diese wandern zur Membran und stören deren Integrität derartig, dass essentielle Vorgänge wie Energieerzeugung über den Protonengradienten nicht mehr aufrechterhalten werden können oder Lyse zum Tod der Zelle führt³.

Etablierte Strukturuntersuchungsmethoden, wie die Röntgenstrukturanalyse oder hochauflösende Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR, von *nuclear magnetic resonance*) in Flüssigkeit, eignen sich für Biomembransysteme nur bedingt, da membranaktive Peptide ihre Struktur und damit auch ihre Wirkung nur in Umgebung einer Membran beibehalten. Hinzu kommen weitere Nachteile, wie die oft schwierige Kristallisierbarkeit eines solchen Systems und Vergleichbarkeit mit der biologisch relevanten Situation. Ein möglicher Ansatz zur Lösung der Struktur eines solchen AMPs in Membrenumgebung ist die Festkörper-NMR. Hierfür werden, analog zur hochauflösenden NMR, Isotopenmarkierungen benötigt, die das Signal-zu-Rausch-Verhältnis steigern und optimalerweise keinen natürlichen Hintergrund enthalten.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der strukturellen Untersuchung eines CF_3 -markierten, antibiotisch wirkenden Peptides, dem Peptaibol Alamethicin F30/3⁴, an verschiedenen Modellmembranen. Im Folgenden soll ein allgemeiner Überblick über die biologische Membran, die bisher bekannten Eigenschaften des Alamethicin, die Festkörper-NMR zur Strukturaufklärung von Peptiden in natürlicher Umgebung und fluorierte Aminosäuren gegeben werden.

1.2 Biologische Membranen

Biologische Membranen dienen nicht nur dem Schutz und der Abtrennung der Zelle von ihrer Umgebung. Sie ermöglichen ebenfalls jegliche Kommunikation und den Austausch zwischen Zellinnerem (Cytoplasma) und Zelläußeren (extrazellulärer Raum). Hier finden auch sehr viele enzymatisch katalysierte Reaktionen statt. Das von Singer und Nicolson⁵ eingeführte „fluid mosaic“-Modell (siehe Abbildung 1.1) bildet die Grundlage der heutigen Sicht einer Biomembran.

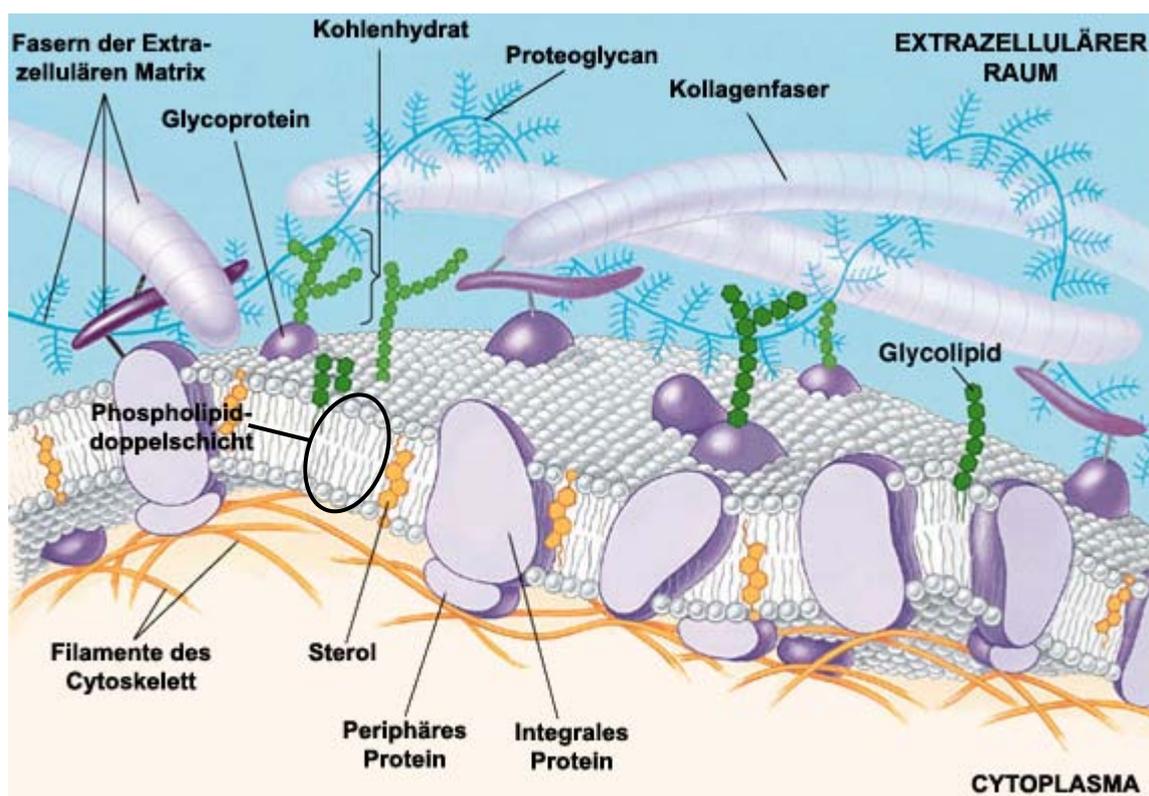


Abbildung 1.1: „Fluid Mosaic“-Modell einer eukaryotischen Zelle nach Singer und Nicolsen, modifiziert übernommen von <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/memb/fluidmosaic.jpg>

Es beschreibt die Membran als eine lateral bewegliche, flüssigkristalline Matrix, welche hauptsächlich aus einer Doppelschicht von Phospholipiden besteht. An ihrer Oberfläche oder in der Matrix integriert befinden sich andere Moleküle und Proteine, die als funktionale Stabilisatoren, Rezeptoren, Enzyme und selektive oder nicht-

selektive Transporter fungieren. Somit können lebenswichtige Funktionen wie zum Beispiel Erkennung und Unterscheidung körpereigener von fremden Stoffen und Aufrechterhaltung von Ionengradienten zwischen extrazellulärem Raum und Cytoplasma erfüllt werden.

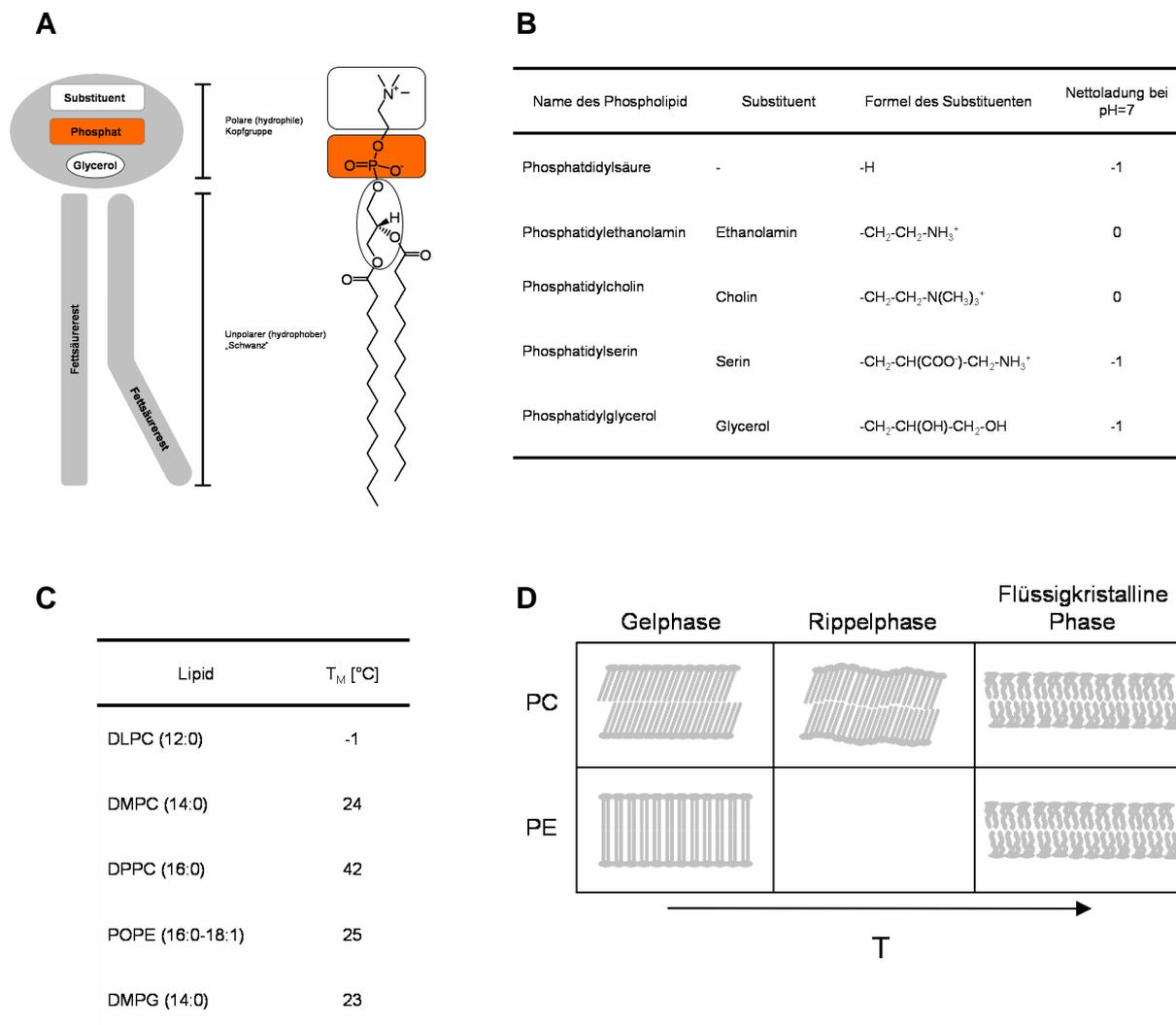


Abbildung 1.2: Darstellung zu Aufbau und Eigenschaften von Lipiden. **A:** Schematischer Aufbau eines Phospholipids, das sich in eine hydrophile Kopfgruppe und eine hydrophobe Schwanzgruppe einteilen lässt, daneben ist DMPC als Beispiel gezeigt. **B:** Tabelle mit wichtigen Kopfgruppen der Phospholipide, welche die Netto-Ladung des Lipids bestimmen. **C:** Tabelle der Phasenübergangstemperaturen einiger Lipide zum flüssigkristallinen Zustand **D:** Darstellung der Phasenübergänge zweier Phospholipide Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) vom dicht gepackten Gel in den lateral beweglichen, flüssigkristallinen Zustand mit Erhöhung der Temperatur.

Die Phospholipide ordnen sich gemäß ihrer amphipatischen Natur in der Art und Weise an, dass ihre hydrophobe Domäne (meist verschieden lange, gesättigte oder ungesättigte Fettsäurereste) in das Innere der Doppelschicht und die hydrophile Kopfgruppe nach Außen, zum Cytoplasma bzw. zur extrazellulären Flüssigkeit hin weist.

Natürliche Membranen setzen sich hierbei aus einer Vielzahl verschiedener Lipide⁶ zusammen. Diese variieren in Art der Kopfgruppe (Ladung) sowie Länge und Sättigungsgrad der Fettsäurereste, und bestimmen somit wesentlich den Zustand der Membran, wie z.B. ihre Fluidität (näheres zu diesen Eigenschaften siehe Abbildung 1.2). Außerdem können die hydrophilen Kopfgruppen je nach ihrer Nettoladung als Pseudorezeptoren⁷ für bestimmte Peptide fungieren.

Ein weiteres Charakteristikum von Biomembranen ist die Asymmetrie der Membran, d. h. die Komposition der Lipide der äußeren Schicht der Doppelschicht unterscheidet sich deutlich von der zum Cytoplasma hingewandten Lipidschicht.

In Abbildung 1.3 ist eine vereinfachte Übersicht der vorhandenen Lipide in Eukaryoten und Prokaryoten im Exo- bzw. Cytoplasma zusammengestellt.

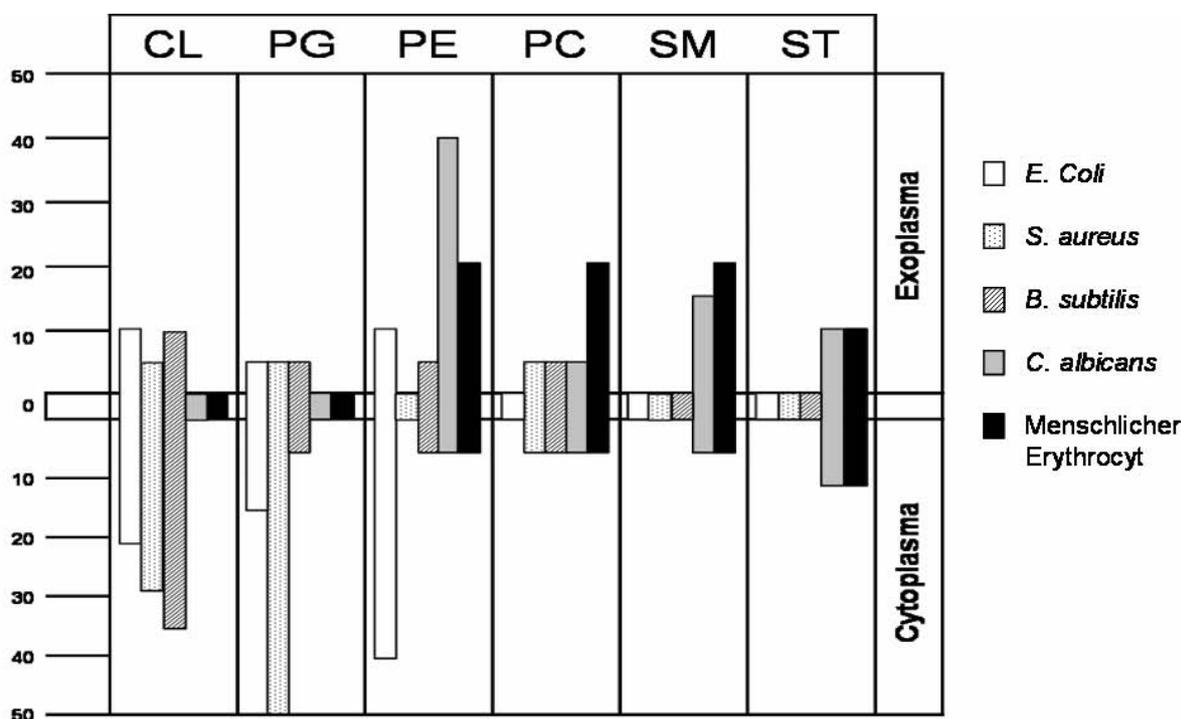


Abbildung 1.3: Vergleich der Zusammenstellung der Membranhälften prokaryotischer (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*) und eukaryotischer (*C. albicans*) Pathogene mit menschlichen Erythrocyten. Die Bausteine der Membran sind von anionisch geladen (links) nach zwitterionisch oder neutral (rechts) angeordnet (näheres siehe Text)⁷

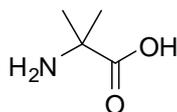
Eukaryotische Membranen bestehen hauptsächlich aus zwitterionischen Lipiden wie Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SM) und Sterole (ST). Letztere nehmen erheblichen Einfluss auf die Stabilität und Dynamik der Membran. In prokaryotischen Membranen hingegen findet man einen hohen Anteil an negativ geladenen Lipiden wie Phosphoglycerole (PG) und Cardiolipine (CL), aber keine Sterole.

Auf weitere Unterschiede im Aufbau zwischen gram-positiven und gram-negativen Bakterien soll hier nicht eingegangen werden.

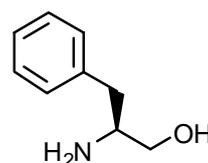
1.3 Das Peptaibol Alamethicin

1.3.1 Allgemeines zur Familie der Peptaibole

Peptaibole sind Sekundär-Metabolite von Pilzen, welche einen Wirt besiedeln und dort von totem oder abgestoßenem organischen Material leben⁸. Die Gattung der *Trichoderma*, ein Fadenpilz, ist die Hauptquelle dieser Metabolite. Der Name „Peptaibol“ hat seinen Ursprung in der Primärstruktur dieser Metabolite: Peptaibole sind **Peptide**, die einen hohen Anteil an unnatürlichen Aminosäuren, insbesondere α -Aminoisobuttersäure (**Aib**, U) [aber auch Isovaline (Iva), Hydroxyproline (Hyp) und Ethylnorvaline (Etnor)] und einen C-terminalen Aminoalkohol, wie z.B. Phenylalaninol (Pheol,Fol), enthalten⁹.



α -Aminoisobuttersäure, Aib, U



L-Phenylalaninol, Pheol, Fol

Ihre physikochemischen und biologischen Eigenschaften machten sie bald nach ihrer Entdeckung für die Forschung recht schnell interessant. So haben die Peptaibole ein breites Aktivitätsspektrum wie antibakterielle, antifungale, antivirale und/oder immunsuppressive Wirkung⁸. Bis heute sind mehr als 300 Verbindungen dieser Familie bekannt, welche in einer Datenbank im World Wide Web unter der Adresse <http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol> aufgezählt und kategorisiert sind.

1.3.2 Biosynthese des Alamethicin

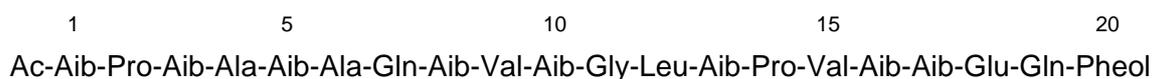
Erste Vermutungen auf Unterschiede in der Biosynthese von Alamethicin (Alm), verglichen mit der allgemeinen Peptid-Translation, wurden bereits 1967 von der Gruppe um *Reusser*¹⁰, den Entdeckern dieses Peptids¹¹, geäußert. So beobachteten sie beispielsweise keine Inhibition der Alm-Produktion in Anwesenheit des Translationshemmers Cycloheximid. Das Alm wird nicht-ribosomal im Organismus *Trichoderma viride* an einem Multienzym-Komplex, der so genannten Alm-

Synthetase, über den „multiple-carrier-thiotemplate“ Mechanismus¹² produziert. Die Synthetase konnte schließlich Mitte der siebziger Jahre von der Arbeitsgruppe um *Kleinkauf* und *Rindfleisch*^{13,14} nachgewiesen und aufgereinigt werden.

1.3.3 Das Alamethicin

Meyer und *Reusser*¹¹ erkannten 1967 als erste, dass das von ihnen isolierte Antibiotikum U-22324 einen ungewöhnlich hohen Anteil der nicht-proteinogenen Aminosäure α -Aminoisobuttersäure enthält. Da damals diese Verbindung in den *Chemical Abstracts* unter dem Namen „*alanine, methyle*“ eingetragen war, nannten sie dieses Peptid in Verbindung mit der Endung **-icin**, für seine antibiotischen Wirkung, Alamethicin (Alm).

Erst 10 Jahre später veröffentlichte *Pandey et al*¹⁵ die bis heute gültige Primärstruktur:



Die Probleme bei der Ermittlung dieser Sequenz lagen hauptsächlich darin, dass der Pilz *Trichoderma viride* das Alm mit weiteren, sehr ähnlichen Analoga, als heterogene Mischung synthetisiert. *Pandey et al*¹⁵ berichtet von zwei Hauptkomponenten, eine mit der oben abgebildeten Sequenz und eine andere Komponente, die an Position 18 Glutamin anstatt Glutaminsäure enthält. Neuerdings sind durch bessere Analysemethoden weitere Varianten⁴ des natürlich hergestellten Alm entdeckt worden (siehe Tabelle 1.1). Es soll auch erwähnt werden, dass die Heterogenität käuflicher Alm-Mixturen sehr stark vom Produzenten und den gewählten Bedingungen der biotechnologischen Herstellung abhängt. So ist die oben beschriebene Sequenz Alm F30/3 die Hauptkomponente der Mischung der Firma Upjohn, während die von Sigma und Fluka vertriebene Mischung die Alm-Variante F50/5 als Hauptbestandteil enthält⁴.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit ist mit Alm das in der Literatur am häufigsten zitierte Alm F30/3 gemeint.

Tabelle 1.1: Sequenzen der beiden Hauptbestandteile der Mixtur und relative Menge der Peptide⁴. Abkürzungen der Aminosäuren nach der Ein-Buchstaben-Nomenklatur, Ac=Acetyl, X=Val oder Iva. Alle Aminosäuren haben L-Konfiguration mit Ausnahme von D-Iva. Die beiden grau-unterlegten Sequenzen stellen jeweils den Hauptanteil in ihrer Gruppe dar.

Sequenz																						
Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	%	
F30/1	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	U	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	0,4
2	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	V	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	3,7
3	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	46,2
4	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	V	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	1,1
5	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	V	E	Q	Fol	2,6
6	Ac	U	P	U	A	U	A	E	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	1,9
7	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	39,8
8	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	L	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	1,1
9	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	V	E	Q	Fol	1,6
10	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	A	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	1,5
F50/2	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	A	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	0,8
3a	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	U	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	
3b	Ac	U	P	U	A	A	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	1,2
3c	Ac	U	P	U	A	U	G	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	V	Q	Q	Fol	
4a	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	V	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	5,2
4b	Ac	U	P	A	A	U	A	Q	U	U	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	
5	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	75,4
6a	Ac	U	P	U	U	U	A	Q	U	X	U	G	L	U	P	X	U	U	Q	Q	Fol	5,6
6b	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	X	U	G	L	U	P	X	U	X	Q	Q	Fol	
7	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	10,3
8a	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	L	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	
8b	Ac	U	P	U	U	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	0,6
8c	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	V	Q	Q	Fol	

1.3.4 Merkmale der Sekundärstruktur von Alamethicin

Die Sekundärstruktur von Alm ist intensiv mit verschiedenen biophysikalischen Methoden untersucht worden. So konnten *Richard* und *Fox*¹⁶ 1982 mittels Röntgenstrukturanalyse zeigen, dass Alm eine größtenteils α -helikale, rechtshändige Struktur aufweist. Dies steht im Einklang mit der anerkannten Eigenschaft des Aib, helikale Strukturen auszubilden^{17,18}. Aus der Analyse der drei Monomeren pro asymmetrische Zelle des Kristalls konnte zudem ein von Pro14 induzierter Knick nachgewiesen werden.

Die Alm-Sequenz enthält vier Aminosäurereste mit polaren Seitenketten: Gln7, Glu18, Gln19 und Pheol20, wobei die zuletzt genannte eine untergeordnete Rolle spielt. Als ebenfalls polar sind die Carbonyl-Sauerstoff-Atome des Aib10 und Gly11 anzusehen, da diese durch den Einschub des Imino-Ringes von Pro14 nicht mehr

zur Wasserstoff-Brückenbindung mit dem Peptidrückgrat zur Verfügung stehen und damit für Lösungsmittel etc. zugänglich sind.

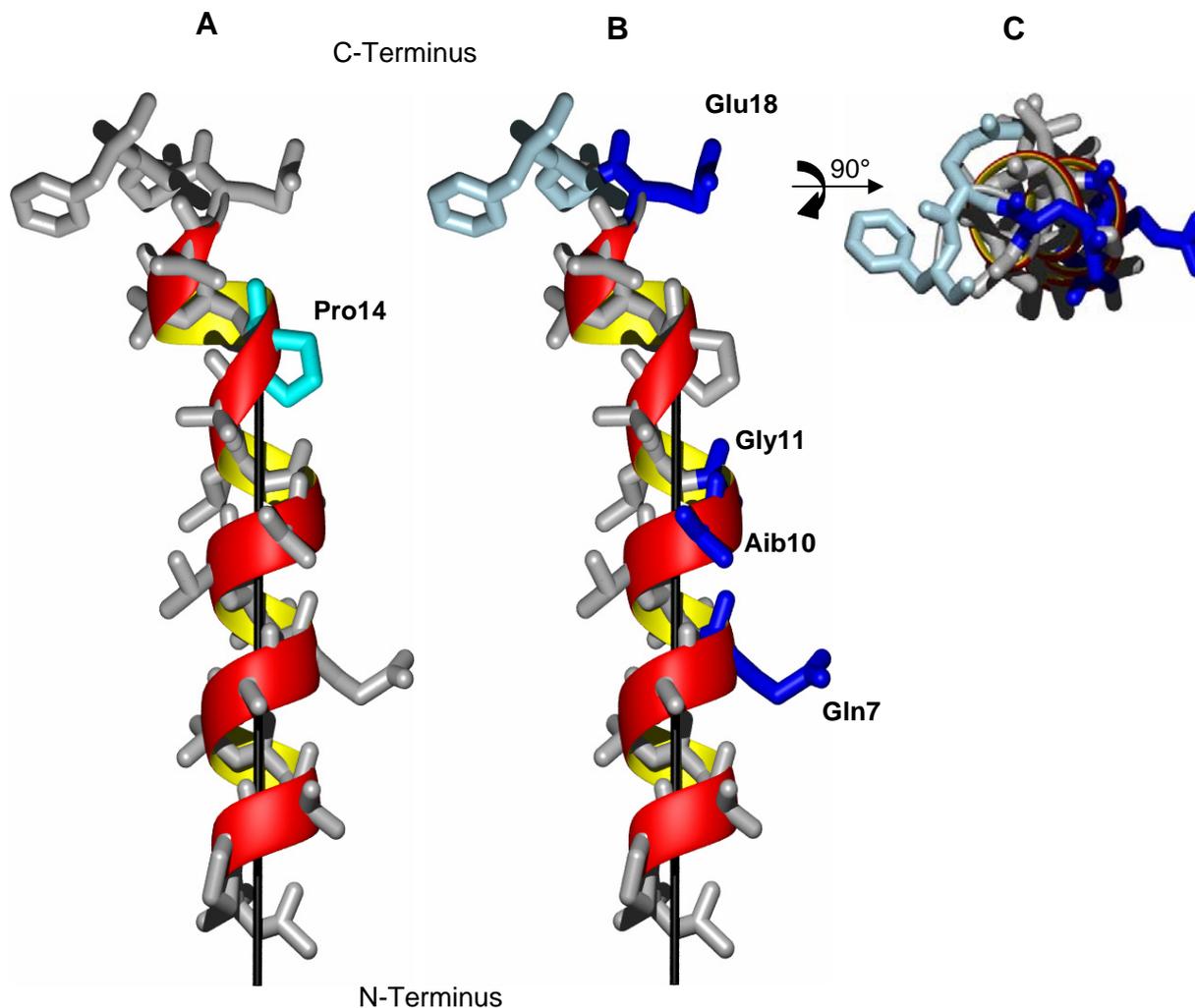


Abbildung 1.4: Ribbon-Darstellung des Alm (PDB-Code 1AMT). **A:** Prolin14 (cyan), **B:** hydrophile Aminosäuren (hell- und dunkelblau), **C:** Aufsicht auf Alm, die hydrophile Domänen bildende Aminosäurereste sind in dunkelblau gekennzeichnet, die hellblau gezeichneten Aminosäurereste tragen nicht diesem Bereich bei (siehe Text).

In der räumlichen Anordnung stehen die polaren Gruppen der Aminosäuren Gln7, Gly10, Aib11 und Glu18 auf der konvexen Seite der gebogenen Helix und bilden dadurch, wie in Abbildung 1.4 dargestellt, eine hydrophile Domäne. Die Amidgruppe der Seitenkette des Gln19 hingegen liegt nicht auf diesem polarem Band. Da die restlichen Aminosäuren hydrophoben Charakter haben, erhält das Peptid eine amphiphile Natur.

Das intramolekulare Wasserstoffbrückenbildungsmuster lässt weiterhin in der Nähe des Pro14 einen Anteil einer 3_{10} -Helix erkennen¹⁶. Allgemein kann man das Motiv der Sekundärstruktur des Alm F30/3 im Kristall als eine Abfolge von α - 3_{10} - α -Helices um

Pro14 beschreiben. Interessanterweise unterscheiden sich die C-terminalen Domänen der 3 Monomere der Einheitszelle in ihrer Kristallstruktur.

Spektroskopische Untersuchungen mittels NMR¹⁹⁻²², CD²³, *Raman* und FT-IR-Spektroskopie²⁴, in organischen Lösungsmitteln und Modellmembranen belegen die Befunde der Röntgenstrukturanalyse weitgehend. Auch hier nimmt das Alm eine überwiegend helikale Struktur an, jedoch findet man unterschiedliche Ergebnisse für den C-terminalen Bereich. Die Ergebnisse von *Franklin et al.*²² weisen auf eine hohe Flexibilität in der Mitte des Moleküls hin. Diese Beobachtung steht mit Resultaten aus molekulardynamischen (MD) Simulationen²⁵ in Einklang.

1.3.5 Alamethicin in Lipidmembranen

1.3.5.1 Allgemeines

Die besondere Eigenschaft des Alm besteht in der Ausbildung von spannungsabhängigen Ionenkanälen in Lipid-Doppelschichten²⁶, wodurch das Peptid bei Einlagerung in Lipidmembranen lytisch und somit antibiotisch wirkt. In welcher Art und Weise das Alm an die Membran bindet, wie sich die Struktur des Kanals gestaltet und welcher Zusammenhang zwischen der Struktur des Alm und seiner membranlytischen Aktivität besteht, war und ist noch immer Gegenstand der Forschung²⁷⁻²⁹. Da die Struktur durch kristallographische Studien bekannt ist, stellt Alm damit eines der meistuntersuchten Ionophore dar: Die Membran-Wechselwirkungen sowie der Mechanismus der Insertion in eine Membran bei An- und Abwesenheit einer angelegten Spannung sind jedoch im Detail noch immer ungeklärt. Im Folgenden wird eine Zusammenfassung über die momentan akzeptierte Wirkweise dieses Peptaibols in Membranen gegeben.

1.3.5.2 Das Fassdaubenmodell

Alm bindet an die Oberfläche von Lipid-Doppelschichten und kann in diese insertieren. Dieser Vorgang ist von Parametern wie Temperatur, Peptidkonzentration, molares Peptid-zu-Lipid-Verhältniss (P/L), der Natur des Lipids und des Hydratisierungsgrades abhängig⁸. Unter den verschiedenen Modellen, die postuliert wurden²⁶⁻²⁹, ist das so genannte „Fassdaubenmodell“ das am meisten akzeptierte. Hiernach ordnen sich die helikalen Alm-Monomere (diese stellen die „Dauben“ dar) ab einer bestimmten Konzentration in parallelen Bündeln an und bilden eine

transmembrane Pore (das „Fass“) aus (Abbildung 1.5). Die Anzahl an insertierten Monomeren bestimmt die Größe dieser Pore und damit auch die Durchlässigkeit für Ionen und Wasser. Die oben beschriebene hydrophile Domäne zeigt dabei in das Innere der Pore, der hydrophobe Bereich steht mit den ihn umgebenden Lipiden der Membran im Kontakt.

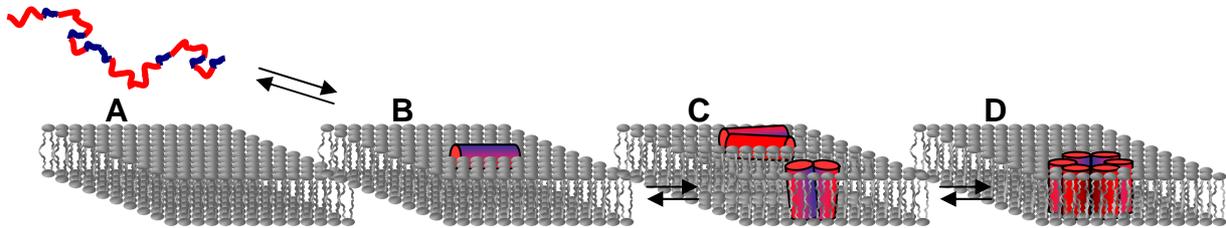


Abbildung 1.5: Das Fassdaubenmodell **A:** Das Peptid ist in Lösung unstrukturiert (hydrophile Domänen blau, hydrophobe Domäne rot dargestellt) **B:** Das Peptid bindet gemäß seiner amphiphilen Natur an die Oberfläche der Membran und nimmt eine wohldefinierte Struktur an. Dabei interagieren jeweils die hydrophilen Gruppen des Peptids mit den hydrophilen Kopfgruppen der Membran. **C:** Mit Erhöhung der Peptidkonzentration kommt es zuerst zu einer Anhäufung der Peptide an der Membranoberfläche, bevor diese ab einer charakteristischen Konzentration in die Membran insertieren und, wie in **D** wiedergegeben; unter Aufnahme weiterer Monomere Kanäle ausbilden. Wichtig bei einem solchen Mechanismus ist, dass sich die Peptidmonomere zuerst an der Oberfläche zu mindestens Dimeren zusammenlagern müssen, bevor sie in die Membran insertieren, da eine Einlagerung eines amphiphilen Monomers in eine Membran energetisch ungünstig ist. Die Weitere Aufnahme von Monomeren ist dann möglich^{2, 30, 31}.

Dieses Modell wird durch Untersuchungen mittels Neutronenstreuung^{32, 33} und vor allem durch Leitfähigkeitsmessungen³⁴ an Modellmembranen gestützt. Diese so genannten „single channel recording“ weisen bei einer angelegten Spannung von 125 mV auf einen diskreten, schrittweisen Aufbau des Kanals aus drei bis elf Alm-Monomeren hin. Alm ist dadurch zum einzigartigen Prototyp² des „Fassdaubenmodells“ geworden.

1.3.5.3 Topologie des Alamethicin im Kanal

Die orientierte Zirkulardichroismus-Spektroskopie (OCD, von oriented circular dichroism) (im Detail: siehe Kapitel 3.2.6) ist eine geeignete Methode, um die Konformation sowie die Orientierung des Peptids in einer Membran zu bestimmen. Die Gruppe um *Huang*^{33, 35, 36} wies damit eine Abhängigkeit der Insertion des Alm vom Hydratisierungsgrad der Membran und dem Verhältnis zwischen Peptid und Lipid nach. So wurde bei 98% Hydratisierungsgrad ein Grenzverhältnis von 1/120 Alm zu DPhPC bestimmt³⁷. Ist das molare Peptid zu Lipidverhältnis (P/L) geringer, liegt das Alm parallel zur Membranoberfläche (nach dem Shai-Matsuzaki-Huang-Modell³⁸: S-state, für surface-bound), liegt es darüber, ist das Peptid transmembran orientiert (I-state, für inserted). Einer theoretischen Studie zufolge³⁹ liegt Alm bei

Abwesenheit einer angelegten Spannung im S-state vor, nur bei einer Spannung von 0,1V inseriert das Alm in die Membran.

Detaillierte Studien des Kanals bei Abwesenheit einer Spannung in Modelmembranen basieren weitgehend auf MD-Simulationen⁴⁰⁻⁴⁴. Diese zeigen, dass die Konformation der Monomere im Kanal weitgehend (bis auf Fluktuationen um Gly11 bis Pro14) mit der Kristallstruktur übereinstimmen, die Anteile einer 3_{10} - gegenüber einer α -Helix differieren jedoch. Des Weiteren soll ein hexameres Alm-Homooligomer die stabilsten Kanäle ausbilden⁴³.

Es wurden zudem Festkörper-NMR-Messungen an einheitlich⁴⁵ oder selektiv ¹⁵N-markierten^{46, 47} Alm-Analoga durchgeführt. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse über Topologie und Struktur der Alm-Monomere im Kanal bei hohen P/L-Verhältniss (1/8) decken sich jedoch nur teilweise mit der Kristallstruktur. Beispielsweise sind die Ergebnisse zum Teil kompatibel mit einer durchgehenden, zum Teil jedoch mit einer „geknickten“ α -Helix.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorhandene Information über Struktur und insbesondere Dynamik des Alm-Kanals in Biomembranen noch Lücken bzw. Widersprüche aufweist, wie beispielsweise die Diskussion einer geraden Helix vs. geknickter Helix zeigt.

1.4 Festkörper-NMR an Biomolekülen

1.4.1 Allgemeines

Grundlage dieser Methode ist die Wechselwirkung des magnetischen Moments μ eines Atomkerns mit einem starken, konstanten äußeren Magnetfeld (nur Atomkerne, die eine ungerade Anzahl an entweder Protonen oder Neutronen enthalten, besitzen ein magnetisches Moment). Mathematisch miteinander verknüpft sind diese beiden vektoriellen Größen, das magnetische Moment μ und der Kernspin I , über

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{I} \quad \langle 1 \rangle$$

mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ als Proportionalitätskonstante, welche für jede Kernsorte charakteristisch ist. In Tabelle 1.2 sind die wichtigsten NMR-relevanten Parameter für Kerne aufgelistet, die für biologische Untersuchungen geeignet sind. Aus der Quantenmechanik ist bekannt, dass ein Kernspin I nicht jede beliebige Orientierung zum äußeren Magnetfeld annehmen kann, sondern dass nur wenige diskrete Orientierungen beobachtet werden, die so genannten Zeemann-Energieniveaus.

Tabelle 1.2: NMR-Parameter biorelevanter Kerne, modifiziert übernommen nach⁴⁸

Kern	Kernspin	$\gamma / 2\pi$ [MHz/T]	natürliche Häufigkeit [%]	Relative Empfindlichkeit [%]
¹ H	½	42,58	99,99	100
² H	1	6,53	0,02	0,96
¹³ C	½	10,7	1,11	1,59
¹⁵ N	½	-4,31	0,37	0,1
¹⁹ F	½	40,03	100	83,3
³¹ P	½	17,23	100	6,63

Bringt man einen Atomkern in ein magnetisches Feld, so sind die Energien der möglichen Zustände des Kernspins I nicht mehr entartet. Durch Einstrahlung elektromagnetischer Radiowellen können die Energiezustände der Kernspins I , ineinander überführt werden. Die Energiedifferenz ΔE ist bei einem Kernspin $I=1/2$ proportional zur Magnetfeldstärke B_0 mit:

$$\Delta E = \frac{h}{2\pi} \cdot \gamma \cdot B_0 = \frac{h}{2\pi} \cdot \omega_0. \quad <2>$$

Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum.

Der Zusammenhang von äußerem Magnetfeld B_0 mit detektierter Strahlung ist gegeben durch

$$\omega_0 = -\gamma \cdot B_0. \quad <3>$$

ω_0 ist die Larmorfrequenz und kann als die Winkelgeschwindigkeit interpretiert werden, mit der die Magnetisierung um das statische Magnetfeld präzediert.

Zur Aufklärung der Struktur von Biomolekülen sind vor allem die Kerne ^2H , ^{13}C und ^{15}N zu nennen. Diese Kerne müssen meist aufgrund ihrer geringen Empfindlichkeit (kleines gyromagnetisches Verhältnis) in der zu untersuchenden Probe angereichert oder an bestimmten Positionen selektiv eingeführt werden. Demgegenüber stehen die Kerne ^1H und ^{19}F , welche neben dem radioaktiven Tritium die höchsten gyromagnetischen Verhältnisse und dadurch die größte Empfindlichkeit haben. Hierbei hat der ^{19}F -Nukleus den Vorteil, dass er nicht natürlich in Biomolekülen vorkommt und somit kein störendes Hintergrundsignal während einer NMR-Messung liefert. Zudem sollte eine Substitution eines Protons mit einem Fluor-Kern aufgrund des geringen Größenunterschieds (van der Waals Radius von Fluor beträgt $1,47\text{Å}$, der von Wasserstoff $1,20\text{Å}$ ⁴⁹) wenig Einfluss auf die Struktur des Biomoleküls haben. Im Folgenden werden in kürze grundlegende Spinwechselwirkungen zwischen NMR-aktiven Kernen vorgestellt. Insbesondere wird etwas ausführlicher auf die in dieser Arbeit verwendete Strategie und Methodik der ^{19}F - (bzw. ^{31}P -) Festkörper-NMR sowie der Interpretation der erhaltenen Spektren eingegangen.

1.4.2 Kernspinwechselwirkungen im Festkörper

Wie oben beschrieben besteht eine Wechselwirkung zwischen einem NMR-aktiven Kern mit einem externen magnetischen Feld. Zusätzlich zu dieser Zeeman-Wechselwirkung bestimmen weitere, interne Wechselwirkungen die Resonanzfrequenz.

Zu den internen Wechselwirkungen zählt man die *chemische Verschiebung*, welche sich aus der elektronischen Umgebung des Kerns ergibt, und die *dipolare Kopplung* der Spins über den Raum untereinander. Ist die Kernspinquantenzahl größer als $\frac{1}{2}$ (als Beispiel sei hier Deuterium genannt), so werden *quadrupolare Wechselwirkungen* beobachtet. Ihr Ursprung liegt in einer „nicht-sphärischen“

Ladungsverteilung im Kern. Weiterhin können auch Wechselwirkungen über Bindungselektronen, der so genannten *J-Kopplung*, beobachtet werden. Diese spielen aber in der Festkörper-NMR nur eine untergeordnete Rolle, da die Größenordnung der *J-Kopplung* im Festkörper sehr gering im Vergleich zur dipolaren Kopplung ist und von ihr überdeckt wird.

In Tabelle 1.3 werden die Eigenschaften der Spinwechselwirkungen und deren Linienbreite aufgeführt.

Tabelle 1.3: Spinwechselwirkungen modifiziert nach⁵⁰.

Interaktion	Verursacher	Linienbreite [Hz]	Abhängigkeit von externen Magnetfeld
Zeeman	externes Magnetfeld	10^6 bis 10^9	Ja
chemische Verschiebung	elektronische Umgebung	0 bis 10^5	Ja
dipolare Kopplung	andere Kernspins (Wechselwirkung über den Raum)	0 bis 10^5	Nein
J-Kopplung	andere Kernspins (Wechselwirkung über Bindungen)	0 bis 10^2	Nein
quadrupolare Kopplung	elektrisches Quadrupolmoment	0 bis 10^9	(in erster Näherung) nein

1.4.3 Strategie der Peptidstrukturanalyse via ^{19}F -Festkörper-NMR

Normalerweise ist es für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie notwendig, alle Signale in einem Spektrum des zu untersuchenden Moleküls zu identifizieren und zuzuweisen. Ein etwas anderer Ansatz ist die Einführung einer ^{19}F -markierten Sonde an einer bestimmten Position im Peptid. Durch die selektive Einführung einer Markierung werden lokale Strukturparameter auf der Grundlage von Abstands- und Orientierungsabhängigkeit der NMR-Wechselwirkungen erhalten. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die Integrität und Funktion dieses Moleküls erhalten bleibt. Des Weiteren soll die Markierung wohldefiniert und in einer Art und Weise angeordnet sein, dass sie das gesamte Molekül repräsentiert.

Die aufschlussreichsten Strukturparameter, die das untersuchte Peptid in einer Modellmembran beschreiben, sind der Winkel θ eines markierten Segments bezüglich des externen statischen Magnetfelds und der Abstand r zwischen einem Paar inter- oder intramolekular wechselwirkender Markierungen (siehe Abbildung

1.6-A). Liegt ein Peptidmolekül in einer einfachen Konformation wie einer α -Helix vor, kann die Anordnung und Dynamik des Peptids bzw. des Proteins in einer Membran bereits durch wenige Strukturparameter beschrieben werden. Diese sind, wie in Abbildung 1.6-B an einer starren α -Helix (repräsentiert durch einen Zylinder) dargestellt, der Neigungswinkel τ des Peptids zwischen der Helixachse und der Membrannormalen N , der azimuthale Rotationswinkel ρ um die Helixachse und der molekulare Ordnungsparameter S_{mol} . Letztgenannter beschreibt die Dynamik des Systems, genauer gesagt die isotropische Ausmittelung durch die Bewegung.

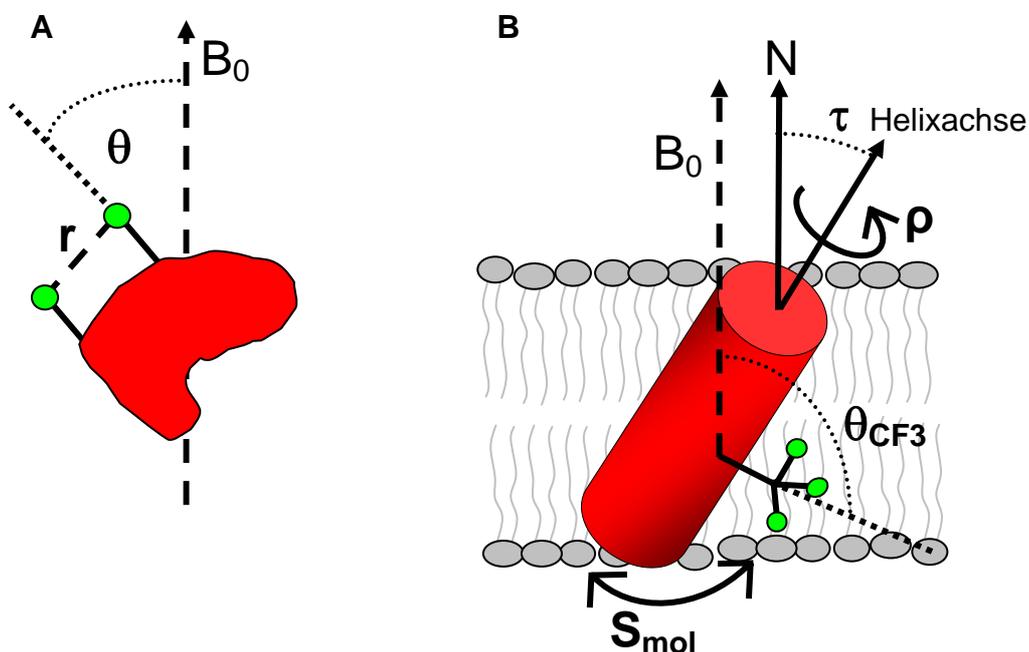


Abbildung 1.6: Darstellung der Struktur-Parameter für Markierungen mit ^{19}F (als grüne Kugeln abgebildet). Die Information über die Orientierung der NMR-Sonde erhält man über die Messung des Winkel θ oder θ_{CF_3} zwischen der Achse der NMR-Sonde und dem Magnetfeld B_0 . Dabei kann der Abstand r zwischen zwei Sonden (A) ermittelt werden. Die Ausrichtung des gesamten Moleküls kann mit den Parametern τ , ρ und S_{mol} (B) beschrieben werden (siehe Text).

Im Experiment kann der Winkel θ über zwei verschiedene anisotropischer Spinwechselwirkungen erhalten werden, der anisotropen chemischen Verschiebung (CSA) einer Markierung oder der dipolaren Kopplung zweier oder mehrere Markierungen. Die Bestimmung des Abstandes r kann ebenfalls über die dipolare Kopplung erfolgen, da sie aber für diese Arbeit nicht verwendet wurde, wird hier nicht weiter auf Abstandsmessungen eingegangen. Für die Realisierung der durchzuführenden ^{19}F -Festkörper-NMR werden uni-axial orientierte Proben benötigt, welche sich sehr leicht mittels mechanischer Orientierung von kosolubilisierten Lipid

und markierten Peptid auf Glasplättchen unter definierten Bedingungen herstellen lassen⁵¹⁻⁵⁴.

1.4.4 Spinwechselwirkungen

1.4.4.1 Die Anisotropie der chemischen Verschiebung

Die einen Atomkern umgebenden Elektronen treten ihrerseits mit dem äußeren angelegten Magnetfeld in Wechselwirkung. Dadurch induzieren sie ein lokales Magnetfeld (typischerweise um den Faktor 10^6 kleiner als B_0) und verändern, abhängig von Molekülgeometrie und Umgebung, das äußere, am Kern gespürte, Magnetfeld (man spricht hierbei von Abschirmung bzw. Entschirmung). Damit wird die Resonanzfrequenz des Kernspins geringfügig verschoben. Diese Auswirkung der chemischen Umgebung auf den Kern nennt man chemische Verschiebung. Sie wird aufgrund ihrer geringen Größe im Vergleich zur Zeemann-Wechselwirkung in ppm (*parts per million*) der Larmorfrequenz ω angegeben.

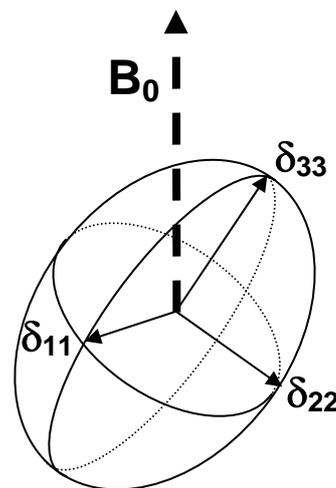


Abbildung 1.7: Darstellung eines nicht-symmetrischen CSA-Tensors δ als Ellipsoid mit den Hauptkomponenten δ_{11} , δ_{22} und δ_{33} .

Weiterhin ist durch die Abhängigkeit der nicht-sphärischen Elektronenwolke eine Orientierungsabhängigkeit der chemischen Verschiebung gegeben. Dieser anisotrope Effekt der chemischen Verschiebung (CSA, *chemical shift anisotropy*) tritt aber nur in hinreichend „festen“ Körpern auf, da ansonsten (zum Beispiel in Lösung) die Bewegung der Moleküle diese Orientierungsabhängigkeit über die Zeit gemittelt verschwinden lässt und man nur noch ein isotropes Signal beobachtet. Grund dafür ist, dass die Moleküle in Flüssigkeiten in zufälliger und schnell wechselnder Folge (GHz-Bereich) in allen möglichen Orientierungen vorliegen und somit sogar eine stark unsymmetrische Elektronenwolke auf der NMR-Zeitskala sphärisch erscheint. Mathematisch lässt sich die Orientierungsabhängigkeit durch eine 3×3 -Matrix als Tensor zweiten Ranges (in einem gegebenen Polarkoordinatensystem) beschreiben. Nach Diagonalisierung erhält man drei Hauptachsen eines Ellipsoiden, die Tensorkomponenten δ_{11} , δ_{22} und δ_{33} (in Abbildung 1.7 dargestellt). Sie sind definiert als $\delta_{11} \geq \delta_{22} \geq \delta_{33}$, wobei δ_{33} das am meisten und δ_{11} das am wenigsten abgeschirmte

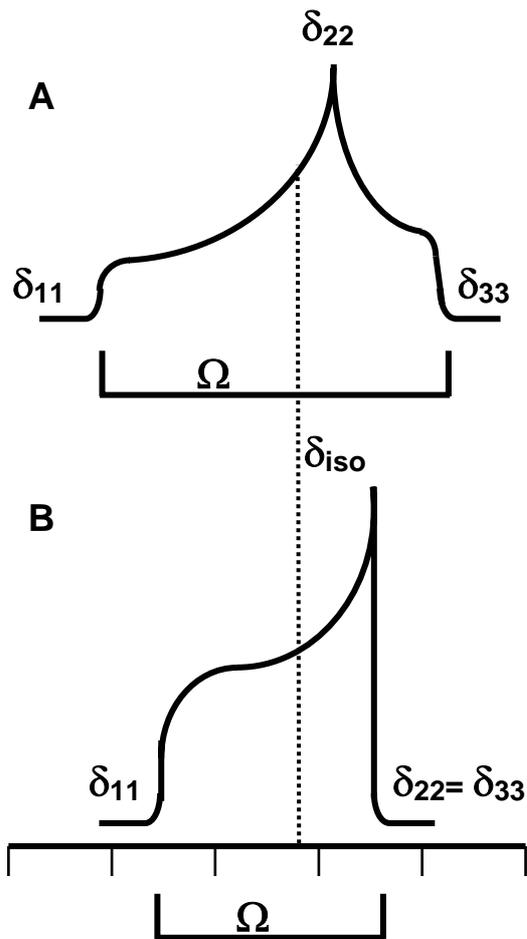


Abbildung 1.8: Typische Pulverspektren (näheres siehe Text) für nicht axial-symmetrische (A) und axial-symmetrische CSA-Tensoren (B).

Element des CSA-Tensors darstellt. Der isotrope Wert δ_{iso} ergibt sich zu $\delta_{iso}=(\delta_{11}+\delta_{22}+\delta_{33})/3$. In Abbildung 1.8 sind zwei so genannten Pulverspektren einer bewegungseingeschränkten Probe mit verschiedenen Tensorelementen dargestellt. Sie bestehen aus der Überlagerung der Signale aller im Raum möglichen Orientierungen und decken einen Frequenzbereich Ω ab. Die Intensität des Signals bei einer bestimmten Frequenz repräsentiert dabei die Anzahl der CSA-Tensoren mit gleicher Orientierung relativ zum externen Magnetfeld B_0 . Abbildung 1.8-A zeigt den allgemeinen Fall eines CSA-Tensors mit drei verschiedenen Hauptachsenwerten. Ein einfacherer Fall ist gegeben, wenn zwei der drei Tensorelemente gleich sind (Abbildung 1.8-B) und der CSA-Tensor durch zwei Elemente beschrieben wird. In der Praxis tritt dieser Fall dann auf, wenn

durch eine Bewegung mit axialer Symmetrie die Anisotropie teilweise ausgemittelt wird.

1.4.4.2 Dipolare Kopplung

Die dipolare Kopplung hat ihren Ursprung in der Wechselwirkung zweier magnetischer Dipolmomente μ_A und μ_B über den Raum. Dieser Effekt führt zu einer Aufspaltung des NMR-Signals und wird allgemein in Hertz angegeben. Die Aufspaltung ist hierbei unabhängig von der Stärke des Magnetfeldes. Sie ist jedoch abhängig von dem Abstand r_{AB} und dem Winkel θ zwischen der Verbindungsachse der beiden Kerne A und B und dem äußeren Magnetfeld.

Die Stärke der Dipolkopplung ist gegeben durch die Dipolkopplungskonstante D:

$$D = \gamma_A \gamma_B \frac{\hbar}{2\pi} \mu_0 / 2\pi r_{AB}^3 \quad \langle 4 \rangle$$

mit μ_0 als Permeabilitätskonstante des Vakuums.

Diese Orientierungsabhängigkeit entspricht der eines axial-symmetrischen Tensors^{48, 55} (was zu erwarten ist, da der Tensor der Dipol-Wechselwirkung intrinsisch axial-symmetrisch ist). Die Dipolkopplung führt zu einer winkelabhängigen Aufspaltung Δ_{AB} der Resonanzlinie:

$$\Delta_{AB}(\theta) = \Delta_{AB}^0 \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle / 2, \quad \langle 5 \rangle$$

wobei Δ_{AB}^0 die maximale Aufspaltung bei $\theta=0$ darstellt. Die Klammern $\langle \rangle$ kennzeichnen die zeitliche Ausmittlung über den Winkel θ . Koppeln zwei unterschiedliche Kerne, so ist $\Delta_{AB}^0 = D$, liegen zwei identische Kerne vor, ist $\Delta_{AA}^0 = 3D/2$. Damit kann man die Aufspaltung zweier Kerne A mit

$$\Delta_{AA}(\theta) = \Delta_{AA}^0 \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle / 2 = 3\gamma_A^2 \frac{h}{8\pi^2 r_{AA}^3} \mu_0 \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle / 2 \quad \langle 6 \rangle$$

in Abhängigkeit des Winkel θ beschreiben.

1.4.5 Einfluss der Beweglichkeit

Unter den Bedingungen, unter denen Biomoleküle normalerweise untersucht werden, ist es notwendig den Einfluss der Beweglichkeit mit einzubeziehen. So wird bei molekularer Bewegung das NMR-Spektrum durch „ausgemittelte“ Tensoren bestimmt, die sich als zeitliches Mittel der Tensoren in den verschiedenen auftretenden Orientierungen ergeben. Jegliche schnelle uni-axiale Rotation zum Beispiel, „projiziert“ alle Spinwechselwirkungen auf die Rotationsachse (vorausgesetzt die Rotation ist schnell gegenüber der NMR-Zeitskala).

Als Konsequenz daraus ergibt sich, wie in Kapitel 1.4.4.1 erwähnt, dass sogar ein unsymmetrischer CSA-Tensor das Spektrum eines axial-symmetrischen CSA-Tensor erzeugen kann. Welche Auswirkungen hat diese Tatsache auf die konkreten Spektren und wie sind diese zu interpretieren? Dies soll nun im Folgenden anhand für diese Arbeit relevanter Messungen dargestellt werden.

1.4.5.1 Einfluss auf den CSA-Tensor

Phospholipide sind, wie in Kapitel 1.2 beschrieben, ein Hauptbestandteil in biologischen Membranen und können um ihre Längsachse parallel zur Membrannormalen frei rotieren. Der resultierende CSA-Tensor des ^{31}P -Kerns (in Abbildung 1.9 orange dargestellt) wird daher axial-symmetrisch bezüglich der Rotationsachse.

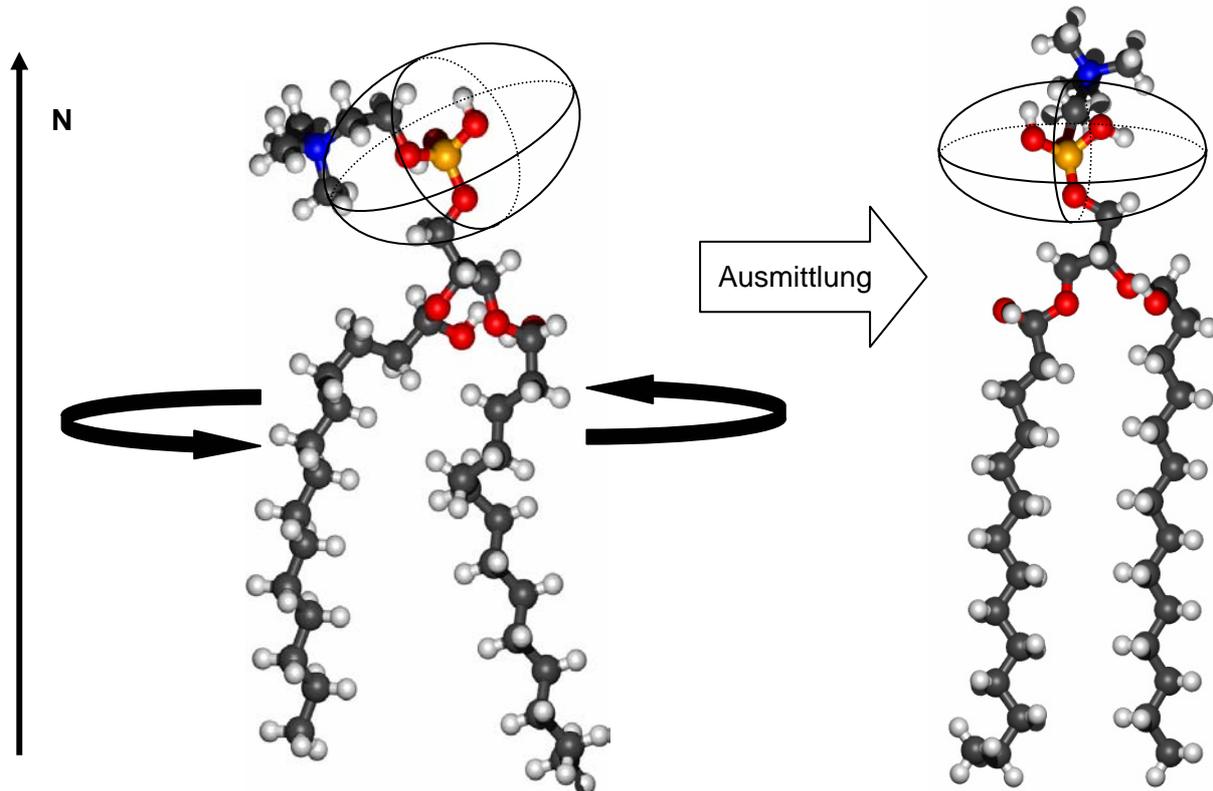


Abbildung 1.9: Ausmittlung des ^{31}P -Wechselwirkungstensors durch schnelle Rotation um die Längsachse eines beispielhaft gezeigten Phospholipids (C: grau, H: weiß, O: rot, N: blau, P: orange) parallel zur Membrannormalen N. Es resultiert ein neues Bezugssystem für den Tensor des ^{31}P .

Ordnet man Lipide zum Beispiel in multilamellare Vesikel (kugelförmige Gebilde) an, so ergibt sich beim Vermessen der Probe ein charakteristisches Pulverspektrum (siehe Abbildung 1.10-A), in welchem die parallel zum Magnetfeld angeordneten Lipidmoleküle der tieffeldverschobenen Schulter δ_{\parallel} entsprechen.

Die Anzahl der an den „Polen“ befindlichen Lipiden ist kleiner als die Anzahl der „äquatorial“-ständigen Lipide, welche im ^{31}P -Spektrum daher das größere Signal bei δ_{\perp} erzeugen. Die Signalintensitäten zwischen diesen beiden Extremen repräsentieren alle übrigen Orientierungen im multilamellaren Vesikel.

Nimmt man ein ^{31}P -Spektrum einer mechanisch orientierten Lipiddoppelschicht mit der Membrannormalen parallel bzw. um 90° gedreht zum externen Magnetfeld B_0 auf (siehe Abbildung 1.10-B und C), erhält man idealerweise ein scharfes Signal bei δ_{\parallel} bzw. δ_{\perp} . Eine Quantifizierung der Anteile an orientierten bzw. nicht-orientierten Phospholipide ist durch Integration des NMR-Spektrums zugänglich, da die Lage des Signals eine Funktion des Tensors bezüglich des externen Magnetfelds B_0 ist.

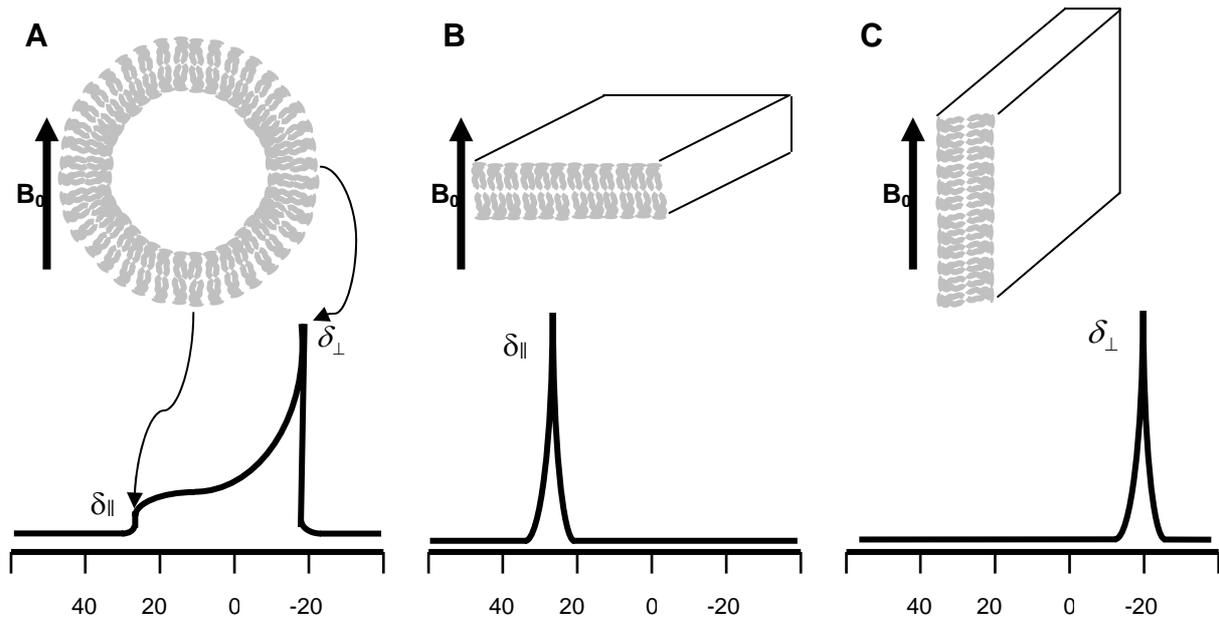


Abbildung 1.10: Charakteristisches ^{31}P -Spektren verschiedener Phospholipidanordnungen. A: multilamellares Vesikel. B und C: einheitlich orientierte Phospholipide mit 0 bzw 90° -Orientierung relativ zum äußeren Magnetfeld.

1.4.5.2 Einfluss auf die dipolare Kopplung

Wie schon mehrfach erwähnt, führt eine Rotation um eine Symmetrieachse zu einer Projektion aller Spinwechselwirkungen auf eben diese Achse. Deshalb kann der von Winkel θ orientierungsabhängige Term der dipolaren Kopplung umgeschrieben werden zu

$$\langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle / 2 = \langle 3 \cos^2 \beta - 1 \rangle / 2 \times \langle 3 \cos^2 \alpha - 1 \rangle / 2. \quad \langle 7 \rangle$$

Dabei stellt β den Winkel zwischen der Verbindungslinie der interagierenden Kerne und der Symmetrieachse sowie den Winkel α der Symmetrieachse zum Magnetfeld B_0 dar (siehe nebenstehende Abbildung 1.11). Für eine bei $T > -20^\circ\text{C}$ schnell rotierende CF_3 -Gruppe (die Fluoratome sind äquivalent) bedeutet das eine Halbierung der dipolaren Kopplung, da der Winkel zwischen der Verbindungslinie der Fluorkerne und der Rotationsachse 90° beträgt: $\langle 3 \cos^2 90^\circ - 1 \rangle / 2 = -1/2$. $\langle 8 \rangle$

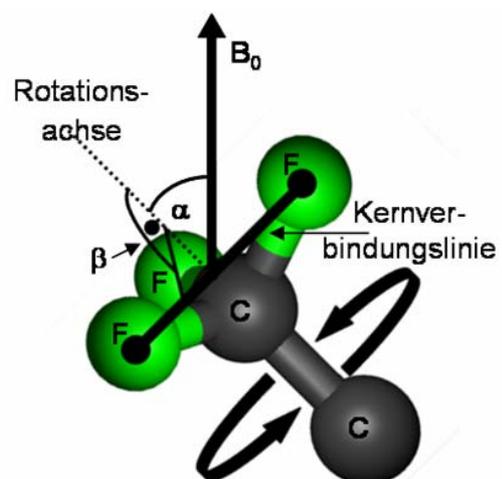


Abbildung 1.11: Darstellung des lokalen Rotationseinflusses auf relevante Winkel innerhalb der CF_3 -Gruppe.

1.4.5.3 Einfluss der Molekülbewegung

Im flüssigkristallinen Zustand, in dem sich Biomembranen bei Raumtemperatur für gewöhnlich befinden, kommen noch weitere Bewegungen hinzu.

Es ist bekannt, dass kleine Moleküle und kleinere Proteine in Lipidmembranen um die Membrannormale diffundieren (also rotieren, außer eine Aggregation oder Oligomerisierung findet statt). Geht man davon aus, dass eine CF_3 -Gruppe starr (hinsichtlich des Peptidrückgrates) in ein Peptid mit α -helikaler Sekundärstruktur eingeführt worden ist^{53, 56}, so unterliegt die CF_3 -Markierung ebenfalls dieser Rotationsbewegung. Analog, wie bei der Ausmittlung der F-F-Dipolkopplungen durch die Rotation um die Methylachse, lässt sich nun diese zweite Ausmittlung des Dipoltensors der CF_3 -Gruppe durch die Rotation um die Membrannormale betrachten. In diesem Fall ist der Winkel β der Winkel zwischen dem effektiven ausgemittelten, interagierenden Dipoltensor der CF_3 -Gruppe (d.h. der Methylachse) und der Membrannormalen. Der Winkel zwischen externem Magnetfeld B_0 und Membrannormalen ist dann Winkel α (siehe Abbildung 1.12). Damit hängt die dipolare Kopplung $\Delta\text{CF}_3(\theta)$ für eine orientierte Probe mit $\alpha=0$ nur noch von dem zeitlich gemittelten Winkel β zwischen der CF_3 -Rotationsachse und der Membrannormalen N ab. Man kann dann $\Delta\text{CF}_3(\theta)$ mit $\theta=\beta$ formulieren als

$$\Delta_{\text{CF}_3} = \Delta^0_{\text{CF}_3} \langle 3 \cos^2 \beta - 1 \rangle / 2. \quad \langle 9 \rangle$$

Ist der Winkel $\alpha=90^\circ$, so skaliert die dipolare Kopplung $\Delta\text{CF}_3(\theta)$ mit $-1/2$ und eine Rotation um eine Längsachse in der Membran ist bewiesen.

Gründe der zeitlichen Ausmittlung (beschrieben durch den Term in den Klammern $\langle \rangle$) sind lokale Oszillationen der C- CF_3 -Gruppe und eine globale Oszillation des gesamten Moleküls in der Membran. Fasst man diese Bewegungen in einem Parameter S_{mol} zusammen, erhält man dann für $\alpha=0$

$$\Delta_{\text{CF}_3} = \Delta^0_{\text{CF}_3} (3 \cos^2 \beta - 1) / 2 \times S_{\text{mol}}. \quad \langle 10 \rangle$$

β beschreibt nun die effektive Orientierung der CF_3 -Achse (entspricht der C- CF_3 -Bindungsachse).

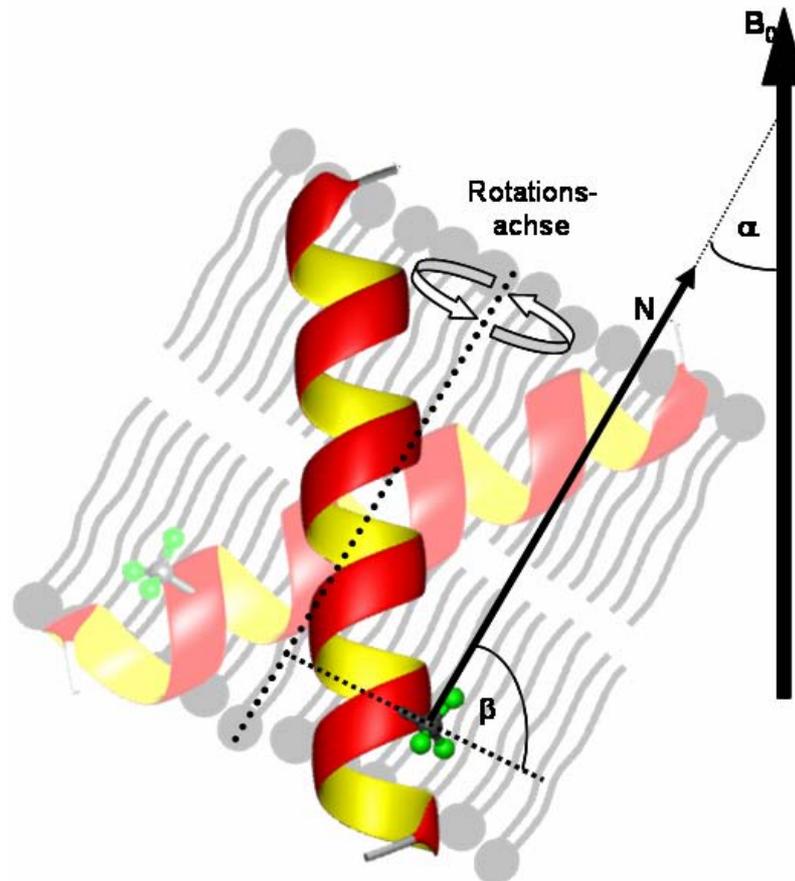


Abbildung 1.12: Schematische Zeichnung eines CF_3 -markierten (Fluor als grüne Kugeln dargestellt), α -helikalen Moleküls, rekonstituiert in einer Doppellipidschicht (grau). Das Molekül diffundiert innerhalb der Membran um die Rotationsachse. Die NMR-relevanten Winkel α und β (siehe Text) sind bezüglich der Membrannormalen N dargestellt.

Der molekulare Ordnungsparameter S_{mol} charakterisiert das Ausmaß an Beweglichkeit und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei ein kleiner Wert eine größere Beweglichkeit (nahezu isotropes Verhalten) und ein Wert nahe 1 für S_{mol} eine sehr eingeschränkte Rotationsbeweglichkeit darstellt.

1.4.5.4 Interpretation eines ^{19}F -Festkörperspektrums

In Abbildung 1.13 ist die Dipolkopplung der Fluorkerne als Funktion der Orientierung der CF_3 -Gruppe (in eine Aminosäure eingeführt) dargestellt. Daraus gehen folgende Erkenntnisse hervor:

- Spiegelsymmetrie um den Winkel $90^\circ \rightarrow$ man erhält immer zwei ununterscheidbare Lösungen
- die Aufspaltung der dipolaren Kopplung wird 0 bei einem Winkel von $54,7^\circ$ (und $125,3^\circ$) dem „magischen Winkel“; und
- das Vorzeichen der dipolaren Kopplung kann nur bei Werten größer als $7,9\text{kHz}$ eindeutig bestimmt werden.

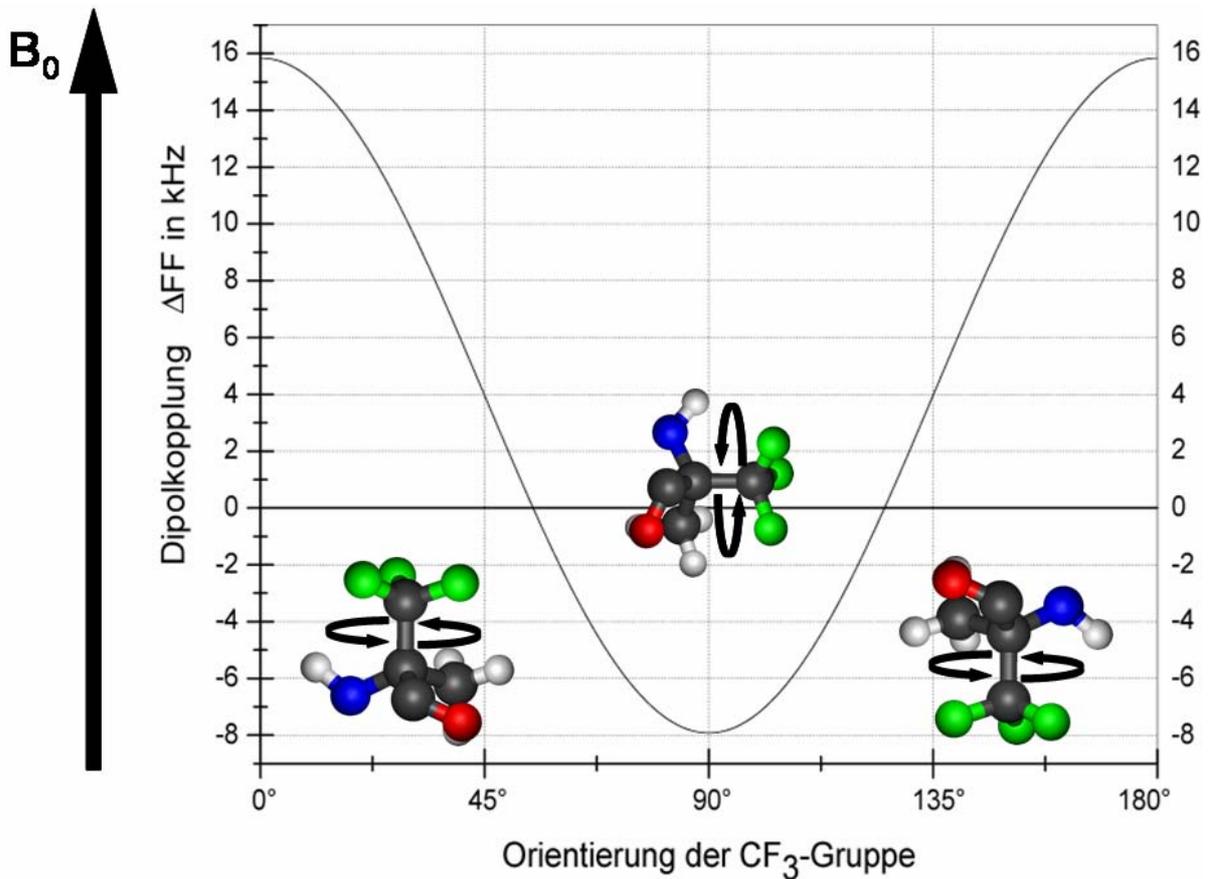


Abbildung 1.13: Dipolkopplung abhängig von der Orientierung der CF_3 -Gruppe. Die dargestellte Kurve gilt für die maximale Aufspaltung mit $S_{mol}=1$. Der Wert der maximale Aufspaltung $\Delta^0_{CF_3}$ ist aus vorhergehenden Studien^{55, 57} mit 15,8kHz für eine CF_3 -Gruppe übernommen worden.

Das Vorzeichen der dipolaren Kopplung bei Werten $<7,9$ kHz erhält man aus der chemischen Verschiebung, für welche eine analoge Abhängigkeit $(3\cos^2\beta - 1)$ für den mit dem Magnetfeld eingeschlossenen Winkel zutrifft. Das Vorzeichen ist positiv, wenn die chemische Verschiebung einer orientierten Probe tieffeldverschoben bezüglich des isotropen Wertes ist. Ist sie hochfeldverschoben, wird das Vorzeichen der dipolaren Kopplung negativ⁵⁸. Die Position des isotropen Wertes kann in der Festkörper-NMR durch Vermessen bei verschiedenen Orientierungen bestimmt werden. Misst man die auf Glasplättchen orientierte, flüssigkristalline Probe sowohl horizontal (0°) als auch vertikal (90°) zum externen Magnetfeld, bekommt man ein Signal, zentriert um δ_{iso} , mit $2/3$ bzw. $1/3$ Abstand zum isotropen Wert.

In Abbildung 1.14 sind beispielhaft Spektren von vermessenen CF_3 -Phg-markierten Peptiden mit 0° und 90° -Orientierung relativ zum Magnetfeld B_0 dargestellt⁵⁷. Im Gegensatz zu der skalaren J-Kopplung, bei welcher äquivalente Spins ein Signal (und keine Aufspaltung) ergeben, erzeugt eine rotierende CF_3 -Gruppe wegen der

homonuklearen dipolaren Wechselwirkung⁵⁹ ein Triplet mit dem Intensitätsverhältnis 1:2:1.

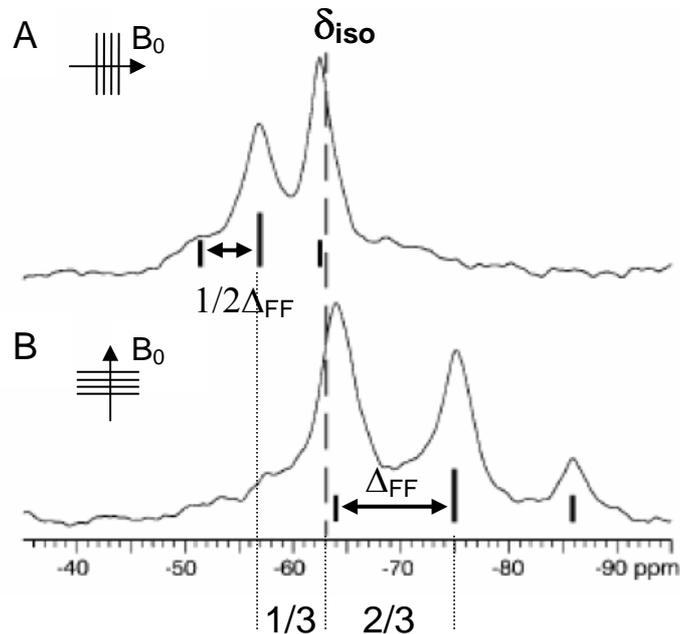
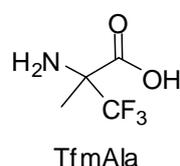


Abbildung 1.14: Modifiziert übernommen von⁵⁷. Das Spektrum A entstammt einer 90°-Orientierung (wie symbolisch angedeutet) der Membrannormalen zum Magnetfeld, Spektrum B einer Orientierung von 0°. Man erkennt die chemische Verschiebung relativ zur isotropen Position δ_{iso} sowie die unterschiedliche Skalierung der Aufspaltung Δ_{CF_3} in Abhängigkeit zur Orientierung der Membrannormalen relativ zum externen Magnetfeld. Die schwarzen Balken stellen die Positionen einer zu erwartenden Aufspaltung der CF_3 -Gruppe mit den Intensitäten 1:2:1 dar.

1.5 Fluorierte, nicht-proteinogene Aminosäuren in Peptiden

In die Peptidsequenz eingebaute, fluorierte Aminosäuren erhöhen im allgemeinen deren Stabilität gegenüber proteolytischen Abbau⁶⁰⁻⁶⁴, können aber auch die Sekundärstruktur stören. Weiterhin erhöht sich durch Substitution von 1H durch ^{19}F oder eine CF_3 -Gruppe die Lipophilie eines Peptids, womit eine bessere Permeabilität durch Zellmembranen und damit eine höhere Bioverfügbarkeit gewährleistet ist⁶⁵.

In Hinblick auf eine Untersuchung von Alm mittels ^{19}F -Festkörper-NMR bietet sich unter Rücksichtnahme der Primärstruktur und der Voraussetzung, dass eine Fluormarkierung möglichst steif am Peptidrückgrat sitzen sollte, die Mutierung von Aib zu Trifluormethylalanin (TfmAla) an.



Die Tfm-Gruppe hat folgende Eigenschaften:

- Hohe Elektronegativität, welche den pK_a der Aminosäure (verglichen mit Alanin) um mehrere Einheiten herabsetzt⁶⁶
- Sterischer Anspruch, der dem einer Isopropylgruppe gleichzusetzen⁶⁷ ist
- Tendenz zur Ausbildung von H-Brücken
- Potentielle Funktion als Ligand für Metalle
- Im Vergleich zur Mono- und Dimethylgruppe niedrige Toxizität und hohe Stabilität.

Diese leicht veränderten Eigenschaften der Trifluormethylgruppe gegenüber einer Methylgruppe sollten bei Markierung mit einem einzelnen TfmAla im Peptid nicht zu signifikanten Störungen der Struktur und der Funktion führen.

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die dreidimensionale Strukturanalyse und Untersuchung des Verhaltens des Peptaibols Alamethicin (Alm) in Biomembranen.

Zu diesem Zweck sollte die in der Arbeitsgruppe um Prof. Ulrich verwendete Methode der ^{19}F -Festkörper-NMR angewandt werden. Es sollte zuerst eine Strategie der infrage kommenden Positionen zur Substitution mit einer fluorierten Aminosäure erarbeitet werden. Aussagekräftige Ergebnisse der räumlichen Orientierung dieses Peptaibols (τ , ρ , S_{mol}) in einer Membran erhält man bei Gewinn von mindestens vier unabhängigen NMR-Parametern.

Da Alm einen hohen Anteil an der Aminosäure Aib enthält, wurde das F_3 -Analogon des Aib, das Trifluormethylalanin (TfmAla) als molekulare NMR-Sonde gewählt. Es sollte eine chemische Synthese der selektiven ^{19}F -Markierung an mehreren Positionen des Alm ausgearbeitet und etabliert, die vollständig synthetisierten Alm-Analoga aufgereinigt und charakterisiert werden. Die in Zwischenschritten entstehenden Epimere sollten getrennt und identifiziert werden.

Um zu gewährleisten, dass das modifizierte Peptid seine Funktion und Struktur durch die Einführung einer Fluormarkierung im Vergleich zur nativen Form beibehält, mussten funktionelle Tests (Hämolyse, minimale Hemmkonzentration) sowie qualitative Sekundärstrukturanalysen (CD) durchgeführt werden.

Die somit charakterisierten Alm-Analoga sollten dann in Modellmembranen unter verschiedenen Bedingungen (Variation des P/L-Verhältnis, Temperatur, Phospholipidkomposition) via ^{19}F -Festkörper-NMR untersucht, die relevanten Parameter τ, ρ und S_{mol} ermittelt und Rückschlüsse auf die Orientierung und Dynamik des Alm gezogen werden.

Abschließend sollten die Ergebnisse in Beziehung mit vorhandenen Modellen gesetzt und diskutiert werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 *Verwendete Materialien*

3.1.1 **Verwendete Chemikalien**

1,4-Dioxan	hauseigene Chemikalienausgabe
AN	Fischer
CAIBE	Merck
CDCl ₃	Sigma-Aldrich
CHCl ₃	Merck
Cholesterol	Avanti Polar Lipids
DCM	Merck
Diethylether	Merck
DIPEA	IRIS Biotech
DMF	Merck
DMPC	Avanti Polar Lipids
DMSO	Sigma-Aldrich
DMSO-d ⁶	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Roth
Essigsäureanhydrid	Fluka
Ethanol	Merck
Ethylacetat	Merck
Fmoc-Aib-OH	Novabiochem
Fmoc-Ala-OH	Novabiochem
Fmoc-Gln(Trt)-OH	IRIS Biotech
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	IRIS Biotech
Fmoc-Gly-OH	Novabiochem
Fmoc-Leu-OH	Novabiochem
Fmoc-Pro-OH	Novabiochem
Fmoc-Val-OH	Novabiochem
H-Aib-OH	Acros
H-Ala-OtBu·HCl	Bachem
H-Aib-OtBu·HCl	Bachem
HATU	Novabiochem

HCl	Roth
Hexan	Merck
H-Gly-OtBu·HCl	Bachem
H-L-Phe-ol-2Cl-Chlorotrietyl-Harz	IRIS Biotech
HOBt	IRIS Biotech
Isopropanol	Merck
Kieselgel 60	Merck
Kuper-(II)-acetat monohydrat	Sigma-Aldrich
Methanol	Fischer
NEM	Fluka
NMP	Merck
<i>N,N</i> -Di- <i>n</i> -propyl-L-alanin	Sigma-Aldrich
Pd/C-Katalysator	Merck
Phenol	Riedel-de-Haën
Piperidine	Roth
POPE	Avanti Polar Lipids
Pyridin	Fluka
TCTU	IRIS Biotech
TFA	Sigma-Aldrich
TFAA	Sigma-Aldrich
TFE	Sigma-Aldrich
THF	Acros
TIS	Sigma-Aldrich
Triethylamin	Fluka

3.1.2 Verwendete Geräte

3.1.2.1 RP-HPLC

Zur Überprüfung und Aufreinigung der Peptide wird eine HPLC-Anlage der Firma Jasco verwendet. Diese besteht aus zwei präparativen Pumpen 2087-PU, einem Hochdruckmischer 2080-DHD, einem Säulenthermostaten der Firma Dionex TCC-100, einem Diodenarray-Detektor MD-2010, einem Injektor der Firma Rheodyne und einer Jasco-Steuerbox LC-NET II. Zur Steuerung dieses Systems wird die mitgelieferte Software benutzt. Als RP-HPLC-Säulen werden verwendet: Vydac[®] C18

(analytisch, Typ-Nr.: 218TP54) und Vydac[®] C18 (semi-präparativ, Typ-Nr.: 218TP1020).

3.1.2.2 Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Charakterisierung wurde je nach Verfügbarkeit das hauseigene Massenspektrometer im FAB-Modus oder das MALDI-TOF-Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics des Arbeitskreises Richert (Institut für Organische Chemie, Universität Karlsruhe) verwendet.

3.1.2.3 NMR-Messungen

Die hochaufgelösten NMR-Messungen wurden in Karlsruhe an den hauseigenen NMR-Spektrometern, die Festkörper-NMR-Messungen an einem 500 MHz Bruker Avance II-Spektrometer durchgeführt. Die benutzte Software war Topspin-NMR 1.3. Zur Aufnahme der ³¹P-Festkörper-NMR-Spektren wurde ein Tripelresonanzprobenkopf (¹H/X/Y) der Firma Bruker, für die ¹⁹F-Festkörper-NMR-Spektren ein Flachspulprobenkopf von Doty Scientific. Die zu messende Probe kann manuell im Probenkopf gedreht werden, so dass NMR-Messungen der Probe bei unterschiedlichen Winkeln (vertikal und horizontal zum Magnetfeld) aufgenommen werden können.

Die zur NMR-Probenherstellung verwendeten Glasplättchen stammen von Marienfeld Glasware.

3.1.2.4 CD- und OCD-Messungen

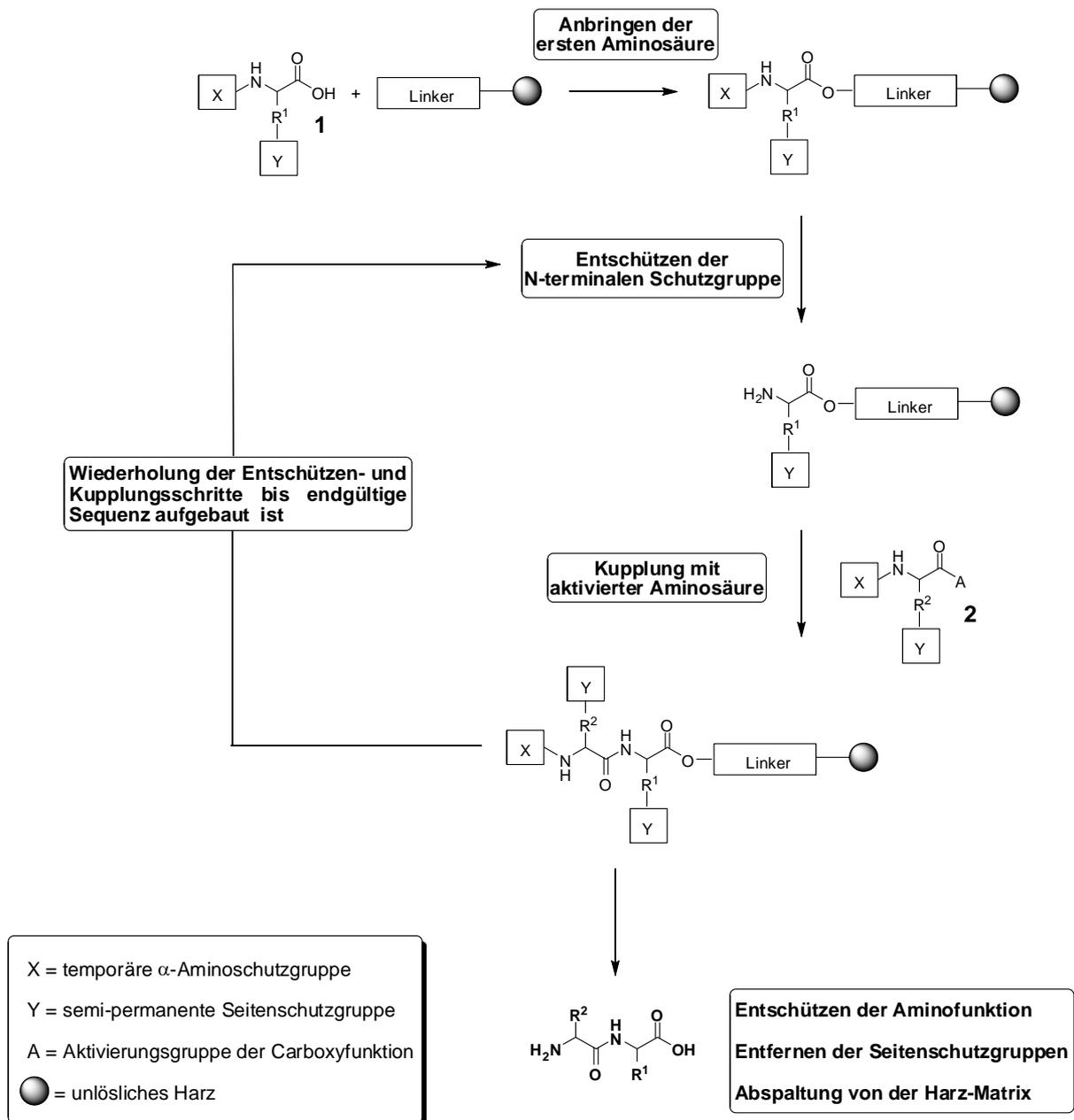
Die CD-Messungen wurden an einem Spektrometer J-810 der Firma Jasco gemessen. Für die OCD-Messungen wurde ein umgebautes Spektrometer derselben Firma verwendet.

3.2 Verwendete Methoden

3.2.1 Festphasenpeptidsynthese

3.2.1.1 Allgemeine Beschreibung der Peptidsynthese an fester Phase

Der systematische Aufbau eines Peptides in heterogener Phase an einem unlöslichen polymeren Träger (dem so genannten Harz) wurde 1963 erstmalig von Merrifield⁶⁸ vorgestellt. Das Prinzip dieser Vorgehensweise ist in Schema 1 illustriert.



Schema 1: Darstellung der sequenziellen Festphasenpeptidsynthese (SPPS, solid phase peptide synthesis).

Zuerst wird die C-terminale Aminosäure **1** des Zielpeptides an den so genannten Linker über deren Carboxyfunktion an das Harz angebracht (der Linker stellt hierbei die Verbindung zwischen dem Harz und der Aminosäure dar). Zu beachten ist, dass die α -Aminofunktion der Aminogruppe mit einer temporären Schutzgruppe und alle weiteren funktionellen Gruppen innerhalb der Aminosäure mit orthogonalen Schutzgruppen (Seitenschutzgruppen) geschützt sind. Eine orthogonale Schutzgruppe muss gegenüber den Bedingungen, die während der gesamten Synthese herrschen, stabil sein, wohingegen die temporäre Schutzgruppe selektiv vor jedem Knüpfungsschritt mit der darauf folgenden Aminosäure **2** entfernt werden muss. Anschließend erfolgt die Knüpfung einer Peptid-Bindung mit einer ihrerseits orthogonalen und temporär geschützten Aminosäure **2**. Dieser als Kupplung bezeichnete Schritt erfolgt entweder über die preaktivierte oder über die *in situ* gebildete reaktive Spezies der in Lösung befindlichen Aminosäure **2**.

Durch Wiederholen der eben beschriebenen Schritte wird die endgültige Sequenz aufgebaut, die temporäre Schutzgruppe final entschützt und das Peptid von dem Harz, im Idealfall unter gleichzeitiger Entfernung der semipermanenten Seitenschutzgruppen, endgültig abgespalten.

Somit erfolgt die Synthese auf chemischen Weg vom C-Terminus zum N-Terminus der Aminosäuresequenz, entgegengesetzt zur Biosynthese. Die Festphasensynthese hat gegenüber der Synthese in Lösung den Vorteil, dass durch Ablassen der Reaktionslösung und Waschen des Harzes die teilweise recht aufwändigen Reinigungs- und Aufarbeitungsschritte, welche bei der Synthese in Lösung nötig sind, vermieden werden können. Hinzu kommt, dass während der SPPS mit einem Überschuss an Aminosäure **2** und Kupplungsreagenz gearbeitet wird, um das Reaktionsgleichgewicht so weit wie möglich auf die Produktseite zu verschieben. Der Nachteil der SPPS liegt in dem kumulativen Effekt von unvollständigen Kupplungen. Dadurch entstehen Abbruchpeptide, die die Ausbeute des Zielmoleküls reduzieren und dessen Aufreinigung durch chromatographische Methoden erschweren können.

3.2.1.2 Peptidsynthese

Die Peptidsynthesen an fester Phase wurden manuell durchgeführt. Bei der Durchführung der Synthesen wurde das von Fields und Noble eingeführte Standardprotokoll für Fmoc-Peptidchemie⁶⁹ verwendet. Dabei wird das basenlabile Fmoc^{70, 71} als temporäre N- α -Schutzgruppe sowie die säurelabilen *t*Bu und Trityl⁷² als

dazu orthogonale Seitenschutzgruppen verwendet (Prinzip: siehe Schema 1). Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch mindestens 45min entgast. Zwischen jedem einzelnen Syntheseschritt wurde das Harz vier bis fünfmal mit DMF gewaschen. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte näher beschrieben.

3.2.1.3 Entschützen

Das Entfernen der Fmoc-Gruppe wird normalerweise durch Zugabe von 20-25% (v/v) Piperidin in DMF für 30min zum Harz erreicht. Der entscheidende Schritt ist die Deprotonierung des Fluorenylringes unter Ausbildung des Dibenzofulvens und CO₂. Die Reaktion wird im Falle der manuellen Synthese mittels Kaiser-Test (Kapitel 3.2.1.5) verfolgt. Ist die Dauer des Entschützungsprozess nicht ausreichend, wird die beschriebene Prozedur so oft wiederholt, bis sich das entsprechende Ergebnis einstellt. In sehr schwierigen Fällen wird eine Mischung von 2% (v/v) DBU und 2% (v/v) Piperidin in DMF verwendet.

3.2.1.4 Kupplung

Die verwendeten Kupplungsreagenzien für SPPS sowie Fragmentkondensation an fester Phase und deren stöchiometrischen Verhältnisse während der Synthesen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Vollständigkeit der Kupplung wird in der manuellen Synthese mittels Kaiser-Test verfolgt.

Tabelle 3.1: *Verwendete Äquivalente während der SPPS und Fragmentkondensation bezüglich der Beladung der Harzes mit dem Startaminoalkohol.*

Kupplungsreagenz	System	Bedingungen
HATU	SPPS	Fmoc-AA-OH/HATU/DIPEA = 3/3/6, DMF als Lösemittel, 3h Reaktionszeit
HATU	Fragmentkondensation der fluorierten Tripeptide	fluoriertes Tripeptid/HATU/DIPEA = 1,2/1,2/2,4 DMF als Lösemittel, 12h Reaktionszeit

3.2.1.5 Kaisertest

Der Kaisertest⁷³ dient zur Detektion von freien primären Aminofunktionen. Mit ihm kann semiquantitativ über eine Farbreaktion der Erfolg der Kupplungsreaktion (keine freie Aminofunktion) und der Entfernung der N- α -Schutzgruppe überprüft werden.

Herstellung der Lösungen :

Unter Erwärmen werden 2 g flüssiges Phenol in 0,5 ml Ethanol gelöst. Eine zweite Lösung mit 13 mg KCN wird in 20 ml Wasser angesetzt, davon werden 20 μ l in 980 μ l Pyridin gegeben. Anschließend werden 100 μ l der Phenol/Ethanol-Lösung zu der Mischung aus Pyridin und KCN-Lösung gegeben und die Mischung als Kaiser-Lösung A bezeichnet. Kaiser-Lösung B wird durch Lösen von 1 g Ninhydrin in 20 ml trockenem Ethanol erhalten.

Durchführung:

In einem 2 ml Reaktionsgefäß werden jeweils zwei Tropfen der Lösungen A und B gegeben. Nach Zugabe von mindestens sechs Kügelchen des Harzes wird die Lösung für zwei Minuten auf 120°C erhitzt. Eine Blaufärbung ist ein Indikator für eine freie primäre Aminofunktion, während eine gleich bleibend gelbe Lösung als Indiz für deren Abwesenheit gilt.

3.2.1.6 Standard-Abspaltungs-Prozedur

Zu dem mit Methanol gewaschenen und im Vakuum getrockneten Harz wird für viermal 10min die Abspaltungs-Lösung TFA/DCM/H₂O/TIS im Verhältnis 45/50/2,5/2,5 (v/v/v/v) (20 ml Lösung/g Harz) gegeben und gelegentlich geschüttelt. Nach Ablauf der Zeit wird das Harz abfiltriert und mit DCM gewaschen. Das Filtrat und die Waschlösung werden vereinigt und im N₂-Strom verdampft. Anschließend wird das Rohpeptid in kaltem Diethylether präzipitiert und 1 h bei 4°C gelagert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, von der überstehenden Lösung befreit, in einem Gemisch von Acetonitril und Wasser im Verhältnis 1/1 (v/v) aufgenommen und lyophilisiert. Die somit erhaltenen, pulverförmigen Rohpeptide werden dann weiter mittels RP-HPLC aufgereinigt.

3.2.2 RP-HPLC-Analyse

3.2.2.1 Aufreinigung der Peptide

Für die chromatographische Aufreinigung werden standardmäßig Acetonitril und Wasser in einem Verhältnis von 9/1 (v/v, Lösung A) bzw. 1/9 (v/v, Lösung B) verwendet. Als Ionenpaarreagenz dient 5 mM HCl anstatt der üblichen TFA, um einen Hintergrund während der ^{19}F -Festkörper-NMR-Messungen zu vermeiden. In Tabelle 3.2 sind die beiden verwendeten Gradienten für die analytische und semipräparative RP-HPLC zusammengefaßt.

Tabelle 3.2: Verwendete RP-HPLC-Gradienten zur Aufreinigung und Bestimmung der Reinheit der Peptide.

	Analytische RP-HPLC		Semipräparative RP-HPLC	
Temperatur [°C]	35		35	
Flußrate [ml/min]	1,5		6,0	
Menge der aufgegeben Substanz	nicht bestimmt		5mg des Rohpeptids in 1ml Laufmittel A unb B (2/3)	
	Zeit [min]	Lösung A [%]	Zeit [min]	Lösung A [%]
	0,0	95	0,0	50
	1,5	95	3,0	50
Gradient	16,5	5	9,0	5
	17,5	5	10,5	5
	18,5	95	11,5	50
	20,0	95	13,0	50

Die gesammelten HPLC-Fractionen wurden eingefroren und lyophilisiert. Das erhaltenen weiße Pulver wurde mittels FAB- oder MALDI-TOF-Massenspektroskopie identifiziert und nochmals über analytische RP-HPLC auf seine Reinheit überprüft.

3.2.2.2 RP-HPLC mit chiralem Eluenten

Zur Identifikation der Stereochemie des TfmAla, inkorporiert in die Tripeptide, wurde eine analytische RP-HPLC mit einem chiralem Eluenten bei 20°C und 1ml/min Flußrate an einer C18-Säule durchgeführt.

Die chirale mobile Phase bestand aus Triethylamin (0,10 g/l) Kupfer-(II)-acetat•Monohydrat (0,39 g/l) und *N,N*-Di-*n*-propyl-L-alanin (0,68 g/l) in Wasser

gelöst, welche dann durch Zugabe mittels 1M wässriger Essigsäure auf pH=5,15 gebracht wurde⁷⁴.

Die Tripeptide bzw. die Referenzsubstanzen (siehe Kapitel 4.2.2) wurden jeweils in einer Konzentration von 1,00 g/l (Tripeptide 4a-c) bzw. 0,30 g/l (Referenzen) mittels 6 M HCl bei 110°C für 24 h hydrolysiert. Somit wurde dafür gesorgt, dass die Tripeptide gespalten und die Fmoc-Schutzgruppe entfernt wurde. Weiterhin liegen unter diesen Bedingungen alle vorhandenen Aminosäuren in ihrer N- bzw C-terminal freien Form als Chloride vor. Diese Lösungen wurden eingefroren und lyophilisiert. Die resultierenden Feststoffe wurden in 1 mL der chiralen Phase gelöst, 20 µL davon auf die HPLC aufgegeben und die Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Durch Vergleich der Retentionszeiten der Referenzen mit den entsprechenden Tripeptiden erfolgte dann die eindeutige Zuordnung (siehe Kapitel 4.2.2).

3.2.3 Massenspektrometrie

Die zu untersuchenden Proben wurden entweder mit einer Matrix von α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CHCA) in AN/H₂O (1:1, v/v) oder mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in 50 %Vol. AN, 49,9 %Vol., H₂O und 0,1 %Vol. TFA auf dem rostfreien Stahl-„Target“ co-kristallisiert.

3.2.4 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die mechanisch auf Glasplättchen orientierte Proben für die Festkörper-NMR-Experimente wurden wie folgt präpariert⁵³.

Zuerst wurde die Peptid-Lipid-Mixtur, in gewünschtem molaren Verhältnis zueinander, in Methanol/Chloroform in einem Verhältniss von 1/1 (v/v) kosolubilisiert und auf dünne Glasplättchen (0,08 x 7,5 x 18 mm³) aufgetragen (20 µl pro Blättchen). Der entstandene Membranfilm wurde über Nacht im Vakuum getrocknet. Die Glassplättchen konnten dann gestapelt und in einer Atmosphäre über gesättigter K₂SO₄-Lösung bei 48°C für 2 Tage hydratisiert (ergibt eine relative Luftfeuchtigkeit von 98%) werden. Zum Schutz vor Austrocknung wurde der Stapel in Parafilm und Polyethylenfolie eingewickelt, um einen gleich bleibenden Hydratisierungsgrad der Probe zu gewährleisten.

Zur Messung der ^{31}P - und ^{19}F -Festkörperspektren wurden etablierte Pulssequenzen verwendet^{48, 75}. Als Referenzsubstanz der ^{19}F -Signale diente eine 10mM wässrige Lösung von 1 M NaF mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = -119,5 \text{ ppm}^{48}$.

3.2.5 Strukturmodelle zur Bestimmung der Orientierung von membranaktiven Peptiden

3.2.5.1 Bau der Modellstruktur und Standardorientierung

Mit Hilfe der Software MOLMOL⁷⁶ kann nach der Eingabe der Sequenz des Alm die entsprechenden Sekundärstrukturen durch manuelle Angabe der dihedralen Winkel eingestellt werden. Für eine α -Helix wurden die Winkel $\phi=-57^\circ$ und $\psi=-47^\circ$, für eine 3_{10} -Helix die Winkel $\phi=-50^\circ$ und $\psi=-27^\circ$ verwendet. Dafür mussten zuerst die Aminosäuren Aib, Pheol und (*R/S*)-TfmAla in MOLMOL implementiert werden. Als Quellen dienten hierzu für Aib und Pheol die öffentlich zugängliche Seite der PDB-Datenbank (<http://www.rcsb.org>). Für die Enantiomere des TfmAla wurden Koordinaten einer bekannten Kristallstruktur genutzt⁷⁷.

Für jede substituierte Seitenkette (an Position 5, 10 und 16 jeweils beide Enantiomere des TfmAla) wurden entsprechende Helixmodelle erstellt, welche anschließend mittels des Programms COSMOS⁷⁸ geometrieoptimiert wurde, die Kristallstruktur ist nicht optimiert worden. Eine graphische Darstellung der ϕ - und ψ -Winkel der jeweiligen Modellstrukturen ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Die so erstellten fluorierten Alm wurden, um die Ergebnisse vergleichbar zu gestalten, in ihrer Position normiert. Die Helixachse wurde in der so genannten Standardorientierung entlang der Z-Achse (C-Terminus in positive Z-Richtung), das C^α -Atom an Position 12 (Leu) in Richtung der X-Achse ausgerichtet.

Die entsprechenden Drehungen wurden mit Hilfe eines schon vorhandenen Programmes „Axis“ (siehe Anhang 10.2) berechnet und in dem Molekülvisualisierungsprogramm MOLMOL umgesetzt. Aus den resultierenden PDB-Dateien konnten dann die Koordinaten der substituierten Seitenketten (genauer das C^α - und C^βF_3 -Atom der TfmAla-Aminosäure) extrahiert werden.

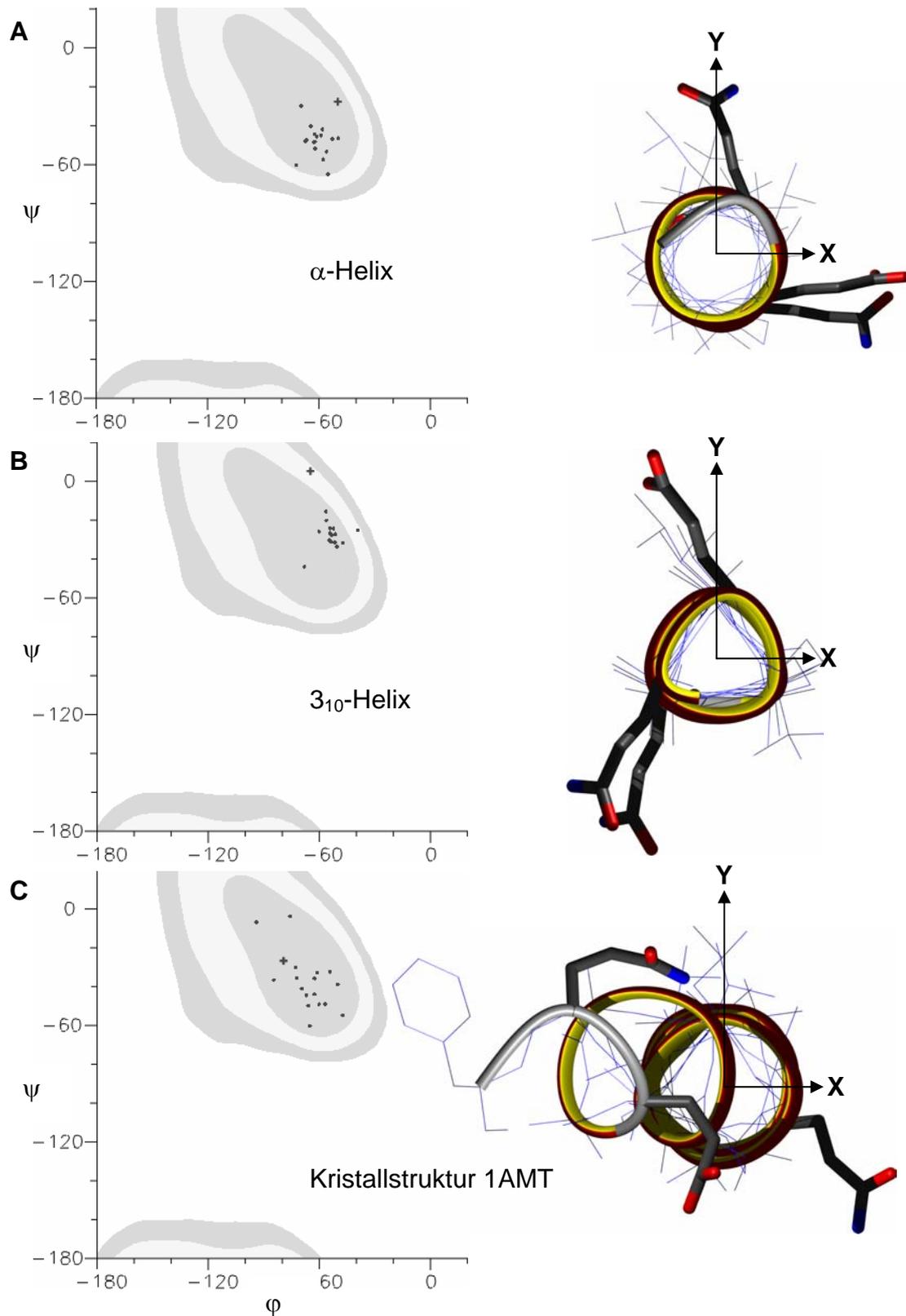


Abbildung 3.1: Ramachandran-Diagramme der jeweiligen geometrieoptimierten Helixmodelle der Alm-Derivate und Strukturmodell (A-C) in Standardorientierung (hydrophile Seitenketten dick gekennzeichnet). Die Z-Achse weist aus der Papierebene heraus, das Kreuz kennzeichnet die Aminosäure Leu12. Die Kristallstruktur (C) wurde nicht geometrieoptimiert. Der Hintergrund der Ramachandran-Diagramme stellt eine statistische Auswertung der gefundenen dihedralen Winkel von Proteinen (Kristallstrukturen) dar (Funktion implementiert in MOLMOL).

3.2.5.2 Orientierungsberechnung der Alamethicin-Modelle

Die Peptidorientierung wird durch systematisches Kippen und Rotieren über den gesamten Raum der generierten Modelle und der Bestimmung der Fehlerfunktion χ^2 aus den vorhergesagten und experimentellen Werten ermittelt. Dafür wurde im Rahmen einer Dissertation⁷⁹ ein Mathematica-Notebook (siehe Anhang 10.3) entwickelt, welches alle weiteren Rechenschritte durchführt. Als Eingabe zur Berechnung wird die ermittelte Dipolkopplung und die Koordinaten der Dipolkopplungsachse (entspricht der C-CF₃-Achse) benötigt. Zur graphischen Darstellung der erhaltenen Lösung können die resultierenden Winkel als Drehbefehle direkt in MOLMOL an einem standardorientiertem Alm-Analogon (Abbildung 3.2) eingegeben und visualisiert werden.

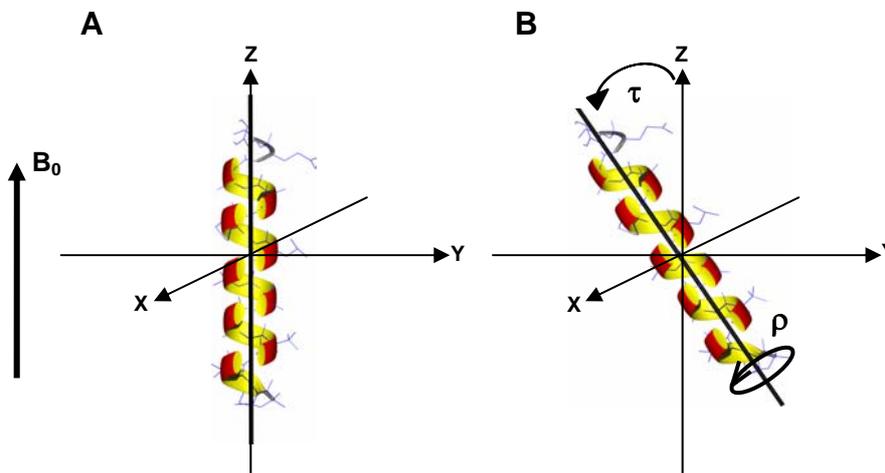


Abbildung 3.2: Darstellung eines standardorientierten fluorierten Alm (A) und gedrehtes und gekipptes Alm-Analogon (B) in orientierter Lage zum externen Magnetfeld B_0 (welches bei horizontaler Probenanordnung mit der Z-Achse identisch ist). Aus Symmetriegründen gilt für $\tau = 0-90^\circ$, ρ gilt für $0-180^\circ$.

3.2.6 CD-und OCD-Spektroskopie

3.2.6.1 Allgemeines

Mithilfe der Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie lassen sich auf sehr schnelle und einfache Weise globale Aussagen über die Sekundärstruktur eines Peptids oder Proteins treffen. Aus dem gemessenen CD-Spektrum eines Peptids können die enthaltenen fraktionalen Anteile an Sekundärstrukturelementen wie α -Helix, β -Faltblatt, β -Schleife oder unstrukturierte Anteile („random-coil“) quantitativ ermittelt werden. Dies geschieht über computergestützte Programme mit verschiedenen mathematischen Algorithmen, welche durch Vergleich des gemessenen Spektrums mit CD-Spektren von Referenzproteinen deren Sekundärstruktur z.B. durch Röntgenstrukturanalyse genau bekannt ist, den Gehalt an den einzelnen Strukturelementen im strukturell unbekanntem Peptid berechnen.

Die Methode beruht darauf, dass chirale Moleküle links-circular und rechts-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren, d.h. ihre Extinktionskoeffizienten sind unterschiedlich groß. Linear polarisiertes Licht kann man als Summe zweier, gegenläufig um die Ausbreitungsrichtung mit gleicher Frequenz rotierender, zirkular polarisierter E-Feldvektoren (ϵ_L und ϵ_R) betrachten. Nach Durchgang dieses polarisierten Lichtes durch eine optisch aktive Probe ändert sich aufgrund der unterschiedlichen Absorption in der Probe die Polarisation des austretenden Strahls zu elliptisch polarisiertem Licht. Ein CD-Spektropolarimeter liefert als Messgröße die Elliptizität Θ [mdeg], welche durch folgende Gleichung definiert ist:

$$\Theta = \arctan (b/a). \quad <11>$$

b = kleine Achse der Ellipse, a = große Achse der Ellipse

Für die quantitative Sekundärstrukturelementbestimmung von Proteinen wird als Einheit im CD-Spektrum meist die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\theta]$ [deg cm² decimol⁻¹] angegeben, bei der die Elliptizität auf die molare Konzentration und die Schichtdicke der Probe normiert ist. Eine weitere oft benutzte Einheit ist der molare zirkulare Dichroismus $\Delta\epsilon$, welcher direkt die Differenz $\epsilon_L - \epsilon_R$ der beiden molaren Extinktionskoeffizienten für links und recht zirkular polarisiertes Licht angibt. Diese sind wiederum selbst abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlteten Lichts.

Die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\theta]$ und der molare zirkulare Dichroismus $\Delta\varepsilon$ lassen sich an Hand der einfachen Gleichung

$$[\theta] = 3298 \cdot \Delta\varepsilon \quad <12>$$

ineinander umrechnen. Abbildung 3.3 zeigt für das jeweilige reine Sekundärstrukturelement charakteristische Spektren, welche durch mathematische Algorithmen aus Referenzspektren strukturell bekannter Proteine berechnet wurden. Die Unterschiede der in Abbildung 3.3 dargestellten CD-Spektren kommen vor allen Dingen durch die jeweils unterschiedliche räumliche Anordnung und spezifischen Kopplungen der partiellen π -Systeme der Peptidbindungen zustande. Dabei werden elektronische $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge beobachtet.

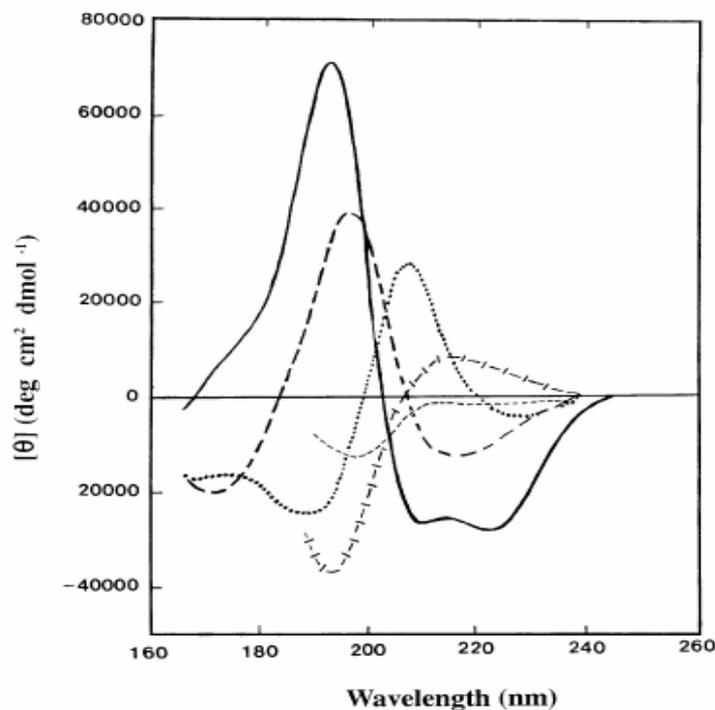


Abbildung 3.3: Charakteristische CD-Spektren für die jeweiligen reinen Sekundärstrukturelemente: α -Helix (durchgezogene Linie), β -Faltblatt (langgestrichelte Linie), β -Schleife (gepunktete Linie), Poly-Prolin-Helix (gekreuzte Linie), ungeordnete Struktur (kurzgestrichelte Linie).

Die Stärke der Absorption dieser Übergänge hängt bei gerichteten Proben, wie sie z.B. beim Einbau von Peptiden in orientierten Lipidmembranen auftreten, auch vom Winkel des eintreffenden elektrischen Feldvektors zur Richtung der Übergangsdipolmomente von Peptidbindungen im jeweiligen Sekundärstrukturelement ab. Dieses Phänomen wurde bereits 1956 für die α -Helix vorhergesagt und man macht sich diesen Effekt bei der Orientierten

Zirkulardichroismus-Spektroskopie (OCD, von oriented circular dichroism) zunutze. Es kann dadurch sehr leicht eine transmembran orientierte α -Helix (I-state, inserted state) von einer flach auf der Oberfläche liegenden α -Helix (S-state, surface state) in einer entsprechend orientierten Modellmembranprobe unterschieden werden. Die nachstehende Tabelle 3.3 fasst die relevanten Absorptionsbanden und die dazugehörigen elektronischen Übergänge zusammen, Abbildung 3.4 illustriert die OCD-Spektren einer orientierten Probe zur Membran.

Tabelle 3.3: *Typische Banden einer orientierten α -Helix, modifiziert übernommen³⁷.*

Art des elektronischen Übergangs	Art der Orientierung	Wellenlänge der Bande [nm]	Vorzeichen der Amplitude	Linienbreite [nm]
$n \rightarrow \pi^*$	S-State	222,3	negativ	12,9
$n \rightarrow \pi^*$	I-State	224,9	negativ	11,9
$\pi \rightarrow \pi^*$	S-State	204,8	negativ	7,4
		190,4	positiv	6,4
$\pi \rightarrow \pi^*$	I-State	188,5	negativ	10,1

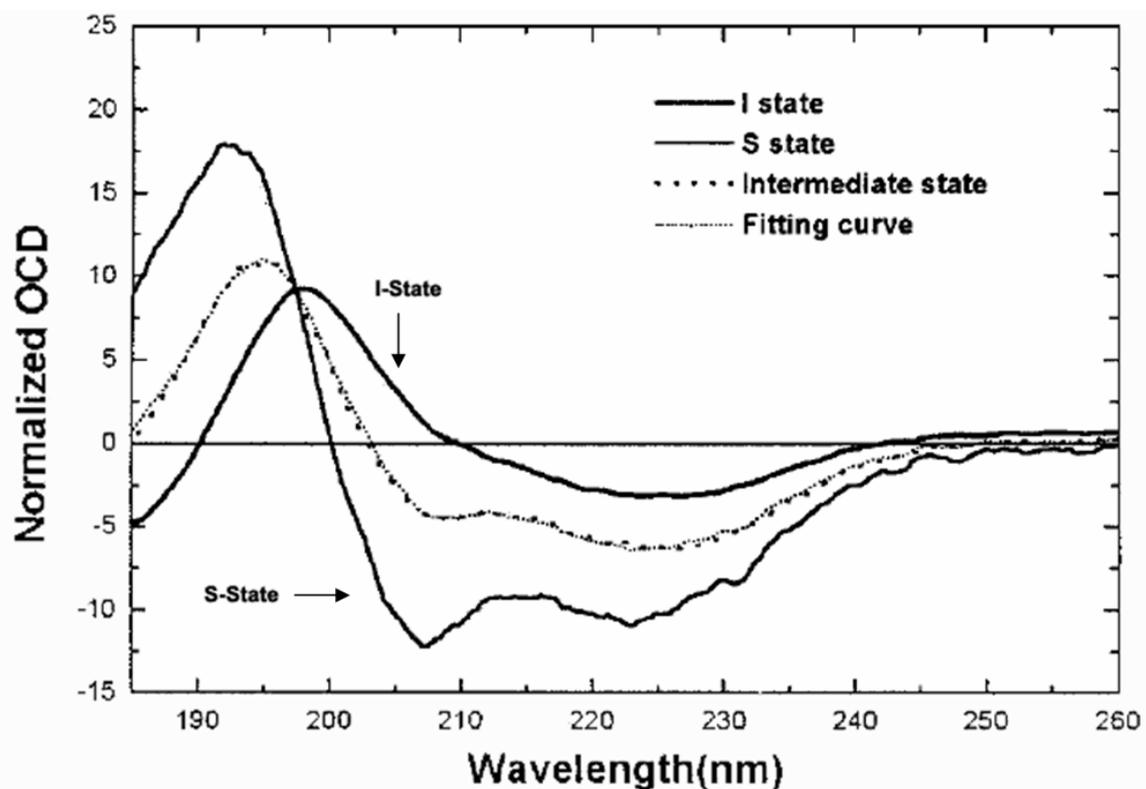


Abbildung 3.4: *OCD-Spektren der unterschiedlich orientierten Helices zur Membran, übernommen von³⁷.*

Man erhält eine über die Zeit gemittelte Summe aller Sekundärstrukturen und deren Orientierung in einer Lipid-Doppelschicht. Bei Vorliegen von weitgehend helikalen

Peptiden lässt sich mit Hilfe bekannter charakteristischer OCD-Spektren für I- und S-state-Orientierung die Ausrichtung einer vermessenen Peptidprobe in der Doppelschicht semi-quantitativ bestimmen. Verglichen mit der hochauflösenden NMR-Spektroskopie geben die gerade beschriebenen CD-Methoden allerdings wenig detaillierte Auskünfte über die lokalen Sekundärstrukturverhältnisse eines Peptides oder Proteins, bei der OCD-Spektroskopie existiert zudem bislang nur für α -helikale Peptide eine theoretische Basis. Dennoch ist die OCD-Methode eine wertvolle komplementäre Methode zur NMR, die globale Information zur Sekundärstruktur und räumlichen Anordnung von Peptiden in orientierten Membranen liefert, keine Isotopen-Markierung benötigt und eine deutlich höhere Sensitivität als die NMR aufweist (Faktor 100-400 geringere Peptidmengen sind für eine Messung erforderlich).

In der Praxis wird die CD-Messung wie folgt realisiert. Gewöhnlich strahlt man Licht einer Xenonlampe mit Wellenlängen im fernen UV-Bereich von 180nm bis 260nm ein. Das Licht wird zuerst über zwei dispersive Elemente (Prismen) monochromatisch gefiltert und gleichzeitig linear polarisiert. Nach Durchlaufen von weiteren Polarisationsfiltern erhält man monochromatisches, linear polarisiertes Licht. Das links- und rechts-zirkular polarisierte Licht wird dann beim Durchlaufen eines CD-Modulators (Quarkristall dient als $\lambda/4$ -Verzögerungsplatte und piezoelastisches Element) durch Anlegen eines 50 kHz-Wechselfeldes alternierend generiert. Ein Photomultiplier hinter der chrialen Probe misst die Absorption des links- und rechts-zirkular polarisierten Lichts. Die hieraus berechnete Elliptizität Θ gegen die Wellenlänge aufgetragen ergibt das CD-Spektrum der Probe.

3.2.6.2 Probenvorbereitung

- a) CD-Proben: Von jedem zu vermessenen Peptid wurde eine genügend grosse Menge eingewogen, um 0,5 ml einer 25-40 μ M Lösung in TFE/10 mM wässrigem Phosphatpuffer (1/1, v/v) zu erhalten. 270 μ l einer dieser Lösung wurde in eine Quarküvette mit einer Weglänge von 1mm gegeben und 3 CD-Spektren bei 20°C gemessen, welche dann gemittelt wurden. Entsprechend wurde mit einer Probe ohne Peptid verfahren, um den Hintergrund des Lösemittels zu subtrahieren. Ausgehend von diesen CD-Spektren konnte

dann die Sekundärstrukturanteile mithilfe zweier Auswertalgorithmen (CONTIN und CDSSTR) ermittelt werden.

- b) OCD-Proben: Eine Mischung des Peptid/Lipid (5-10 µg Peptid auf 0,2 mg DMPC), kosolubilisiert in einer Lösung von Methanol und Chloroform 1/1 (v/v), wurden auf einem Quartzglasfenster aufgebracht. Die Probe wurde zuerst an Luft, danach im Vakuum für 4h getrocknet. Die trockene Probe konnte dann in die Messzelle eingebaut werden, wo diese über einer gesättigten K₂SO₄-Lösung bei 98% relativer Luftfeuchtigkeit über Nacht hydratisiert wurde. Die Probe wurde unter acht verschiedenen Winkel gemessen, um eventuell vorhandene Artefakte durch eine zu inhomogene Verteilung des DMPC zu reduzieren. Auch diese Messungen wurden dreimal wiederholt.

3.2.7 Antimikrobielle Untersuchungen

3.2.7.1 Prinzip

Das Prinzip der Methode beruht auf einer schnellen Herstellung einer breiten Konzentrationsreihe für ein bestimmtes Antibiotikum und der Überprüfung dieser Reihe auf das mikrobielle Wachstum. Die Verwendung der 96-Well-Platten erlaubt beim Arbeiten in einer Dimension eine Mehrfachbestimmung der Analyse. Dabei wird eine Konzentrationsreihe des Antibiotikums hergestellt. Anschließend wird die Platte mit einer Bakterienkultur versetzt und über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation deuten die Kulturen mit einer Trübung auf das bakterielle Wachstum hin. Eine hinreichend große Konzentration des Antibiotikas führt zur Hemmung des Wachstums, die Trübung bleibt aus. Daher kann die Platte visuell ausgewertet werden.

3.2.7.2 Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration

Die folgenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Um eine Vorkultur zu erhalten, wurden 10 ml LB-Medium in ein sterilisiertes Kulturkölbchen gegeben und mit einer Cryo-Kultur versetzt. Diese wurde über Nacht bei 37 C° inkubiert. Aus dieser wurde wie folgt eine Stammkultur hergestellt: 50 µL der Vorkultursuspension wurden entnommen und in der Küvette mit 450 µL LB-Medium verdünnt. Mit Hilfe des Spektralphotometers wurde der OD₅₅₀ – Wert der Verdünnung ermittelt. Die Verdünnung für die Stammsuspension wurde dabei so

gewählt, dass der OD₅₅₀ – Wert 0,200 für Gram-positive (*Kocuria*, *Micrococcus*, *Bacillus*) und 0,125 für Gram-negative Bakterienstämme (*Acinetobacter*, *E.coli* K12, *E.coli* DH5α) betrug. Dazu wurde die Vorkultursuspension nach folgender Formel verdünnt:

$$V \text{ (VK)} = \frac{\text{OD}_{550} \text{ (St)}}{\text{OD}_{550} \text{ (VK Verdünnung)}} \times \frac{V \text{ (St)}}{VF \text{ (VK Verdünnung)}} \quad <13>$$

$$V \text{ (LB)} = V \text{ (St)} - V \text{ (VK)}$$

V (VK) = Volumen der Vorkultursuspension

OD₅₅₀ (St) = der gesuchte OD₅₅₀-Wert der Stammsuspension

OD₅₅₀ (VK Verdünnung) = OD₅₅₀-Wert nach der Verdünnung der Vorkultur

V (St) = Gesamtvolumen der Stammsuspension

VF = Verdünnungsfaktor der Vorkultursuspension

V (LB) = Volumen des LB-Mediums

Die entsprechenden Mengen an LB-Medium und der Vorkultursuspension wurden in ein Reaktionsgefäß vorgelegt.: Danach wurde die Stammkultursuspension mit salzfreien LB-Medium hundertfach (1:99) zur Inkubationssuspension verdünnt. Es wurde dabei berücksichtigt, dass pro 96-Well-Platte 5 ml der Inkubationssuspension gebraucht werden. Das salzfreie LB-Medium wurde folgendermaßen hergestellt:

5,0 g Trypton und 2,5 g Hefeextrakt wurden abgewogen, in die 500 ml Kulturflasche überführt und mit 500 ml bidestilliertes Wasser versetzt. Der pH-Wert von 7,4 wurde mittels 2M NaOH bei 25°C eingestellt und anschließend im Autoklaven sterilisiert. Die Stammlösungen für einen Mikrotiter-Test betragen das Vierfache der Endkonzentration (in der 96-Lochplatte). Als Lösungsmittel für das Peptid wurde dabei EtOH/H₂O (1:1, v/v) verwendet. Die 96-Well-Platte wurde mit 20 µl LB-Medium pro Probenbehälter befüllt. Eine Reihe diente als Negativkontrolle (keine Bakterienkultur), eine weitere als Positivkontrolle (kein Peptid), um Verunreinigungen mit weiteren Bakterien oder ein Absterben aller Bakterienkulturen durch Fehlbehandlung auszuschließen. In den verbleibenden Reihen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend wurde über Nacht bei 37 °C im

Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine visuelle Auswertung der Platten. Eine entstandene Trübung in den einzelnen Probenbehältern zeugte von bakteriellem Wachstum. Die letzte Gruppe mit mehr als 50% der klaren Löcher stellte die Gruppe mit der minimalen Hemmkonzentration (MHK) des Antibiotikums dar.

3.2.7.3 Bakterielle Testkulturen

<i>Acinetobacter</i> sp.. DSM 586	DSMZ (Braunschweig)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> DSM 347	DSMZ (Braunschweig)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	DSMZ (Braunschweig)
<i>Escherichia coli</i> DSM 498 (K12 „wildtype“)	DSMZ (Braunschweig)
<i>Kocuria rhizophila</i> DSM 348	DSMZ (Braunschweig)

3.2.7.4 Allgemeine Lösungen und Puffer

LB-Medium (für die Vorkultur):

- 10 g Bacto-Trypton
- g Hefeextrakt
- 10 g NaCl
- auf 1000 ml bidest. H₂O auffüllen, mit 2 M NaOH pH=7,4 bei 25°C einstellen und sterilisieren

LB-Medium – salzfrei (für den Mikrotiter-Test):

- 10 g Bacto-Trypton
- g Hefeextrakt
- auf 1000 ml bidest. H₂O auffüllen, mit 2 M NaOH pH=7,4 bei 25°C einstellen und sterilisieren

Puffer E (für die Hämolyse):

- 0,2 g Tris (8 mM)
- 2,2 g NaCl (150 mM)
- auf 250 ml mit bidest. H₂O auffüllen und mit 6 M HCl pH=7,6 bei 4°C einstellen

Puffer W (für die Hämolyse):

- 0,2 g Tris (8 mM)
- 2,2 g NaCl (150 mM)
- auf 250 ml mit bidest. H₂O auffüllen und mit 6 M HCl pH=7,6 bei 37°C einstellen

Puffer D (für die Hämolyse):

- 90 ml Puffer W + 10 ml DMSO
- (Tris 7,2 mM; NaCl 135 mM; DMSO 10%Vol.)

3.2.8 Hämolyse-Test

3.2.8.1 Prinzip

Zur Untersuchung der toxikologischen Aspekte des Peptids wurde im Rahmen dieser Arbeit Hämolyse-Tests durchgeführt. Verursacht das Peptid die Ruptur der Zellen, wird Hämoglobin freigesetzt, dessen Menge photometrisch erfasst werden kann. 0,2 %Vol. Triton X-100 ergeben eine vollständige Lyse der Zellen, die erhaltenen Absorbtionswerte geben dabei 100% Hämolyse an.

3.2.8.2 Durchführung

Die Durchführung erfolgte analog der ausführlich beschriebenen Methode⁸⁰ von Serge Ruden.

Alle antimikrobiellen Untersuchungen sowie Hämolyse-Test wurden von Dipl.-Biol. Serge Ruden am Forschungszentrum Karlsruhe durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Wahl der markierten Positionen und Synthesestrategie

Da als Ziel die strukturelle Untersuchung von Alm mittels ^{19}F -Festkörper-NMR steht, müssen die fluorierten Aminosäuren in der Art und Weise inkorporiert werden, dass die signalgebenden Fluoratome das Peptidrückgrat repräsentieren. Dies beinhaltet die Berücksichtigung der starren Sekundärstrukturelemente und ihrer intramolekularen Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken^{16, 27}, sowie der vermutete Mechanismus der Insertion von Alamethicin in Membranen und die Ausbildung eines Kanals⁴⁷.

In nebenstehender Abbildung 4.1 ist eines von drei von *Fox* und *Richards*¹⁶ kristallographisch bestimmten Alamethicinmoleküle das H-Brücken-Muster gezeigt (3 Moleküle pro Einheitszelle, Unterschiede rühren höchstwahrscheinlich von intermolekularen Einflüssen innerhalb des Kristalls her).

Rest 0 repräsentiert den acetylierten N-Terminus, die beiden eingekreisten N symbolisieren die Prolin-Reste. H-Brücken der α -Helix ($i+4$) überschneiden diagonal die Vertikale, während H-Brücken des Typs $i+3$, also einer 3_{10} -Helix, die Vertikale horizontal schneiden. Das Prolin an Position 2 flankiert die α -Helix, Prolin14 induziert einen Knick. Mögliche, natürliche Aib für eine Substitution mit TfmAla befinden sich in Position 1, 3, 5, 8, 10, 13, 16 und 17 (farbig markierte Positionen).

Geht man nun die einzelnen Positionen der Aib der Reihe nach durch, gelangt man zu folgenden Aussagen:

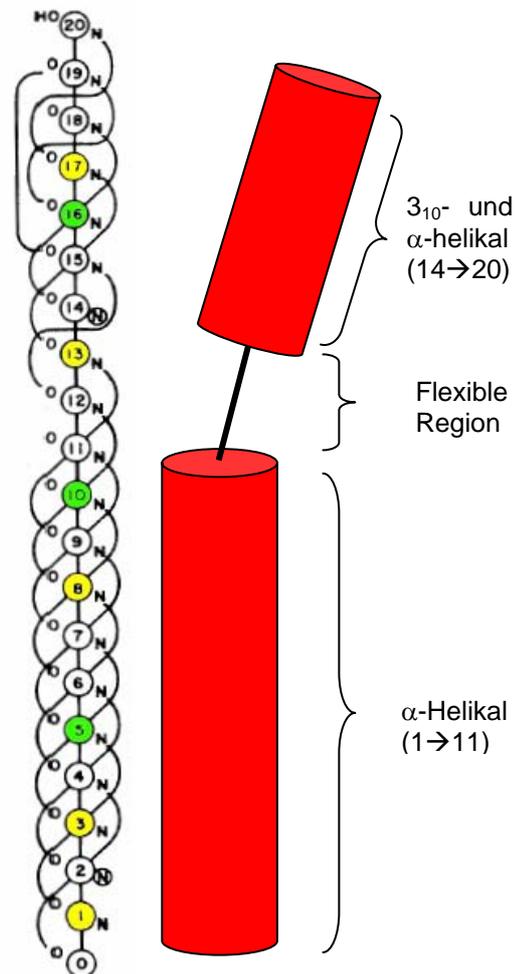


Abbildung 4.1:

Wasserstoffbrückenbindungsmuster übernommen von *Fox* und *Richards*¹⁶. Die natürlichen Positionen von Aib sind farbig markiert, in grün sind die in dieser Arbeit gewählten Positionen hervorgehoben. Daneben ist eine schematische Darstellung der als starr anzusehenden Sekundärstrukturelemente abgebildet.

- Position 1 und 3 sind, da sie am Ende der α -Helix sitzen, für eine Markierung nicht geeignet. Hier herrscht keine vollständige Stabilisierung der Sekundärstruktur über Wasserstoffbrücken.
- Position 5 und 8 sind stabilisiert, da sowohl ihre Stickstoffatome der Amidgruppe als auch die O-Atome der Carbonylgruppe an H-Brücken teilhaben (i+4) \rightarrow geeignet für Markierung.
- Position 10 ist teilweise stabilisiert, es kann keine H-Brückenbindung zu dem an Position 14 stehenden Prolin ausbilden. Der Grund dafür liegt in dem von Prolin induzierten Knick \rightarrow teilweise geeignet für Markierung.
- Position 13 liegt zu nahe an diesem Knick, eine Markierung an dieser Stelle würde das Peptidrückgrat nicht repräsentieren.
- Position 16 und 17 sind weniger geeignet, da die Umgebung nicht eindeutig α -helikal oder 3_{10} -helikal ist. Gerade deswegen lohnt sich allerdings eine Markierung.

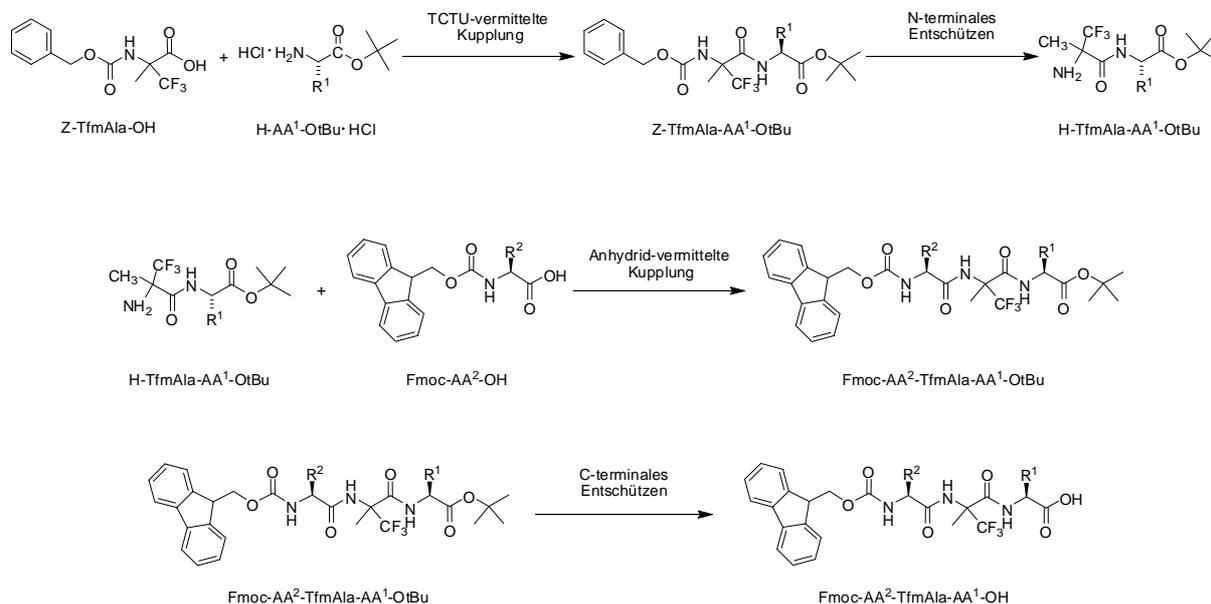
Da zur vollständigen Charakterisierung der Sekundärstrukturelemente mittels Festkörper-NMR mindestens 4 unabhängige NMR-Parameter (z.B. 4 markierte Positionen) notwendig sind, stehen für den α -helikalen Bereich des Alm die Positionen 5, 8 und 10, für den 3_{10} -helikalen Bereich die Positionen 16 und 17 zur Verfügung. Wie in Schema 3 beschriebener Synthesestrategie zu entnehmen ist, fällt das TfmAla in der (*R*)- und (*S*)-Konfiguration an, womit sich die zu markierenden Positionen auf mindestens 2 reduzieren (2x2 Enantiomere). Um eine repräsentative Verteilung der NMR-Sonden innerhalb des Moleküls zu gewährleisten, wurden die Positionen 5,10 und 16 für eine Mutierung von Aib zu TfmAla gewählt. Um die resultierenden Spektren einfach zu gestalten und eine Störung des Peptidrückgrates zu vermeiden, wird jeweils nur eine fluormarkierte Aminosäure in das Alm eingebaut. Weiterhin spielt die Zugänglichkeit von enantiomerenreinem TfmAla und die schwierige Inkorporation in eine Peptidsequenz eine wichtige Rolle. Der Einsatz des TfmAla^{60, 63, 77, 81, 82} in der Peptidsynthese gestaltet sich im Vergleich zu dem bekanntermaßen schwierig zu kuppelnden Aib^{62, 83-86} noch dramatischer. Der Einfluss der elektronenziehenden CF₃-Gruppe wirkt in hohem Maße deaktivierend auf die Aminofunktion der Aminosäure. Damit ist der nucleophile Angriff des TfmAla auf eine aktivierte Carboxylgruppe erheblich erschwert. Die Schwierigkeit der Kupplung von TfmAla (sowohl an C- als auch N-Terminus) erhöht sich zusätzlich durch den vergrößerten sterischen Anspruch der CF₃-Gruppe. Betrachtet man die räumliche

Ausdehnung der Trifluormethylgruppe nach *Smart et al.* als ähnlich einer Isopropylgruppe⁶⁷, wird die sterische Hinderung deutlich. Vergleicht man beide Einflüsse miteinander, überwiegt der N-Terminus deaktivierende Effekt.

Da von einem racemischen Gemisch von Z-TfmAla-OH ausgegangen werden musste, wird dieses zunächst in orthogonalgeschützte Tripeptide eingebaut und die sich ergebenden Epimere getrennt. Dieser Syntheseweg wurde von *Kochsch et al.*⁶⁵ in verwandter Form etabliert und standardisiert (s. Kapitel 8.2).

Die Eckpunkte der Tripeptidsynthese sind:

Das TfmAla wird am C- und N-Terminus jeweils mit der entsprechenden benachbarten Aminosäure in Lösung gekuppelt. Die Kondensation am C-Terminus erfolgt über *in situ* Aktivierung mit TCTU, die Kondensation am N-Terminus des TfmAla wird über die Methode des gemischten Anhydrids durchgeführt. Als orthogonale Schutzgruppen werden Z, Fmoc und *t*Bu^{69, 71, 87, 88} verwendet. Der Syntheseweg ist in Schema 2 dargestellt:



Schema 2: Synthesestrategie zum Aufbau des Tripeptid.

Der Vorteil dieser Methodik liegt darin, dass hierbei auf schon teilweise bekannte Protokolle zurückgegriffen werden konnte^{62, 63, 89}. Weiterhin konnte dadurch ein sequenzieller Aufbau in der Festphasenpeptidsynthese vermieden werden, der auf der Stufe des H-TfmAla-Peptids ein größeres Problem (aufgrund stark herabgesetzter Nucleophilie) dargestellt hätte.

Der jeweilige Aufbau zu dem fluormarkierten Alm erfolgt über die sequenzielle Kondensation an fester Phase (siehe Kapitel 3.2.1). Um mit der Schutzgruppenstrategie der fluormarkierten Tripeptide kompatibel zu sein, wurde auch hier Fmoc/*t*Bu (oder Trt) als temporäre bzw. semi-permanente Schutzgruppen verwendet. Als Harz für die SPPS wurde das extrem säurelabile Barlos-Harz^{90, 91} verwendet, um zu verhindern, dass durch die Bedingungen, welche während der Abspaltungs-Prozedur herrschen, die ebenfalls säurelabile Aib-Pro-Bindung^{84, 85, 92, 93} gespalten wird.

Basierend auf den oben genannten Argumenten sind folgende fluormarkierte Alm-Analoga zu synthetisieren (die jeweiligen Tripeptide sind farbig hervorgehoben):

natives Alm als Vergleich:



¹⁹F-markierte Alm-Analoga:

- 5-(*R*&*S*)-TfmAla-Alm:
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-(*R*)-TfmAla-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-(*S*)-TfmAla-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol
- 10-(*R*&*S*)-TfmAla-Alm:
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-(*R*)-TfmAla-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-(*S*)-TfmAla-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol
- 16-(*R*&*S*)-TfmAla-Alm:
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-(*R*)-TfmAla-Aib-Glu-Gln-Pheol
Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-(*S*)-TfmAla-Aib-Glu-Gln-Pheol

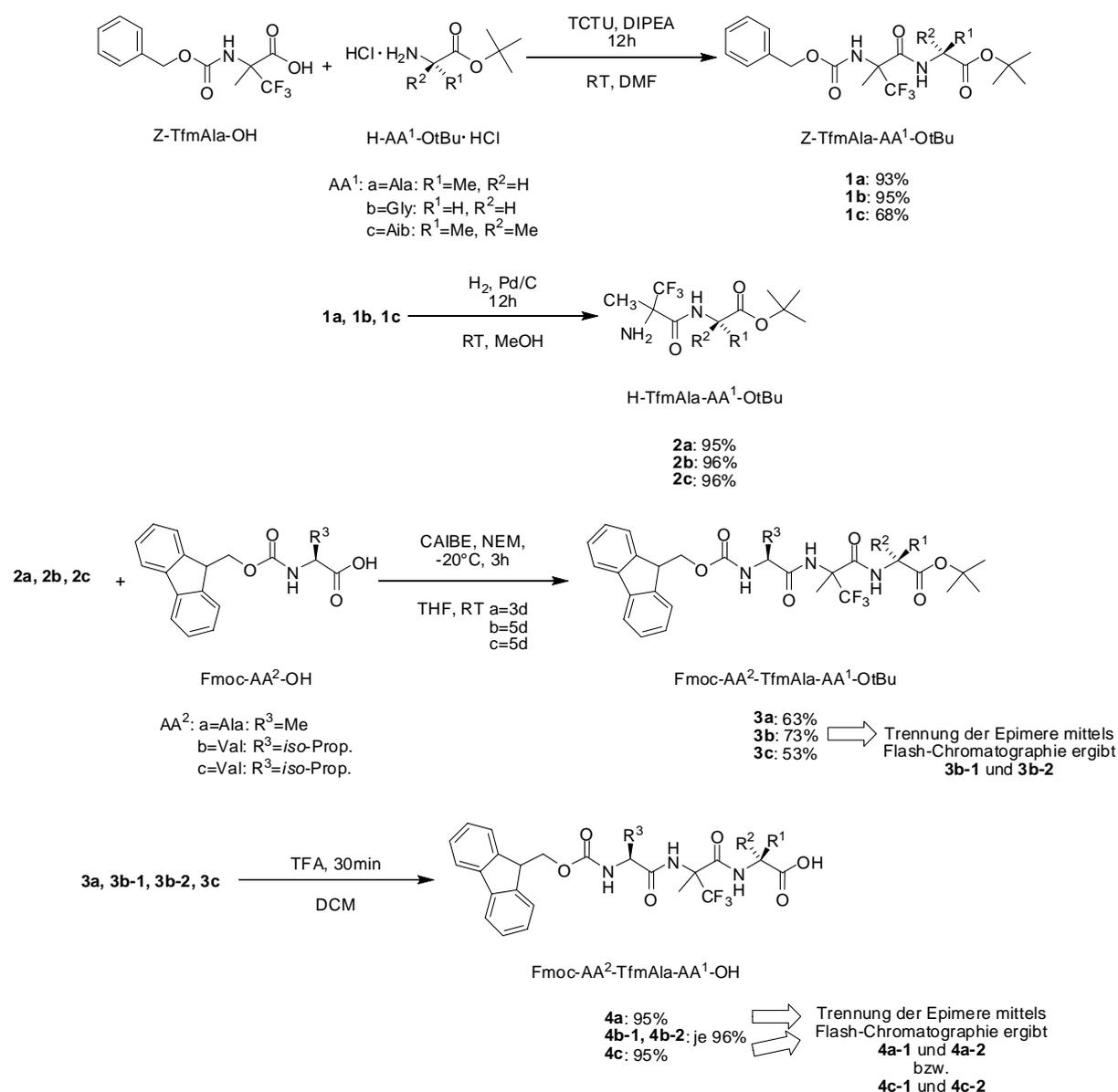
Auch ist darauf geachtet worden, die Fragmente in der Art zu wählen, dass ein Kompromiss zwischen erfolgreicher Synthese und möglicher Epimerisierung während der Fragmentkondensation^{94, 95} der Tripeptide entsteht. So kann nur während der Kupplung von Tripeptid Fmoc-Ala-(*R/S*)-TfmAla-Ala-OH mit dem Fragment Alm-7-20 ein Verlust der chiralen Information des Alanin erfolgen, da nur in diesem Fall die aktivierte Spezies ein C^α-Proton besitzt, welches eine Epimerisierung über den Oxazolone-Mechanismus⁹⁶ fördern würde. In allen anderen Fällen sind achirale Aminosäuren involviert.

So ergeben sich insgesamt 6 ^{19}F -Markierungen für das Alm und damit ausreichend NMR-Parameter, um eine Bestimmung der Struktur des Alm via Festkörper-NMR durchzuführen.

4.2 Synthese der TfmAla-enthaltenden Tripeptide und Bestimmung der Stereochemie

4.2.1 Synthese

Die sich schwierig gestaltende Synthesen der fluormarkierten Tripeptide wurden, wie in Schema 3 gezeigt, mit sehr guten Ausbeuten dargestellt.



Schema 3: Übersicht zur Synthese der TfmAla-enthaltenden Tripeptide.

Die entstehenden Epimere konnten im Falle des Tripeptides **3b** auf der Stufe des C-terminal geschützten Tripeptids über Flash-Chromatographie getrennt werden. Die beiden anderen Tripeptidepimere **4a** und **4b** konnten auf der Stufe des C-terminal entschützten Tripeptids mittels Säulenchromatographie aufgetrennt werden.

Die erhaltenen Verbindungen **4a/b/c-1/2** wurden mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{19}\text{F-NMR}$, RP-HPLC und MALDI-TOF Massenspektrometrie charakterisiert und zur weiteren Synthese verwendet.

4.2.2 Identifikation der resultierenden Epimere

Für eine Auswertung der zu messenden ^{19}F -Festkörper NMR-Spektren ist es notwendig, die Stereokonfiguration der Fluor-Sonde TfmAla zu ermitteln. Hierzu wurden die aufgetrennten Tripeptidepimere hydrolytisch (Kapitel 3.2.2.2) in ihre Aminosäurebausteine gespalten und auf eine RP-HPLC, mit einer chiralen mobilen Phase, aufgegeben⁷⁴. Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit Chromatogrammen von Referenzsubstanzen, welche den gleichen Bedingungen unterworfen wurden, bei einer Wellenlänge von 280nm verglichen und die Konfiguration der in die Tripeptide **4a/b/c-1/2** eingebaute Aminosäure TfmAla zugeordnet. Als Referenz für das TfmAla wurde von der Arbeitsgruppe Koks⁷⁴ freundlicherweise H-(*R*)-TfmAla-OH und H-(*S*)-TfmAla-NH₂ zu analytischen Zwecken zur Verfügung gestellt. Die Hydrolyse gewährleistet, dass jede Aminosäure in ihrer C- und N-terminal entschützten Form vorliegt. In den nachstehenden Tabellen sind die Retentionszeiten der Tripeptid- und ihre jeweiligen Referenzhydrolysate zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Retentionszeiten der hydrolysierten Verbindungen **4a-1**, **4a-2** und zugehörige Referenzen.

Probe	Retentionszeit (min)	
4a-1	3,5	6,5
4a-2	3,5	7,9
H-Ala-OH	3,5	
Fmoc-Ala-OH	3,5	
H-(<i>R</i>)-TfmAla-OH		7,9
H-(<i>S</i>)-TfmAla-NH ₂		6,5

Tabelle 4.2: Retentionszeiten der hydrolysierten Verbindungen **4b-1**, **4b-2** und zugehörige Referenzen.

Probe	Retentionszeit (min)		
4b-1	3,1	6,5	8,9
4b-2	3,1	7,9	8,9
H-Gly-OH	3,1		
Fmoc-Val-OH			8,9
H-(<i>R</i>)-TfmAla-OH		7,9	
H-(<i>S</i>)-TfmAla-NH ₂		6,5	

Tabelle 4.3: Retentionszeiten der hydrolysierten Verbindungen **4c-1**, **4c-2** und zugehörige Referenzen.

Probe	Retentionszeit (min)		
4c-1	3,7	6,5	8,9
4c-2	3,7	7,9	8,9
H-Aib-OH	3,7		
Fmoc-Val-OH			8,9
H-(<i>R</i>)-TfmAla-OH		7,9	
H-(<i>S</i>)-TfmAla-NH ₂		6,5	

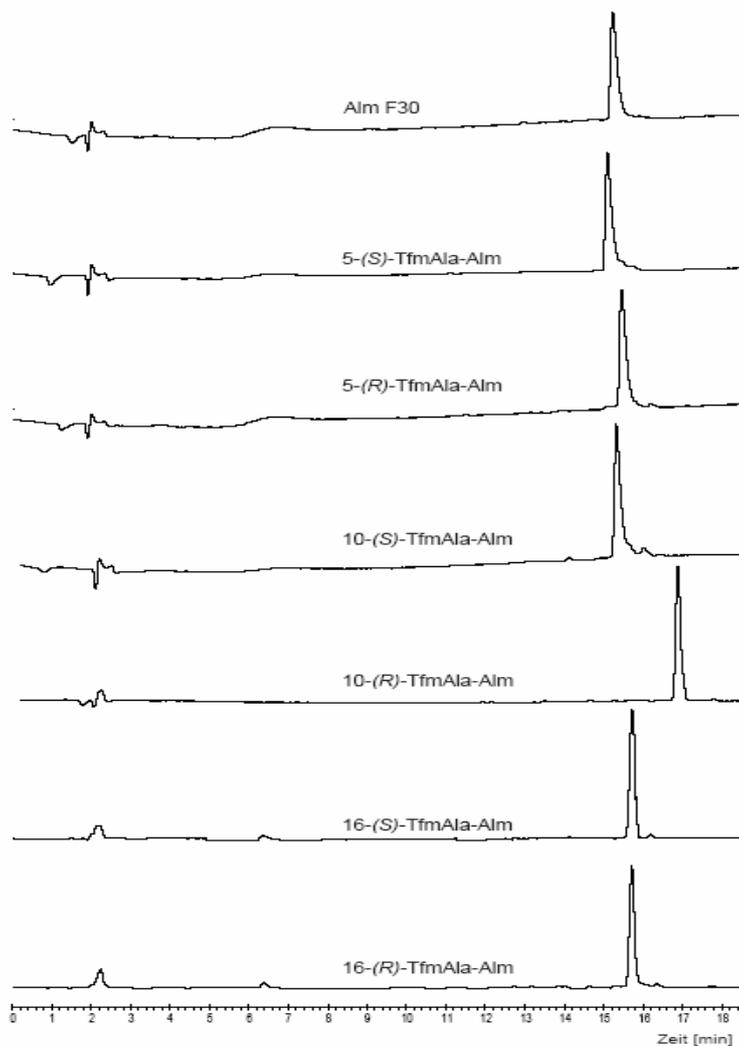
Damit konnte nachgewiesen werden, dass jedes Tripeptidpimer-1 die Aminosäure TfmAla in *S*-Konfiguration und jedes Tripeptidpimer-2 TfmAla in *R*-Konfiguration enthält.

4.3 Synthese der ¹⁹F-markierten Alamethicin-Analoga

Der Aufbau der vollständigen Peptide konnte erfolgreich über manuelle Festphasenpeptidsynthese an Barlos-Harz^{90, 91} als unlöslichem polymeren Träger realisiert werden. Die fluorierten Tripeptide wurden analog Schema 1 in die entsprechenden Sequenz eingeführt (Kapitel 3.2.1). Als Aktivierungsreagenz der Carbonsäure wurde sowohl in der sequenziellen Synthese als auch in der Fragmentkondensation HATU verwendet. Nach Abspaltung der Peptide vom Harz wurden diese über semipräparative RP-HPLC aufgereinigt und mittels MALDI-TOF-MS und ¹⁹F-NMR charakterisiert. In Tabelle 4.4 sind die synthetisierten Peptide und die Ausbeuten der aufgereinigten Peptide aufgelistet, Abbildung 4.2 zeigt die entsprechenden analytischen HPLC-Chromatogramme.

Tabelle 4.4: Ausbeuten der synthetisierten Alm-Analoga.

Peptid	Sequenz	Ansatzgröße [μmol]	Ausbeute [%]
Alm F30	AcUPUAUAQUVUGLUPVUUEQFol	100	25
5-(R)-TfmAla-Alm	AcUPUA-(R)-TfmAla-AQUVUGLUPVUUEQFol	100	26
5-(S)-TfmAla-Alm	AcUPUA-(R)-TfmAla-AQUVUGLUPVUUEQFol	100	23
10-(R)-TfmAla-Alm	AcUPUAUAQUV-(R)-TfmAla-GLUPVUUEQFol	100	26
10-(S)-TfmAla-Alm	AcUPUAUAQUV-(R)-TfmAla-GLUPVUUEQFol	100	25
16-(R)-TfmAla-Alm	AcUPUAUAQUVUGLUPV-(R)-TfmAla-UEQFol	100	24
16-(S)-TfmAla-Alm	AcUPUAUAQUVUGLUPV-(S)-TfmAla-UEQFol	100	27

**Abbildung 4.2:** RP-HPLC-Chromatogramme der aufgereinigten fluormarkierten Alm-Analoga bei einer Wellenlänge von 220nm.

4.4 Funktionelle Untersuchung der fluorierten Alamethicin-Analoga

Um zu überprüfen, ob die eingeführte Trifluormethylgruppe die Funktionalität des Peptides beeinträchtigt, wurden alle hergestellten Peptide verglichen mit dem Alm F30 als Referenz auf ihre antimikrobielle Wirkung gegen verschiedene Bakterienstämme und hämolytische Aktivität gegen menschliche Erythrozyten getestet.

Die fluormarkierten Alm wurden gegen gram-negative (*Escherichia coli* K12 DSM 498, *Escherichia coli* DH5 alpha und *Acinetobacter sp.* DSM 586) und gram-positive Bakterienstämme (*Kocuria rhizophila* DSM 348, *Bacillus subtilis* DSM 347) auf ihre minimale Hemmkonzentration untersucht und mit den nativen Alm (kommerziell erhältliches Alm SIGMA mit F50/5 als Hauptbestandteil und synthetisiertes Alm F30) verglichen (siehe Kapitel 3.2.7). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 dargestellt. Wie erwartet⁹⁷, hemmen alle Alm nur das Wachstum gram-positiver Bakterien, wobei ein deutlicher Unterschied in der Hemmung des Wachstums zwischen dem neutralen Alm SIGMA und den negativ-geladenen Alm F30 bzw. fluorierten Alm-Analoga zu erkennen ist. Abweichungen der ermittelten MIC-Werte der fluorierten Alm von Werten des Alm F30 liegen innerhalb eines Verdünnungsschrittes.

Alle synthetisierten Peptide zeigen eine vergleichbare Aktivität mit Alm F30 in ihrer Hemmung des Wachstums der verwendeten Bakterienstämme.

Tabelle 4.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der fluorierten Alm-Analoga und zwei natürlichen Alm als Referenz gegen verschiedene gram-positive und gram-negative Bakterienstämme. Die MHK-Werte sind in $\mu\text{g/ml}$ angegeben (in eine Konzentration umgerechnet entsprechen $1024 \mu\text{g/ml} = 5 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$).

	Alm SIGMA	Alm F30	5-(R)-TfmAla-Alm	5-(S)-TfmAla-Alm	10-(R)-TfmAla-Alm	10-(S)-TfmAla-Alm	16-(R)-TfmAla-Alm	16-(S)-TfmAla-Alm
<i>Escherichia coli</i> K12	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	1024	512	1024	1024	1024	1024	1024	1024
<i>Acinetobacter sp.</i>	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
<i>Kocuria rhizophila</i>	16	256	256	128	512	512	128	128
<i>Bacillus subtilis</i>	8	128	256	128	256	128	128	128

In Abbildung 4.3 sind die Ergebnisse der Bestimmung der hämolytischen Aktivität zusammengefasst. Auch hier ist ein gravierender Unterschied zwischen dem neutral-

geladenen Alm SIGMA und den negativ-geladenem Alm F30 bzw. Alm-Analoga zu erkennen. Die Aktivität der S-konfigurierten TfmAla-Alm-Peptiden gegenüber ihren Epimeren ist gesteigert, des weiteren erkennt man eine höhere hämolytische Aktivität fast aller fluorierten Alm-Analoga gegenüber dem Alm F30.

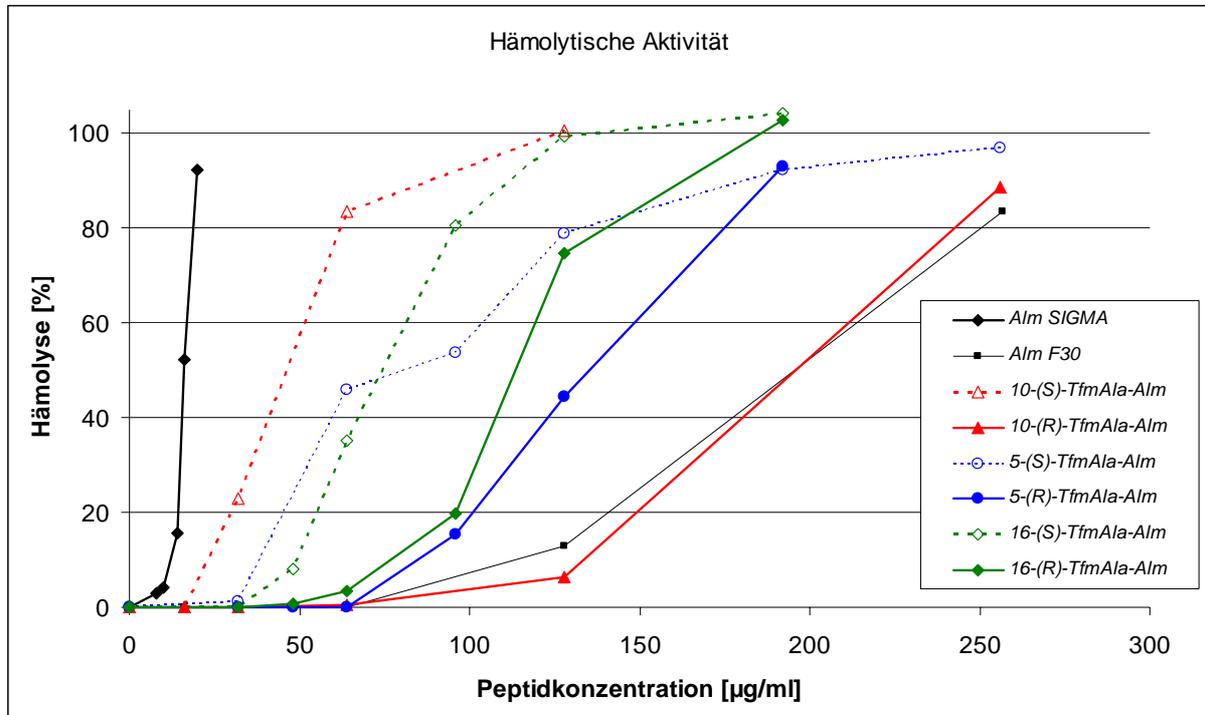


Abbildung 4.3: Hämolytische Aktivität der Alm-Analoga gegen menschliche Erythrozyten.

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der anerkannten Tendenz, je höher die Hydrophobizität eines membranaktiven Peptides ist, desto aktiver wirkt dieses gegen menschliche Erythrozyten⁹⁷. Mit der Einführung einer Trifluormethylgruppe ist eine solche Erhöhung der Hydrophobizität gegeben^{61, 63}.

4.5 Strukturelle Charakterisierung der fluorinierten Alamethicin-Analoga mittels CD-Spektroskopie

Um nachzuweisen, dass eine Einführung des TfmAla anstelle von Aib keine Störungen der Sekundärstruktur des Alm verursacht, wurden CD-Spektren der fluorinierten sowie der nativen Alm in einer membranimitierenden Lösung⁹⁸, bestehend aus TFE und 10mM Phosphatpuffer im Verhältnis 1/1 (v/v), bei 20°C aufgenommen. Die erhaltenen CD-Spektren sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

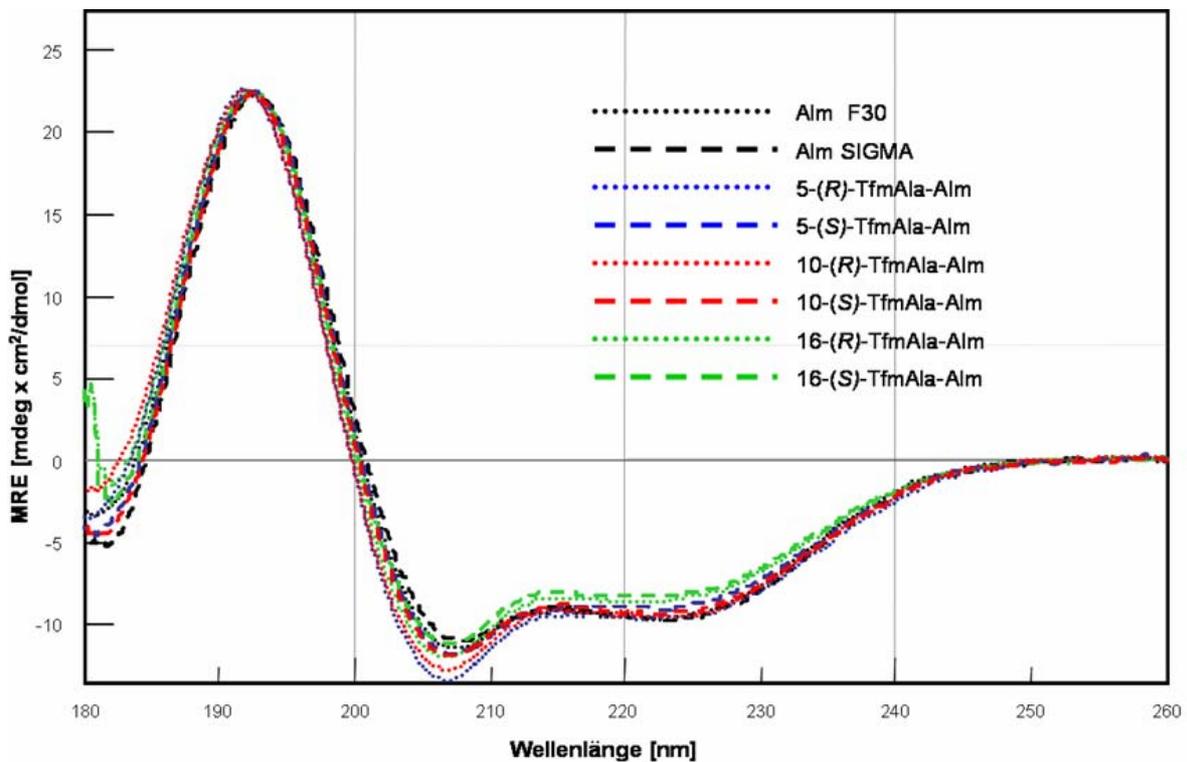


Abbildung 4.4: CD-Spektren aller fluorinierten Alm-Analoga sowie des synthetisierten Alm F30 und Alm SIGMA.

Aus den CD-Spektren lässt sich leicht erkennen, dass die Lage der Banden sowie der Verlauf der Kurve einander identisch bzw. sehr ähnlich sind. Die erhaltenen Spektren entsprechen einer α -helikalen Struktur (siehe Referenz-CD-Spektren in Abbildung 3.3).

Eine quantitative Analyse der jeweiligen Strukturanteile mit zwei verschiedenen Algorithmen, CONTIN⁹⁹ und CDSSTR¹⁰⁰, ergaben dieselben Resultate. In Abbildung 4.5 sind die Ergebnisse der berechneten Sekundärstrukturanteile des Auswertalgorithmus CONTIN gezeigt.

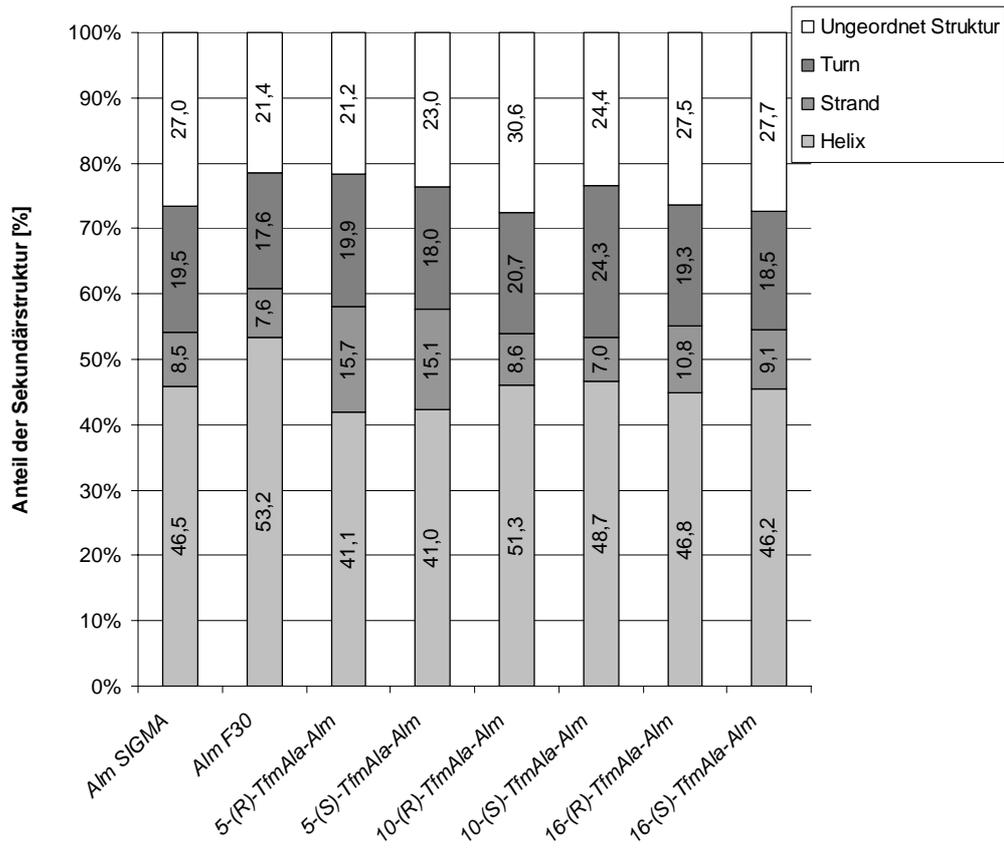


Abbildung 4.5: Balkendiagramm der verschiedenen Sekundärstrukturanteile der fluorierten Analoga verglichen mit dem natürlichen Alm.

4.6 Festkörper-NMR

4.6.1 ^{31}P -Festkörper-NMR

Zur Untersuchung von Peptid-Lipid-Wechselwirkungen stellt die ^{31}P -NMR ein geeignetes Werkzeug dar, um die Eigenschaften der Phospholipide zu beobachten. Mit der ^{31}P -NMR lässt sich deren Orientierung und Phase über die Lage des Signals bestimmen (siehe Kapitel 1.4.5.1), welche wichtige Parameter hinsichtlich der angewandten NMR-Strukturanalyse darstellen. Weiterhin lässt sich durch Vergleich der mit ^{31}P -NMR vermessenen Proben der fluorierten Alm-Analoga mit dem Wildtyp Alm F30 der Einfluss einer eingeführten Trifluormethylgruppe auf das Peptid und störende Wechselwirkungen mit der Lipidmembran beurteilen.

Abbildung 4.6 zeigt repräsentative ^{31}P -Spektren horizontal orientierter DMPC-Lipidmembranen von A: Kontrolle ohne Peptid, B: Alm F30 und C: 10-(S)-TfmAla-Alm, bei denen durch Integration ein erwünschter lamellarer, uni-axialer Orientierungsgrad von mindestens 75% bestimmt werden konnte. Die identische Lage des Signal weist auf keinerlei Störung der Phospholipide in der Membran hin. Für die Probenvorbereitung konnte auf schon bestehen Protokolle zurückgegriffen werden (siehe Kapitel 3.2.4), welche in Zusammenhang mit Alm und dessen fluorierte Analoga problemlos funktionierten.

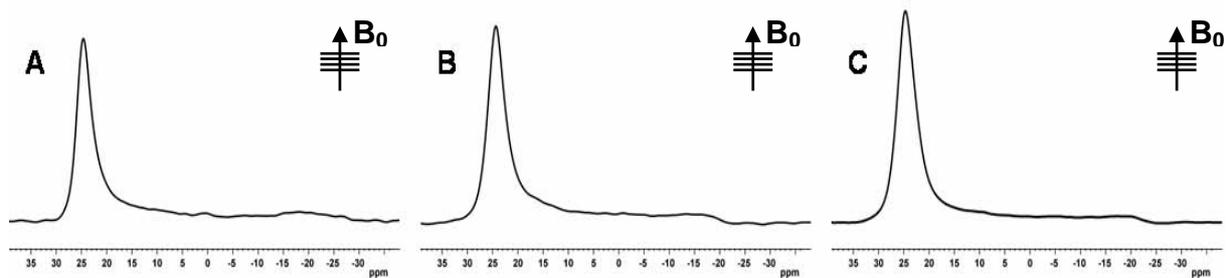


Abbildung 4.6: ^{31}P -Festkörperspektren von orientierten Proben (Membrannormale N liegt parallel zum Magnetfeld B_0 , wie angedeutet, siehe Kapitel 1.4.5.4) bei 35°C . A: DMPC-Kontrolle ohne Peptid. B: Alm F30 mit einem $P/L=1:200$. C: 10-(S)-TfmAla-Alm mit einem $P/L=1:200$.

Diese Messungen sind immer vor und nach einem ^{19}F -NMR-Experiment durchgeführt worden. Damit ist die Integrität der Proben sichergestellt und eine Auswertung der gemessenen ^{19}F -Spektren möglich. Für die in dieser Arbeit verwendeten Phospholipidgemische (pures DMPC, DMPC/Cholesterol in einem molaren Verhältnis von 8/2 und DMPG/POPE in molarem Verhältniss 7/3), zur Präparation

der Lipidmembran wurde in allen Fällen ein akzeptabler uni-axialer Orientierungsgrad nachgewiesen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird deswegen auf die Darstellung der entsprechenden ^{31}P -NMR-Spektren verzichtet.

Als Ergebnis lässt sich zusammenfassen, dass die fluorierten Alm-Derivate erfolgreich in verschiedene Lipidmembranen rekonstituiert werden können und diese keine Störungen in der Lipiddoppelschicht verursachen.

4.6.2 ^{19}F -Festkörper-NMR

Nach erfolgreicher Rekonstitution in orientierten Phospholipidmembranen konnte im nächsten Schritt die dipolare Kopplung Δ_{FF} der CF_3 -Gruppe unter verschiedenen Bedingungen gemessen werden. Diese Bedingungen wurden insbesondere hinsichtlich vier Fragen gewählt:

- Welche Sekundärstruktur hat Alm in einer Membran?
- Wie orientiert sich das Alm in Abhängigkeit der Konzentration?
- In wiefern hat eine unterschiedliche Lipidkomposition, mit Bezug auf biologisch relevante Systeme, Auswirkungen auf die Orientierung des Alm?
- Hat die Temperatur Einfluss auf die Lage des Alm in der Membran?

Die erhaltenen Aufspaltungen flossen dann in die Berechnung der drei relevanten Orientierungs-Parameter τ , ρ und S_{mol} für drei Alm-Modelle (siehe Abschnitt 3.2.5).

4.6.2.1 *Variation der Alamethicinkonzentration*

4.6.2.1.1 *Spektren*

In den nachstehenden Abbildung 4.7–4.9 sind die erhaltenen ^{19}F -Festkörperspektren als Konzentrationsserie gezeigt. Für die meisten Spektren konnte trotz der Abweichung eines idealen Triplets eine auswertbare Dipolkopplung und dessen Vorzeichen verlässlich bestimmt werden. Die dafür verantwortlichen Relaxationseffekte sind noch Gegenstand der Diskussion^{59, 79}. Nur im Falle eines sehr geringen Peptidanteils, ist eine Identifizierung der Dipolkopplung nicht möglich.

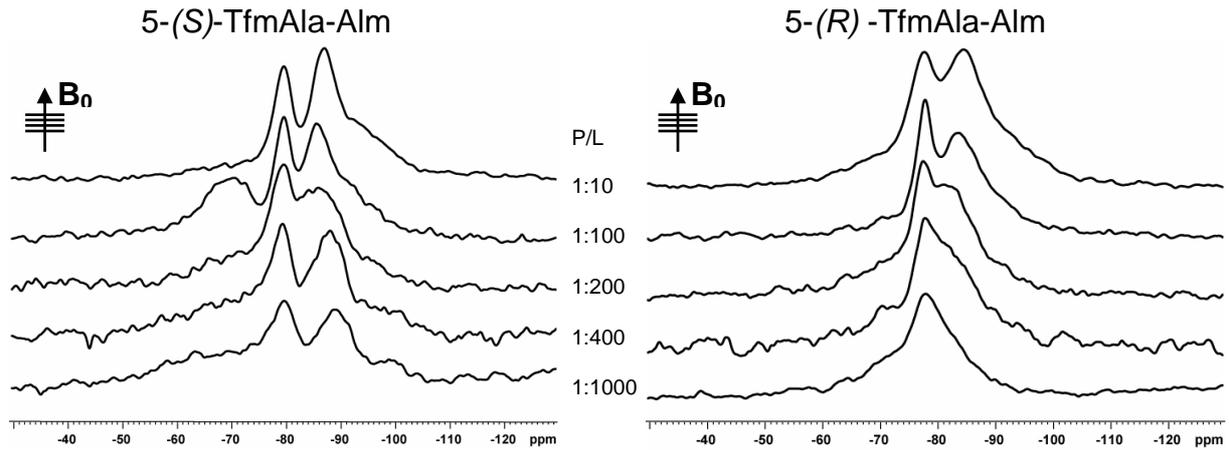


Abbildung 4.7: ^{19}F -Festkörperspektren der beiden 5-TfmAla-Alm-Epimere in DMPC-Membranen bei unterschiedlichen Konzentrationen und 35°C.

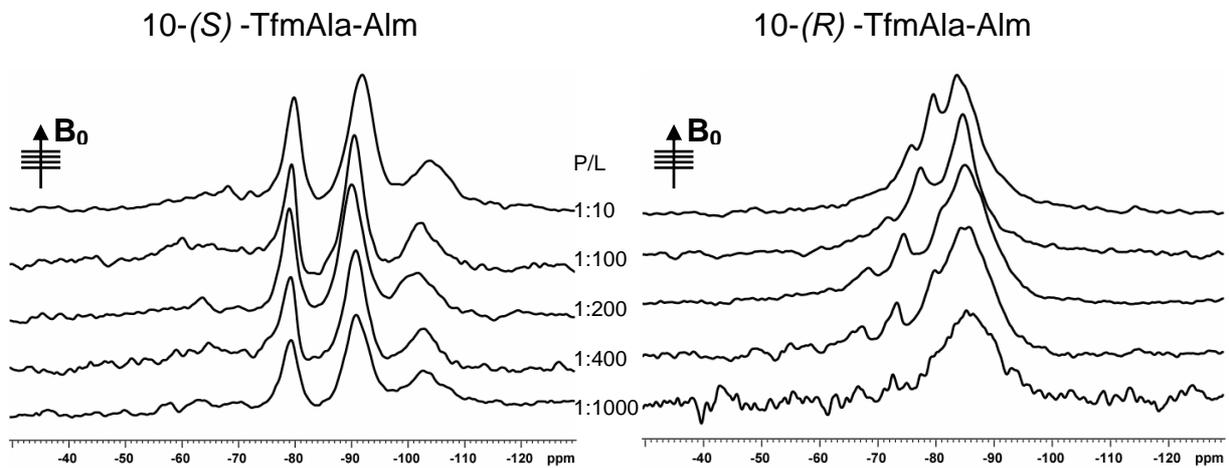


Abbildung 4.8: ^{19}F -Festkörperspektren der beiden 10-TfmAla-Alm-Epimere in DMPC-Membranen bei unterschiedlichen Konzentrationen und 35°C.

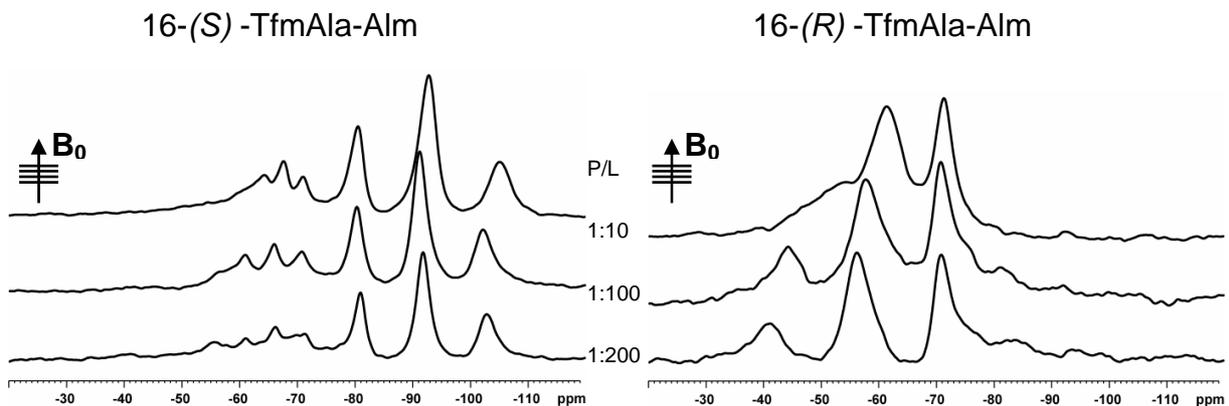


Abbildung 4.9: ^{19}F -Festkörperspektren der beiden 16-TfmAla-Alm-Epimere in DMPC-Membranen bei unterschiedlichen Konzentrationen und 35°C. Das (S)-Epimer zeigt neben dem dominierenden Triplett ein weiteres kleines Triplett. Da das Peptid laut HPLC und hochauflösender ^{19}F -NMR keine Verunreinigung enthält, liegt hier womöglich ein geringer Teil des fluorierten Alm in einer anderen Orientierung in der Lipidmembran.

Auffällig ist, dass sich die Dipolkopplung für die (S)-konfigurierten TfmAla-Alm mit abnehmender Konzentration nur sehr wenig verändert. Innerhalb der Konzentrationsserie der (R)-Epimere ist die Veränderung der Dipolkopplung des an Position 16 markierten Alm gerade bei zu höheren Peptidkonzentrationen hin auffällig. Die jeweils größte Änderung über den ganzen Konzentrationsbereich hinweg ist für beide 16-Alm-Epimere zu beobachten.

Die dipolare Kopplung kann aber auch aus vertikal zum Magnetfeld B_0 angeordneten Proben ermittelt werden (siehe Abschnitt 1.4.5.4). Dies wurde für alle oben gezeigten Proben durchgeführt und war zur Bestimmung des isotropen Wertes und damit zur Zuordnung des Vorzeichens der Kopplung notwendig. Des Weiteren konnte der Betrag der dipolaren Kopplung verifiziert (oder in 2 Fällen genauer bestimmt) werden. Exemplarisch ist in Abbildung 4.10: ein solches Spektrum für das 10-(S)-TfmAla-Alm gezeigt. Eine Halbierung der dipolaren Kopplung kommt nur zustande, wenn das Peptid schnell (relativ gesehen auf der NMR-Zeitskala) um die Membrannormale N rotiert (siehe Abschnitt 1.4.5.3). Da dies für jede Probe der obigen Konzentrationsserien der Fall ist, liegen alle fluorierten Alm als um die Membrannormale rotierende Peptide in der Lipidmembran vor. In Tabelle 4.6 sind die Dipolkopplungen der horizontal zum Magnetfeld gemessenen Alm-Analoga zusammengestellt.

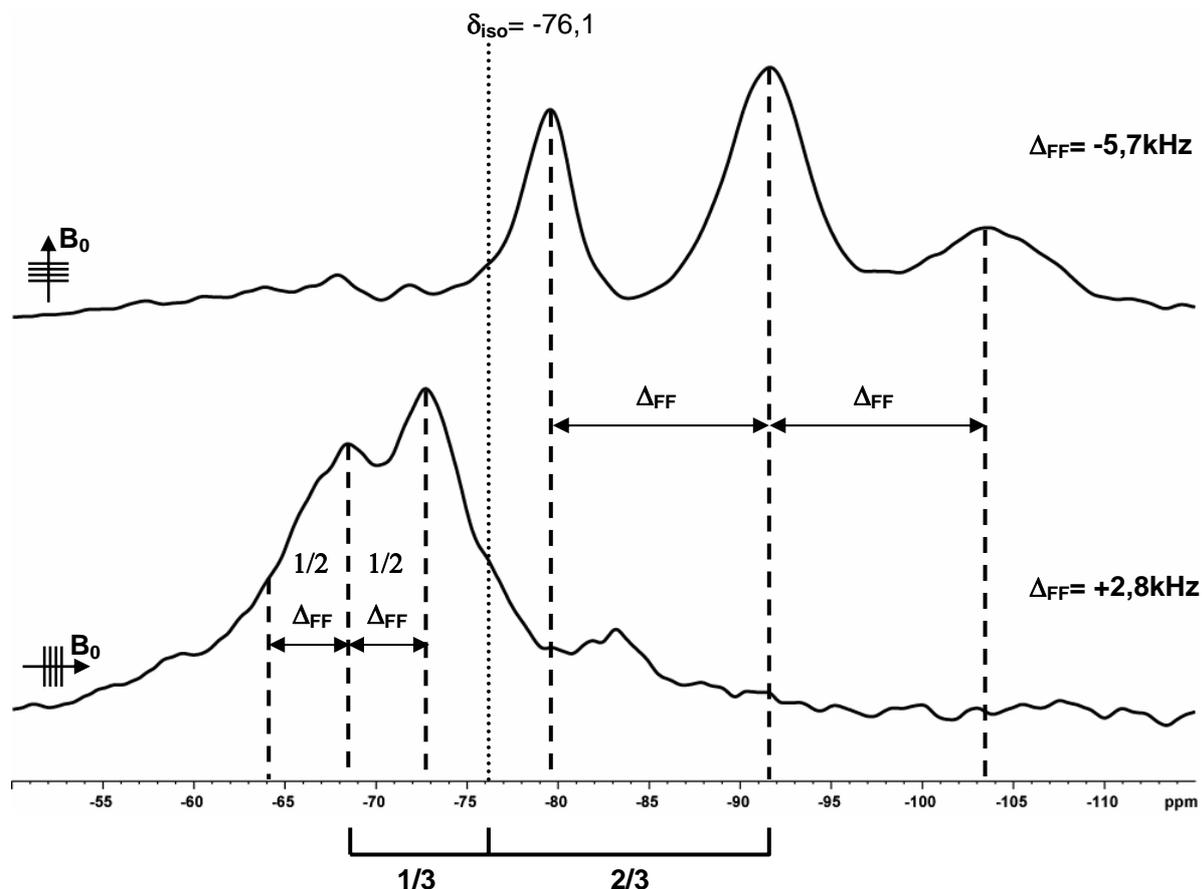


Abbildung 4.10: Repräsentatives ^{19}F -Festkörperspektren für das 10-(S)-TfmAla-Alm-Derivat bei einem P/L=1:10 in DMPC bei 0° (oben) und 90° (unten) Probenorientierung. Die chemische Verschiebungsanisotropie liefert in beiden Probenorientierungen jeweils einen zentralen Peak mit dem Abstand 2/3 zu 1/3 zur isotropen Position (vgl. Abbildung 1.13).

Tabelle 4.6: Übersicht über die ermittelten Dipolkopplungen in [kHz] der TfmAla-Alm-Derivate für verschiedene DMPC-Konzentrationen (siehe Abbildung 4.7 bis Abbildung 4.9.)

	5-(S)- TfmAla-Alm	5-(R)- TfmAla-Alm	10-(S)- TfmAla-Alm	10-(R)- TfmAla-Alm	16-(S)- TfmAla-Alm	16-(R)- TfmAla-Alm
1:10 (P/L)	-3,3	-3,0	-5,7	+1,8	-5,7	+4,6
1:100 (P/L)	-2,8	-2,7	-5,4	+2,0	-5,1	+6,2
1:200 (P/L)	-3,6	-2,7	-5,4	+2,0	-5,1	+7,0
1:400 (P/L)	-4,0	nicht exakt bestimmbar	-5,4	+2,0	-	
1:1000 (P/L)	-4,0	nicht exakt bestimmbar	-5,4	nicht exakt bestimmbar	-	

4.6.2.1.2 Auswertung

Die im vorhergehenden Abschnitt ermittelnden Dipolkopplungen gehen in die Berechnung der Alm-Orientierungsparameter, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben ein, die „best fit“-Lösungen sind in Tabelle 4.7 dargestellt.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Orientierungsberechnung für Alm: τ (Kippwinkel der Achse des Moleküls zur Membrannormalen), ρ (Rotationswinkel um die Molekülachse relativ zu einem Bezugspunkt), S_{mol} (Ordnungsparameter, welcher die isotrope Bewegungsausmittlung beschreibt) und Fehlergröße χ^2 .

P/L-Verhältnis	Helixmodell	χ^2	τ [°]	ρ [°]	S_{mol}
1:10	4 Markierungen (Position 5 und 10)				
	3_{10} -Helix	3,56	37,1	147	0,54
	α-Helix	0,17	8,1	81,8	0,99
	Kristallstruktur	3,65	174,8	151,6	1,13
	6 Markierungen (Position 5,10 und 16)				
	3_{10} -Helix	5,6	42,3	147	0,62
	α -Helix	22,99	68,4	104,3	0,70
	Kristallstruktur	6,95	174,5	129,9	1,07
	1:100	4 Markierungen (Position 5 und 10)			
3_{10} -Helix		3,93	38,0	144,5	0,49
α-Helix		0,28	9,0	84,8	0,91
Kristallstruktur		2,75	174,2	156,6	1,04
6 Markierungen (Position 5,10 und 16)					
3_{10} -Helix		8,40	46,1	141,9	0,57
α -Helix		33,80	71,5	105,3	0,66
Kristallstruktur		66,21	160,5	164,3	0,71
1:200		4 Markierungen (Position 5 und 10)			
	3_{10} -Helix	2,46	40,5	147,4	0,55
	α-Helix	0,76	7,8	78,0	0,96
	Kristallstruktur	1,89	7,8	78,0	1,13
	6 Markierungen (Position 5,10 und 16)				
	3_{10} -Helix	8,34	47,6	142,8	0,63
	α -Helix	36,87	72,5	105,2	0,71
	Kristallstruktur	1,89	175,1	148,1	1,13

Eine Differenzierung der in die Berechnung eingehenden Dipolaufspaltungen (4 Markierungen vs. 6 Markierung) soll eine eventuell vorhandene gerade, durchgehende Helix von einer „geknickten Helix“ unterscheidbar machen. Berechnungen für die niedrigen Peptidkonzentrationen (P/L=1:400 und 1:1000) zeigen keine weitere Veränderung für die Positionen 5 und 10 (Daten nicht gezeigt).

Indikator für eine befriedigende χ^2 -Anpassung ist ein Wert <1 , als Startstrukturmodellvorgaben gehen eine 3_{10} -Helix ($\varphi=-50$, $\psi=-28$), α -Helix ($\varphi=-58$, $\psi=-47$) und die Kristallstruktur (PDB-Code 1AMT) ein, von denen die beiden erstgenannten jeweils Geometrieoptimiert wurden (Details: siehe Kapitel 3.2.5).

Aus den Dipolkopplungen aller P/L-Verhältnisse ergeben die Berechnungen, das eine akzeptable Lösung nur für den N-terminalen Bereich des Alm-Analogen (markierte Positionen 5 und 10) zu finden ist. Hierbei ist zu sagen, das die Annahme des Modells der α -Helix ($\varphi=-58^\circ$, $\psi=-47^\circ$) bei weitem die verlässlichsten und plausibelsten Werte (in Tabelle 4.7 fett hervorgehoben), einen Kippwinkel τ von ca. 8-10° und einen Rotationswinkel ρ von ca. 80° um die Helixrotationsachse, liefert (siehe Abbildung 4.11).

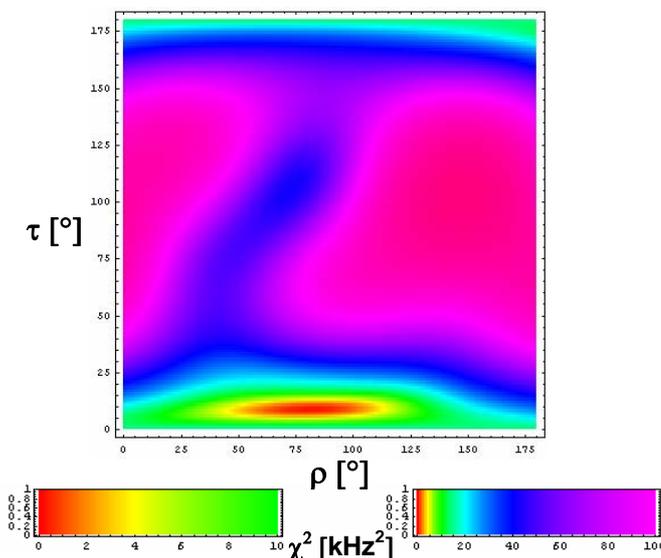


Abbildung 4.11:

Das gezeigte τ, ρ -Diagramm stellt die χ^2 -Funktion der α -Helix für den N-terminalen Teil des Alm dar, der systematisch über den gesamten Raum von τ und ρ gedreht wurde. Das gefundene Minimum ist im rot gezeichneten Bereich (siehe Skala) zu finden. Hier ist die Anpassung für das P/L-Verhältnis von 1:10 dargestellt.

Der sehr hohe Wert des Ordnungsparameters S_{mol} von 0,91-0,99 weist auf eine sehr geringe isotrope Bewegung des Alm-Analogen in der Lipidmembran.

Damit lassen sich folgende Aussagen treffen:

1. Die Annahme einer α -Helix für den N-terminale Teil des Alm ergibt eine aufrechte Orientierung in der Lipiddoppelschicht (I-state).
2. Unter den untersuchten Bedingungen ist der I-state des N-Terminus des Alm konzentrationsunabhängig bis zu einem P/L-Verhältnis 1:1000
3. Die Annahme einer 3_{10} -Helix bzw. einer Kristallstruktur ist für den N-terminalen Teil sind nicht kompatibel mit den ermittelten Dipolaufspaltungen
4. Weder eine durchgehende, gerade α -Helix noch eine 3_{10} -Helix bezüglich des gesamten Alm geben eine befriedigende Lösung. Das bedeutet, dass das

Peptid nach Position 10 in anderer Konformation als die angenommenen Strukturmodelle (α -Helix, 3_{10} -Helix) vorliegt.

5. Auch die Kristallstruktur als Modell liefert unbefriedigende Ergebnisse.

4.6.2.2 Variation der Lipidkomposition

Das Verhalten der fluorierten Analoga soll nun in biologischen Membranmodellen getestet werden. Eukaryotische Membranen zeichnen sich durch einen hohen Anteil an zwitterionisch neutral geladenen Phospholipiden und Steroiden aus. Die Membranen von Bakterien hingegen (Prokaryoten) enthalten neben einem sehr hohen Anteil negativ geladener Lipide auch zwitterionische Lipide (siehe Kapitel 1.2). Um diese natürliche Situationen zu simulieren, wurden die Peptide in DMPC/Cholesterol (8/2) und in DMPG/POPE (7/3) in dem angegebenen molaren Verhältnis erfolgreich rekonstituiert und ^{19}F -Spektren aufgenommen.

4.6.2.2.1 Spektren

Die in Abbildung 4.12 gezeigten Spektren spiegeln kein anderes Verhalten des Alm in den rekonstituierten Lipidmembranen als in reinem DMPC wider.

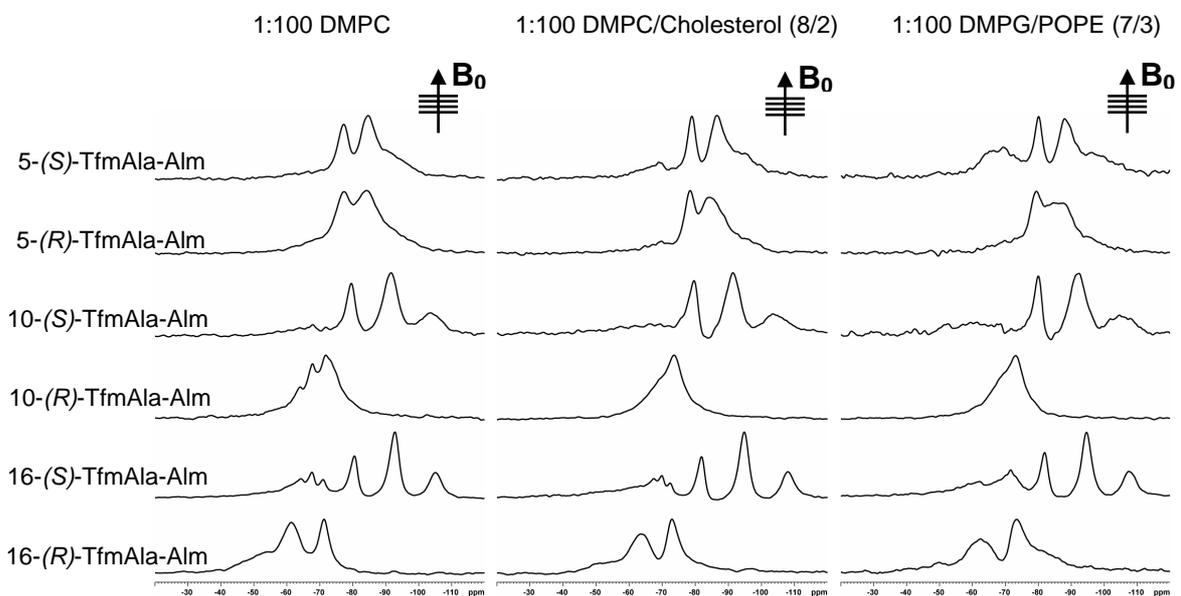


Abbildung 4.12: ^{19}F -Festkörperspektren der TfmAla-Derivate in unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen bei 35°C und 0° -Probenorientierung. Es werden keine anderen Dipolaufspaltungen als in DMPC (linke Spektrenreihe als Vergleich) beobachtet.

Es wurde auch für eine Markierung die Konzentration für beide Lipidsysteme variiert, eine Abhängigkeit der Orientierung des Alm-Derivats davon konnte dabei wie in

DMPC nicht festgestellt werden. Weiterhin zeigen die, mit 90° relativ zum Magnetfeld B_0 , aufgenommenen Spektren eine Halbierung der Dipolaufspaltung und somit eine Rotation (auf der Experimentzeitskala, im ms-Bereich) um die Membrannormale (Spektren nicht gezeigt).

4.6.2.2 Auswertung

Die berechneten Orientierungsparameter des Alm, rekonstituiert in immittierende Lipidsystemen für Eu- und Prokaryoten, sind in nachstehender Tabelle dargestellt.

Tabelle 4.8: Übersicht der beobachteten Dipol-Dipol-Aufspaltung (^{19}F - ^{19}F) und berechneten „best-fit“-Orientierungsparameter für Alm-Derivate in DMPC/Cholesterol (8/2) und DMPG/POPE (7/3) bei 35°C und einem P/L=1:100 für 3 verschiedene Modelle. Die besten Lösungen sind fett hervorgehoben.

Membranzusammenstellung und P/L-Verhältnis	Beobachtete Δ_{FF} der TfmAla-Alm [kHz]	Helixmodell	χ^2	τ [°]	ρ [°]	S_{mol}
4 Markierungen (Position 5 und 10)						
1:100 DMPC/Cholesterol (8/2)	5-(S)-TfmAla-Alm = -3,5	3_{10} -Helix	2,97	40,3	145,2	0,55
	5-(R)-TfmAla-Alm = -2,8	α-Helix	0,89	8,4	79,2	0,98
	10-(S)-TfmAla-Alm = -5,6	Kristallstruktur ¹⁶	1,91	174,6	150,7	1,16
	10-(R)-TfmAla-Alm = +2,3	6 Markierungen (Position 5, 10 und 16)				
	16-(S)-TfmAla-Alm = +4,4	3_{10} -Helix	4,9	43,5	147,9	0,64
	16-(R)-TfmAla-Alm = -6,1	α -Helix	21,31	68,2	106,2	0,71
4 Markierungen (Position 5 und 10)						
1:100 DMPG/POPE (7/3)	5-(S)-TfmAla-Alm = -3,7	3_{10} -Helix	3,33	40,2	147,9	0,58
	5-(R)-TfmAla-Alm = -2,8	α-Helix	0,69	7,8	80,9	1,00
	10-(S)-TfmAla-Alm = -5,8	Kristallstruktur ¹⁶	2,42	175,2	150,9	1,18
	10-(R)-TfmAla-Alm = +2	6 Markierungen (Position 5, 10 und 16)				
	16-(S)-TfmAla-Alm = +5,1	3_{10} -Helix	5,44	44,5	147,9	0,66
	16-(R)-TfmAla-Alm = -6,0	α -Helix	23,96	69,3	105,0	0,73
4 Markierungen (Position 5 und 10)						
6 Markierungen (Position 5, 10 und 16)						
4 Markierungen (Position 5 und 10)						
6 Markierungen (Position 5, 10 und 16)						
4 Markierungen (Position 5 und 10)						
6 Markierungen (Position 5, 10 und 16)						

Die Ergebnisse, die für reines DMPC als Lipidmodellsystem erhalten wurden, gelten in gleicher Weise für eukaryotische und prokaryotische Modellmembranen. Demzufolge haben weder Cholesterol, das negativ geladene DMPG noch das POPE unter denn experimentellen Bedingungen Einfluss auf die Orientierung des Alm.

4.6.2.3 Variation der Temperatur

Durch Temperaturänderungen können Erkenntnisse über die dynamischen Prozesse des Alm in Membranen getroffen werden.

4.6.2.3.1 Spektren

Zu diesem Zweck wurden für die an Position 5 und 10 markierten Alm-Analoga Temperaturserien von 10°C-35°C in DMPC-Lipidmembranen gemessen, deren Spektren in Abbildung 4.13 angeordnet sind.

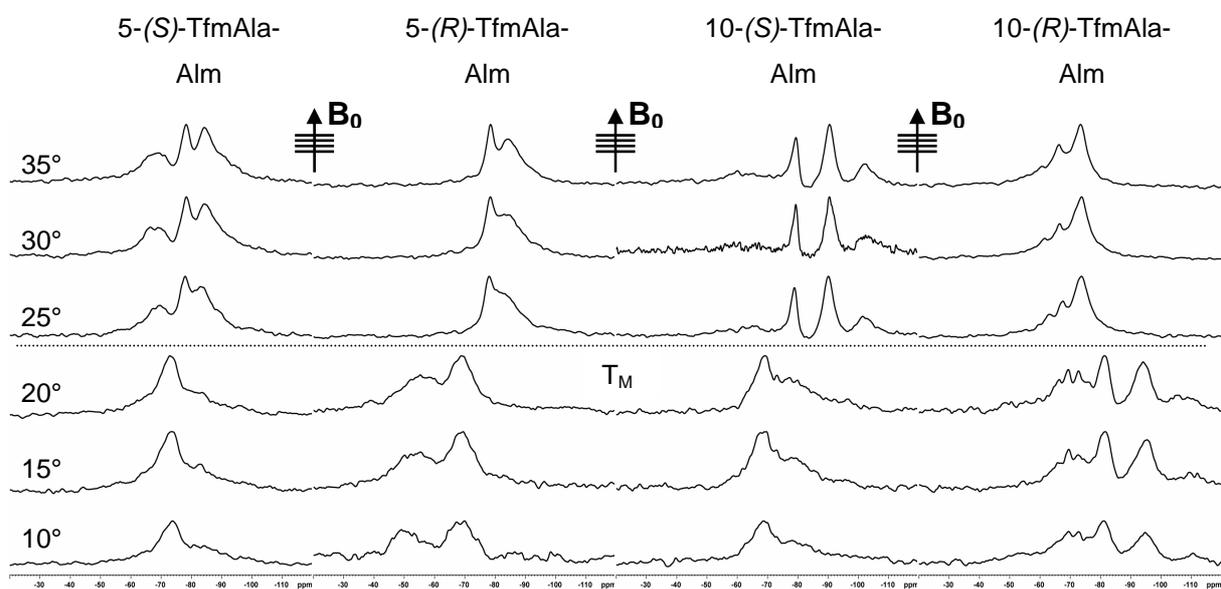


Abbildung 4.13: ^{19}F -Festkörperspektren der Temperaturserie der 5 und 10-TfmAla-Alm-Epimere in DMPC bei einem P/L=1:100 und 0° Probenorientierung zum Magnetfeld B_0 . Alle Spektren zeigen eine plötzliche, diskrete Veränderung der Dipolkopplung und des Vorzeichens mit Unterschreiten der Phasenübergangstemperatur des Lipids DMPC ($T_M=24^\circ\text{C}$; gestrichelte Linie). Dies bedeutet eine Umorientierung des Peptids mit Veränderung des flüssigkristallinen Zustandes der Membran hin zum Gelzustand. Das Epimer 10-(R)-TfmAla-Alm zeigt ein kleines Triplet links der dominierenden Signale, welches auf eine Koexistenz zweier Orientierungen dieses Epimers hinweist (wurde in die Berechnung der Parameter aber nicht mit einbezogen).

Um die Rotation des Peptids unterhalb der Phasenübergangstemperatur des DMPC zu untersuchen, wurden Spektren einer Temperaturserie in senkrechter Probenorientierung zum Magnetfeld aufgenommen (siehe Abbildung 4.14). Für ein um die Membrannormale rotierendes Peptid ist eine Halbierung der Dipolkopplung und eine Änderung der chemischen Verschiebungsanisotropie zu erwarten. Dies wird nicht beobachtet und bedeutet, dass unterhalb der Phasenübergangstemperatur des Lipids, also im Gelzustand, das Peptid nicht mehr um die Membrannormale rotiert. Es kann auch ausgeschlossen werden, dass das Peptid in allen erdenklichen

Orientierungen vorliegt da man somit ein Pulverspektrum erhalten würde. Wäre dies der Fall, so müsste sich dann für alle fluorierten Alm das gleiche Spektrum ergeben.

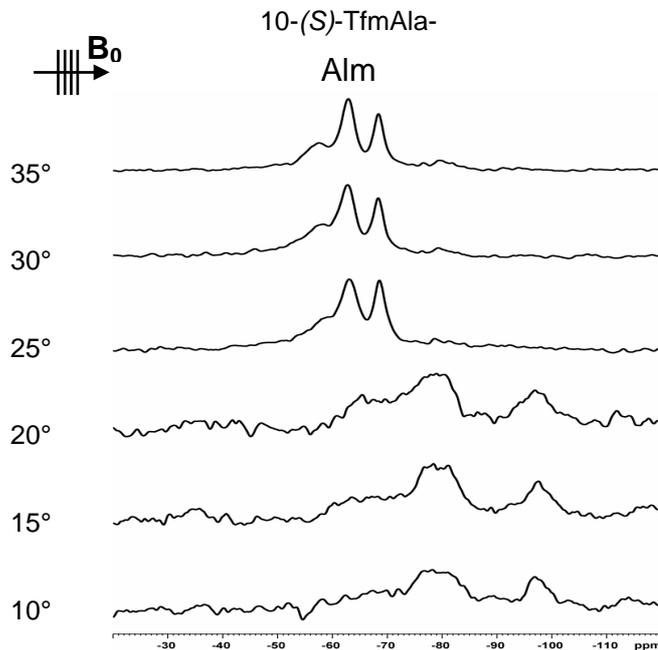


Abbildung 4.14:

Repräsentatives ^{19}F -Festkörperspektrum der Temperaturserie eines TfmAla-Alm-Epimers in DMPC bei einem P/L=1:100 und einer 90° -Anordnung der Membrannormalen zum Magnetfeld B_0 . Die Dipolkopplung wird im Vergleich zu dem in Abbildung 4.13 gezeigten Spektrum bei tiefen Temperaturen größer.

Weiterhin wurden, ebenfalls für die an Position 5- und 10-markierten Alm-Analoga; Temperaturserien der in Kapitel 4.6.2.2 beschriebenen Lipidkompositionen aufgenommen und auf Einflüsse der Temperatur untersucht. In Abbildung 4.15 sind zur besseren Übersicht nur die Spektren bei einer Temperatur von 15°C der jeweiligen fluorierten Alm gezeigt.

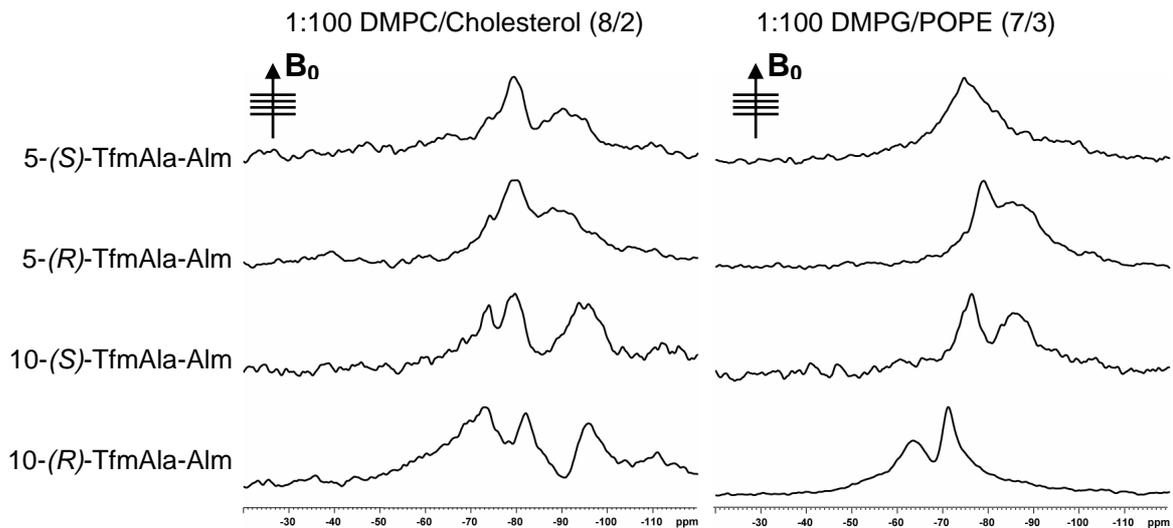


Abbildung 4.15: ^{19}F -Festkörperspektren der 5 und 10-TfmAla-Alm-Epimere in DMPC/Cholesterol (8/2) und DMPG/POPE (7/3) bei einem P/L=1:100, 15°C und einer 0° -Probenanordnung.

Für die TfmAla-Alm-Epimere, rekonstituiert in DMPC/Cholesterol, ergeben sich jeweils noch zusätzlich ein mehr oder weniger stark betontes isotropes Signal, welches nicht in die Strukturparameterberechnung mit einfluss. Aufgrund der Form der Signale kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass mehrere Orientierungen gleichzeitig vorliegen (Überlagerung von Triplets).

4.6.2.3.2 Auswertung

In Tabelle 4.9 sind die berechneten Orientierungsparameter für die drei getesteten Lipidsysteme bei 15°C dargestellt.

Tabelle 4.9: Übersicht der beobachteten Aufspaltung und berechneten Orientierungsparameter für pures DMPC, DMPC/Cholesterol (8/2) und DMPG/POPE (7/3) bei 15°C und einem P/L=1:100 für 3 verschiedene Modelstrukturen.

Membranzusammenstellung und P/L-Verhältnis	Beobachtete Δ_{FF} der TfmAla-Alm [kHz]	Helixmodell	χ^2	τ [°]	ρ [°]	S_{mol}
4 Markierungen (Position 5 und 10)						
1:100 DMPC	5-(S) -TfmAla-Alm = 0					
	5-(R) -TfmAla-Alm = +7,3	3_{10} -Helix	20,03	131,2	161,8	0,55
	10-(S) -TfmAla-Alm = +4,2					
	10-(R) -TfmAla-Alm = -6,5	α-Helix	>0,01	69,4	168,9	0,82
		Kristallstruktur	0,61	73,3	69,1	0,75
4 Markierungen (Position 5 und 10)						
1:100 DMPC/Cholesterol (8/2)	5-(S) -TfmAla-Alm = -5,0					
	5-(R) -TfmAla-Alm = -3,8	3_{10} -Helix	0,09	174,2	92,6	1,13
	10-(S) -TfmAla-Alm = -7,4					
	10-(R) -TfmAla-Alm = -6,4	α -Helix	23,41	177,0	71,1	1,28
		Kristallstruktur	12,76	58,2	165,3	1,60
4 Markierungen (Position 5 und 10)						
1:100 DMPG/POPE (7/3)	5-(S) -TfmAla-Alm = 0					
	5-(R) -TfmAla-Alm = -3,0	3_{10} -Helix	3,32	40,2	147,8	0,58
	10-(S) -TfmAla-Alm = -4,3					
	10-(R) -TfmAla-Alm = +3,6	α-Helix	0,08	18,3	84,1	0,64
		Kristallstruktur	2,03	165,2	162,2	0,71

Hier ergibt für die Lipidsysteme pures DMPC und DMPG/POPE das α -Helixmodell (fett hervorgehoben) die beste Anpassung. Ungewöhnlich sind die zugehörigen Ordnungsparameter, welche beide einen kleineren Wert (S_{mol} zwischen 0,6 und 0,81)

verglichen zu den Ordnungsparametern bei 35°C ($S_{\text{mol}} = 1$) annehmen. Damit ist trotz abgesenkter Temperatur eine größere isotrope Beweglichkeit der Fall.

Für das Lipidsystem DMPC/Cholesterol gibt eine 3_{10} -Helix die beste Anpassung in der Fehlerfunktion, aber der Wert des Ordnungsparameters ist nicht akzeptabel, da er per Definition nur Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Zudem erschwert die Qualität der erhaltenen Spektren eine exakte Zuordnung. Gründe hierfür können, wie schon erwähnt, mehrere Orientierungen des Alm nebeneinander oder eine ungenügende Probengüte sein. Zumindest wird qualitativ eine Änderung bezüglich der Spektren bei 35°C beobachtet.

Abbildung 4.16 stellt die zugehörigen τ , ρ -Diagramme in Abhängigkeit der Fehlerfunktion χ^2 dar.

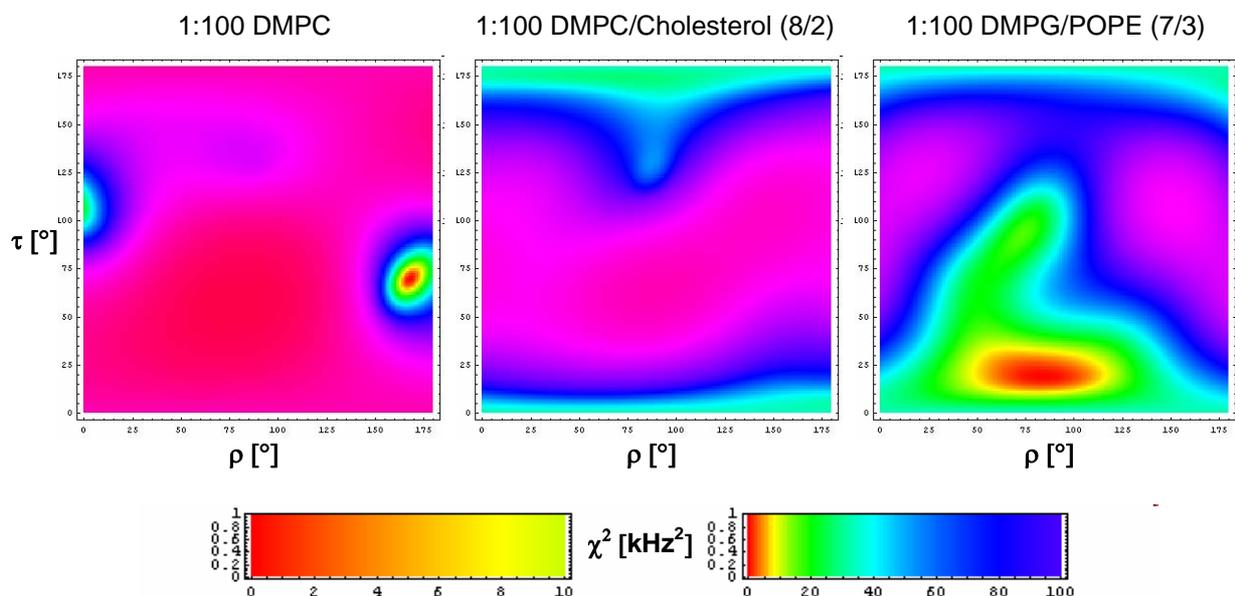


Abbildung 4.16: τ , ρ -Diagramme der für 15°C berechneten Strukturparameter mit einer α -Helix als Modellstruktur.

Die an Position 16 markierten Alm-Derivate wurden ebenfalls vermessen, die berechneten Strukturparameter sind jedoch den vorangegangenen Kapiteln ähnlich in schlechter Anpassung der Fehlerfunktion χ^2 und werden nicht gezeigt.

4.6.3 Zusammenfassung der Festkörper-NMR-Ergebnisse

Im Folgenden werden nochmals kurz die Resultate der NMR-Messungen zusammengefasst. Diese bilden die Grundlage der anschließenden Diskussion in dieser Arbeit für Modelle der Alm-Struktur und Orientierung in Lipidmembranen.

- Die Alm-Analoga lassen sich erfolgreich in Modellmembranen rekonstituieren.

- Eine α -Helix als Modellstruktur liefert die besten Ergebnisse, basierend auf den ermittelnden Dipolkopplungen. Dies gilt aber nur für den N-terminalen Bereich (Position 5 und 10).
- Das Alm nimmt für die drei getesteten Lipidmodellsysteme eine transmembrane Orientierung mit einer Rotation um die Membrannormale, den wahrscheinlich porenbildenden I-state, ein. Dieser ist unabhängig von der Konzentration des Peptids.
- Eine Rotation der Peptide um die Membrannormale wird nur oberhalb der Phasenübergangstemperatur im flüssigkristallinen Zustand der Lipidmembran beobachtet.
- Im Gelzustand der Membran findet in reinem DMPC eine Umorientierung des Alm zu einem bezüglich der Membranoberfläche leicht geneigten Zustand mit den Orientierungsparametern $\tau=70^\circ$, $\rho=170^\circ$ und $S_{\text{mol}}=0,82$. Im Falle der einfachen prokaryotischen Membran bleibt das Alm insertiert. Aussagen über die eukaryotenimitierende Membran (DMPC/Cholesterol) sind schwer zu treffen, zumindest wird ein Unterschied zur prokaryotischen Membran deutlich.
- Der Ordnungsparameter S_{mol} sinkt mit fallender Temperatur, was auf eine höhere Beweglichkeit hinweist. Dies könnte in der Auflösung der stabilen I-state-Anordnung bzw. dem Herausdrängen aus der Lipiddoppelschicht begründet sein.

4.7 OCD-Spektroskopie

Damit die fluorierten Alm-Analoga mit dem natürlichen Alm F30 in ihrem Verhalten in einer Lipidmembran gleichgesetzt werden können, wurden orientierte Zirkulardichroismus-Spektren eines fluorierten Peptaibols (10-(S)-TfmAla-Alm) bei zwei unterschiedlichen Temperaturen in DMPC (ober- und unterhalb des Phasenübergangs) als Lipid aufgenommen und mit Alm F30 verglichen. Dies diente auch zur Überprüfung der temperaturabhängigen Umorientierung der Alm-Analoga.

Wie in Kapitel 3.2.6 dargelegt wurde, kann die Orientierung von α -Helices in einer orientierten Lipidmembran durch Vergleich mit charakteristischen OCD-Spektren qualitativ bestimmt werden. Dabei kann nach dem Shai-Matsuzaki-Huang-Modell³⁸ zwischen einem I-state und einem S-state unterschieden werden.

Der Graph in Abbildung 4.17 zeigt zwei OCD-Spektren des synthetisierten Alm F30 in orientierten DMPC-Doppelschichten bei unterschiedlichen Temperaturen. Das OCD-Spektrum bei 30°C entspricht einem helikalen I-state des Alm F30 (siehe Referenz-OCD-Spektren Abbildung 3.4). Dies deckt sich mit vorherigen Studien³⁷ (dort verwendete Bedingungen: P/L=1/15, Lipid: DPhPC verwendet). Die positive Bande ist etwas verbreitert und Richtung 201 nm verschoben, was auf beta-Anteile und auf eine eventuell vorliegende Aggregation schließen lässt. Das OCD-Spektrum bei 10°C ergibt eine Superposition der für I- und S-state typische Spektren mit starker Tendenz zu erhöhten negativen Signalen und bedeutet, dass das Peptid eine Schräglage in der Membran einnimmt.

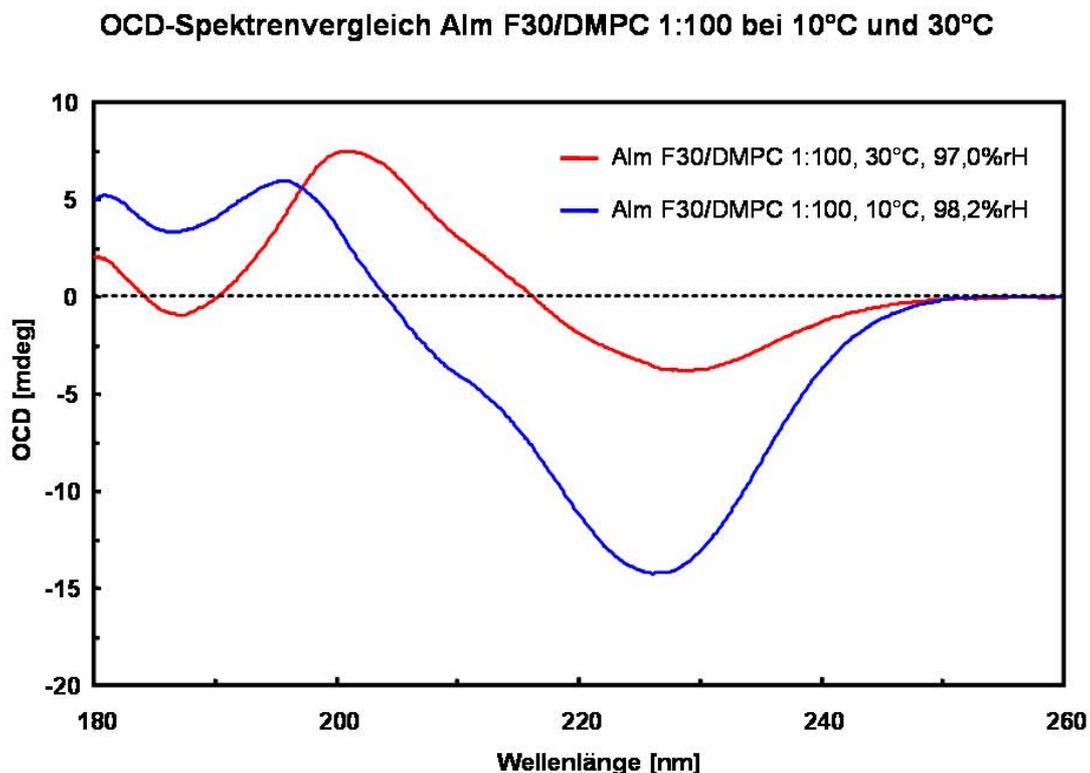


Abbildung 4.17: OCD-Spektren von Alm F30 in DMPC in einem P/L=1:100 bei 10°C und 30°C

Die in Abbildung 4.18 gezeigten OCD-Spektren des an Position 10 fluoridierten Alm zeigen prinzipiell ähnliche Spektren wie die in Abbildung 4.17 dargestellten OCD-Spektren des Wildtyps Alm F30. Das bei 30°C aufgenommene Spektrum weist einen helikalen I-state auf. Allerdings ist eine deutlichere Verbreiterung des OCD-Signals zu beobachten, was auf eine erhöhte β -gefaltete Aggregation¹⁰¹ hindeutet. Bei 10°C zeigt das 10-(S)-TfmAla-Alm im Vergleich zum Wildtyp eine weniger ausgeprägtere Schräglage, da hier die Bande bei 208 nm stärker betont vorliegt.

Auffallend ist, dass die Intensität der negativen Banden des fluorierten Alm-Analogon nicht so ausgeprägt ausfallen, wie beim Alm F30. Ursache dafür können Streueffekte einer uneinheitlichen Probe sein. Generelle Differenzen in der Signalintensität können aufgrund unterschiedlicher absoluter Peptidkonzentration auftreten. Diese wurden jedoch nicht bestimmt.

OCD-Spektrenvergleich 10-(S)-TfmAla-Alm/DMPC 1:100 bei 10°C und 30°C

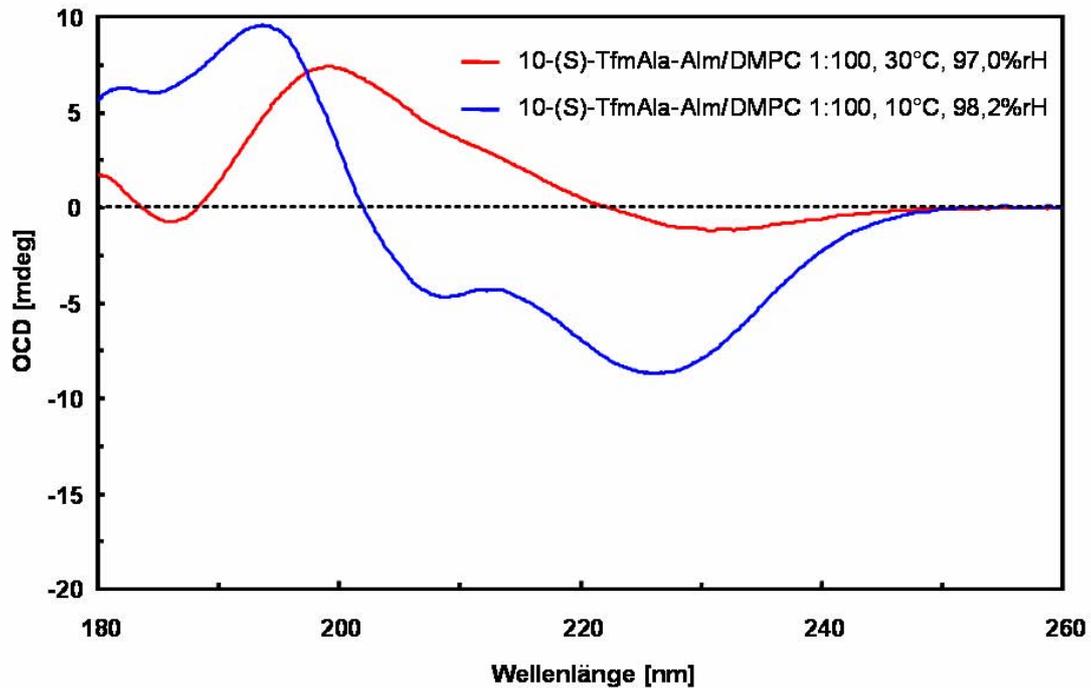


Abbildung 4.18: OCD-Spektren von 10-(S)-TfmAla-Alm in DMPC in einem P/L=1:100 bei 10°C und 30°C.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erhaltenen OCD-Spektren oberhalb der Phasenübergangstemperatur bei 30°C des verwendeten Phospholipids DMPC unter den experimentellen Bedingungen sehr ähnlich sind. Beide Peptide, das Alm F30 und das 10-(S)-TfmAla-Alm, nehmen somit die gleiche Orientierung in der flüssigkristallinen Lipidmembran ein. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur, im so genannten Gelzustand, nehmen die beiden Peptide generell eine ähnliche Orientierung in der Lipidmembran ein. Die Schräglage des fluorierten Analogons unterscheidet sich jedoch vom Wildtyp.

Damit wurde durch eine komplementäre Methode die Ergebnisse der ^{19}F -Festkörper-NMR bestätigt.

5 Diskussion

5.1 Synthese der ¹⁹F-markierten Alamethicin-Derivate

Zur Strukturanalyse des membranaktiven Peptaibols Alm mittels ¹⁹F-Festkörper-NMR in Lipiddoppelschichten wurden erfolgreich sechs Alm-Analoga, markiert mit einer Trifluormethylgruppe, und der Wildtyp durch Kombination von Synthese in Lösung, sequenzieller SPPS und Fragmentkondensation an fester Phase manuell durchgeführt.

Zuerst musste die Fluor-Sonde, das als Razemat vorliegende TfmAla, aufgrund seiner Reaktionsträgheit, jeweils am C- und N-Terminus von den entsprechenden Aminosäuren über Peptidsynthese in Lösung flankiert werden. Die Bildung einer Peptidbindung macht sich auf der Stufe des Aufbaus zum Tripeptid **3a-c** durch eine sehr lange Reaktionszeit (3-5 Tage) bemerkbar. Die Tripeptide konnten, trotz der Reaktionsträgheit und hohen sterischen Anspruch des TfmAla, in hohen Ausbeuten dargestellt werden. Dass die erhaltenen Tripeptide über Säulenchromatographie mit Kieselgel als stationäre Phase in ihre Epimere aufgetrennt werden konnten, weist auf einen starken Einfluss des (*R*)- bzw. (*S*)-TfmAla auf die Polarität des Tripeptids hin.

Eine notwendige Identifikation der Stereochemie des TfmAla in den Tripeptidepimeren konnte durch saure Hydrolyse und anschließender RP-HPLC mit einer chiralen mobilen Phase als Eluent anhand geeigneter Referenzsubstanzen⁷⁴ sehr einfach durchgeführt werden. Dieser Ansatz zur Bestimmung der Stereochemie von TfmAla wird hier erstmalig präsentiert.

Die empirische Feststellung, dass alle während der Säulenchromatographie zuerst eluierenden Tripeptidepimere die Aminosäure TfmAla in (*S*)-Konfiguration enthalten, scheint eine Tendenz zu sein, welche auch in anderen, analogen Tripeptiden beobachtet¹⁰² wurde. Auch das entsprechende ¹⁹F-NMR-Signal der (*S*)-Analoga weist immer eine Tieffeldverschiebung bezüglich der (*R*)-konfigurierten Komponente auf. Dies könnte Grundlage für eine einfachere Bestimmung der absoluten Konfiguration einer eingebauten TfmAla-Aminosäure in Peptide aller Art sein.

Der sequenzielle Aufbau des kompletten Peptids sowie die Fragmentkondensation der fluorierten Tripeptide gestaltete sich unter Verwendung des Aktivierungsreagenzes HATU als erfolgreich. Die verwendeten längeren Reaktionszeiten (6h) sind der ungewöhnlich hohen Anzahl der sterisch gehinderten Aminosäure Aib im Alm und der Fragmentkondensation des Tripeptids geschuldet.

Literaturbekannte Synthesen anderer Alm und modifizierte Analoga unter Verwendung ähnlicher Aktivierungsreagenzien an fester Phase und in Lösung bestätigen diese Beobachtung^{85, 103, 104}.

Die Abspaltung der synthetisierten Alm-Derivate vom unlöslichen polymeren Träger und deren Aufreinigung mittels semipräparativer RP-HPLC an einer C18-Säule resultierten in Ausbeuten der Peptide von 20-30%, welche für schwierige Sequenzen wie die des Alm nicht unüblich sind^{103, 105}. Die Charakterisierung und Bestimmung der Reinheit der erhaltenen Alm-Derivate erfolgte mittels ¹⁹F-NMR, MALDI-TOF Massenspektrometrie und analytischer RP-HPLC, welche eine Reinheit >95% ergaben.

Damit wurde eine erfolgreiche Synthesestrategie zur Darstellung von trifluormarkiertem Alm etabliert. Diese Methode der Synthese wurde auch für ein kürzeres Peptaibol (dem Harzianin) angewendet¹⁰². Es gelang auch hier eine erfolgreiche Inkorporation der Aminosäure TfmAla anstelle von Aib nach der gleichen Methode.

5.2 Einfluss der Trifluormethylgruppe auf Funktion und Topologie

Aussagekräftige Ergebnisse über die Struktur des Alm in Membranen können nur erhalten werden, wenn die synthetisierten Analoga die Funktion und globale Struktur des Wildtyps beibehalten.

Zu diesem Zweck sind einerseits funktionelle Tests wie Vergleich der hämolytischen Aktivität auf menschliche Erythrozyten und antimikrobielle Wirkung auf verschiedene Bakterienstämme durchgeführt worden. Dabei wird in beiden Fällen keine Störung der Funktion der fluorierten Alm-Derivate aufgrund der Substitution eines Aib mit TfmAla unter den vorherrschenden Bedingungen beobachtet. Unterschiede in der minimalen Hemmkonzentration von Bakterien liegen innerhalb eines Verdünnungsschrittes und können somit vernachlässigt werden. Die hämolytischen Tests zeigen sogar eine gesteigerte Aktivität der fluorierten Alm-Analoga gegenüber der nativen Form. Vergleicht man jedoch beide Aktivitäten der negativ-geladenen (Glu an Position 18) Alm F30-Derivate mit dem neutral-geladenem (Gln an Position 18) Alm F50/5 (der Hauptbestandteil des kommerziell erhältlichen Alm der Firma Sigma-Aldrich™), wird ein großer Unterschied in der Wirkung deutlich. Dies muss, da

sonst keine Unterschiede in der Sekundärstruktur vorliegen, in Zusammenhang mit der Nettoladung der Peptide stehen.

Andererseits sind Untersuchungen zur Bestimmung der globalen Sekundärstruktur der Alm-Derivate mittels CD-Spektroskopie durchgeführt worden.

Die CD-spektroskopischen Untersuchungen wurden für alle Alm-Derivate unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die erhaltenen CD-Spektren weisen eine ähnliche bis identische Lage und Intensität der charakteristischen Banden auf und stimmen mit anderen CD-spektroskopischen Studien des Alm überein^{23, 103}. Auch die rechnergestützte Analyse der Sekundärstrukturanteile zeigt, dass die eingeführte Trifluormethylgruppe einen sehr geringen Einfluss auf die helikale Faltung des Peptids in Lösung ausübt. Die Abweichungen in den berechneten Anteilen können durch Unsicherheiten in der absoluten Peptidkonzentration aufgrund verschiedener Löslichkeiten hervorgerufen werden.

Diese Ergebnisse rechtfertigen die Aussage, dass eine genauere Untersuchung der Struktur und Dynamik der fluorierten Alm-Derivate und deren Ergebnisse auf den Wildtyp übertragen werden können.

5.3 ¹⁹F-Festkörper-NMR

Zur detaillierten Untersuchung der Struktur des Alm wurden alle 6 synthetisierten TfmAla-Alm-Derivate mittels ¹⁹F-Festkörper-NMR vermessen. Für diese Messungen war es notwendig, die Peptide in Phospholipiddoppelschichten zu rekonstituieren und mechanisch zu orientieren. Kontrollmessungen mittels ³¹P-Festkörper-NMR zeigen, dass die Qualität der hergestellten NMR-Proben einen hohen Grad an uniaxialer Orientierung des Lipids aufweisen und somit eine Bestimmung der NMR-Strukturparameter durch Ermittlung der dipolaren Kopplung der Trifluormethylgruppe ermöglichen.

Die gewählten Bedingungen sowie die zur Berechnung der Struktur eingehenden Modelle sind nach folgenden, in der Literatur diskutierten, Beobachtungen gewählt worden:

- In welcher Sekundärstruktur und Orientierung bildet das Alm eine Pore aus?

Hier wurden bisher unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht. MD-Simulationen ergaben eine aufrechtstehende, durchgehende α -helikale Struktur des Alm in der Pore⁴³. Daten aus ¹⁵N-Festkörper-NMR Studien⁴⁷ bei einem hohen P/L-Verhältnis von 1/8 in DMPC-Lipidmembranen ergaben zwei mögliche Modelle des Alm-Kanals.

Dabei kann das Peptaibol entweder eine durchgehende, leicht geneigte α -Helix (Abbildung 5.1-A) annehmen oder das Alm weist in Analogie zur Kristallstruktur einen Knick auf (Abbildung 5.1-B).

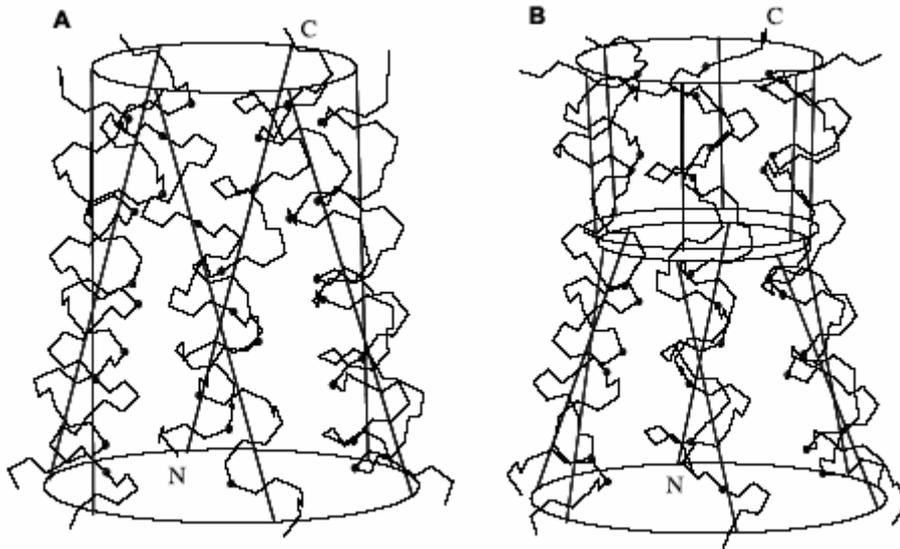


Abbildung 5.1: Strukturmodelle eines hexameren Alm-Ionen-Kanal. Die MD-generierten Modelle basieren auf ^{15}N -Festkörper-NMR-Daten. A: geneigte durchgehende α -Helix und B: geknickte und geneigte helikale Struktur (übernommen von⁴⁷).

Bemerkenswerterweise sind andere ^{15}N -Festkörper-NMR-Untersuchungen⁴⁶ bei hohem P/L-Verhältnis wiederum konsistent mit einer parallelen Orientierung einer α -Helix zur Membrannormalen. Weiterhin wird für die mittleren Bereiche des Alm eine 3_{10} -Helix aufgrund der hohen Aib-Anteile^{18, 106} diskutiert. Die Kristallstruktur¹⁶ zeigt auch für das C-terminale Ende des Alm einen 3_{10} -helikalen Anteil. Es soll diesbezüglich darauf hingewiesen werden, dass die Unterschiede zwischen einer 3_{10} -Helix und einer α -Helix in den Ramachandran-Winkeln φ und ψ nur minimal¹⁰⁷ sind und die Energiedifferenz zwischen den beiden Sekundärstrukturen klein¹⁷.

Aus diesem Grund sind für die Strukturanpassung in der vorliegenden Arbeit eine durchgehende 3_{10} -Helix, eine α -Helix und die Kristallstruktur als Modelle eingegangen, um jede bekannte Situation des Peptids plausibel beleuchten zu können.

Die Auswertung der NMR-Messungen in DMPC als Lipid bei hoher P/L=1:10 weisen nur auf eine Kompatibilität mit einer durchgehenden, rechtshändigen α -Helix für den N-terminalen Bereich (Position 5 und 10) des Alm hin. Sobald die gemessen

Aufspaltungen der an Position 16 markierten Alm-Derivate in die Strukturanpassung miteinfließen, lieferte die Fehleranpassungsfunktion χ^2 ungenügende Werte. Auch die Strukturanpassung einer 3_{10} -Helix und der bekannten Kristallstruktur ist nicht mit den beobachteten Einschränkungen vereinbar. Demzufolge ergibt die durchgeführte Analyse, dass der N-Terminus des Alm als α -Helix mit einem Kippwinkel der Helixachse von $\tau=8^\circ$ in der DMPC-Lipidmembran vorliegt. Der Rotationswinkel ρ wird mit einem Wert von 82° berechnet, wobei dieser Wert nur ein Minimum innerhalb eines größeren Bereiches für befriedigende Lösungen darstellt (siehe Abbildung 5.2) und hat deshalb aufgrund geometrischer Aspekte wenig Bedeutung.

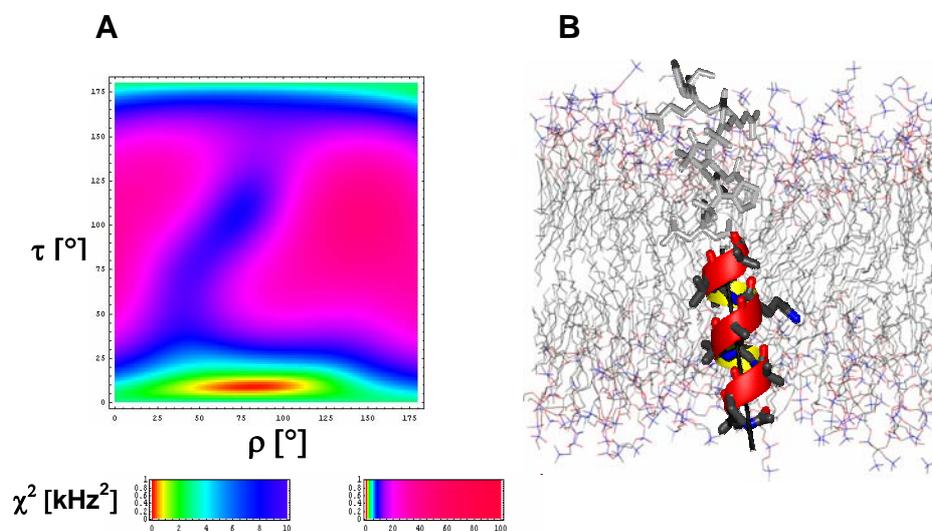


Abbildung 5.2: τ , ρ -Plot für alle im Raum möglichen τ - und ρ -Werte (A) mit der sich ergebenden Struktur des Alm-Moleküls als α -Helix (B) mit $\tau=8^\circ$ der Helixachse zur Membrannormalen in einer simulierten DMPC-Membran (Tielemann et al.) eingebettet. Der Bereich des Alm, welcher nicht in die Berechnung der NMR-Parameter einfließt, ist in hellgrau dargestellt.

Dieses Ergebnis stimmt mit dem Bild einer leicht geneigten Orientierung des Alm zur Membrannormalen der DMPC-Doppelschicht bei hoher Peptidkonzentration überein.

- Ist eine konzentrationsabhängige Uorientierung zu beobachten?

Die durchgeführten Konzentrationsmessungen in dem P/L-Verhältnis von 1:10 bis 1:1000 in DMPC als Modellmembran zeigen, je nach gemessenen fluorierten Alm-Analoga, mit abnehmender Peptidkonzentration Unterschiede in der Dipolkopplung. Die Aufspaltung der an Position 5 und 10 markierten Derivate bleibt über den gesamten Bereich (soweit bestimmbar) mehr oder weniger konstant. Dies wird auch in der Berechnung der Orientierungsparameter für diese Positionen deutlich (siehe Tabelle 4.7). Werden die für Position 16 vorhandenen Dipolkopplungen in die Berechnungen miteinbezogen, so zeigen diese (wie im vorherigen Abschnitt

dargestellt) keine Vereinbarkeit mit den zugrunde gelegten Strukturmodellen. Als Resultat ergeben sich die über alle Konzentrationen gemittelten Orientierungsparameter $\tau=8^\circ$ und $\rho=80^\circ$.

Damit wurde erstmalig, insbesondere für geringe Peptidkonzentrationen bis $P/L=1:1000$, für den N-terminalen Bereich des Alamethicin eine transmembrane Orientierung beobachtet. Diese Orientierung ist gleichbedeutend mit einem I-state des Peptids. Die kompatible Struktur hierzu ist wiederum eine α -Helix (siehe Abbildung 5.2). Es muss in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass die Beobachtung einer konzentrationsunabhängigen Orientierung des N-Terminus des Alm in DMPC-Lipidmembranen keine angelegte Spannung vorlag.

Dieses Ergebnis steht in erheblichen Widerspruch zu den von Huang et al. veröffentlichten Arbeiten zu OCD-spektroskopischen Studien des Alm in DPhPC-Membranen^{33, 36, 37}, welche bei niedrigeren Peptidkonzentrationen als $P/L=ca.1:100$ von einem S-state berichten. Erst bei sukzessiver Erhöhung der Peptidkonzentration über einen kritischen Wert insertiert das Alm in die dort verwendete DPhPC-Membran.

Das erhaltene Ergebnis wirft zudem, innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches der Alm-Derivate, ein anderes Licht auf den Prozess der Anlagerung des membranaktiven Alm an eine Membran. Die berichtete Vorstellung, das sich das Peptid gemäß seiner amphiphilen Natur flach an der Membran anlagert bevor es insertiert, steht ebenfalls in Widerspruch zu den gemachten Beobachtungen.

Das erhaltene Ergebnis steht aber in Einklang mit einem Modell, welches auf Resultaten aus EPR-Messungen¹⁰⁸ an selektiv markierten Alm-Analoga in Micellen für hohe Peptidkonzentrationen basiert (siehe Abbildung 5.3).

Das wesentliche in dieser Modellvorstellung ist, dass bei Abwesenheit einer elektrischen Spannung das monomere Alm ebenfalls mit seinem N-Terminus in der Membran gebunden ist. Die hydrophilen Seitenketten wie Gln7 und Glu18 sollen mit den geladenen Kopfgruppen des Lipids in Kontakt stehen und die „bent form“ stabilisieren.

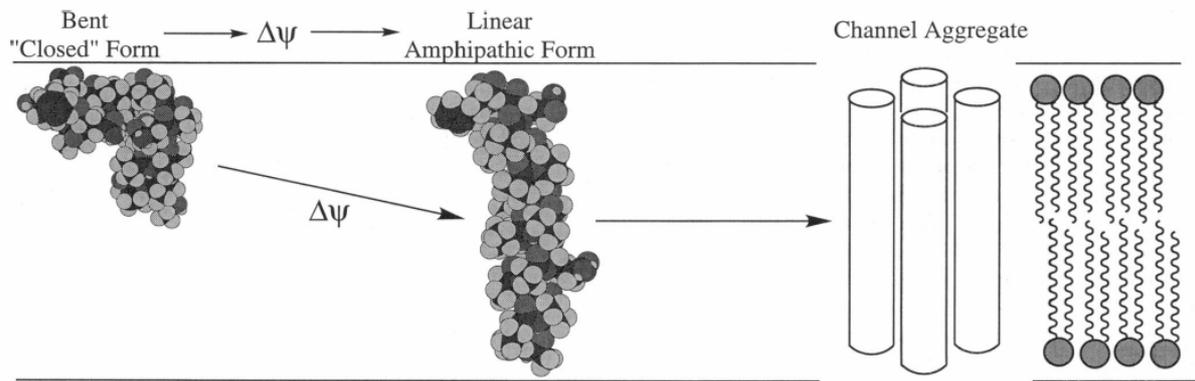


Abbildung 5.3: Vorgeschlagenes Modell einer spannungsinduzierten Insertierung des Alm in die Membran und anschließende Ausbildung einer Pore (übernommen von⁴⁶).

Erst ein Anlegen eines elektrischen Feldes linearisiert das Peptid, welches dann aufgrund Oligomerisierung mit anderen Monomeren Kanäle ausbildet. Die Orientierung des N-Terminus in diesem Modell ändert sich nicht und wäre somit mit den in vorliegender Arbeit demonstrierten Beobachtungen konsistent.

Betrachtet man die erhaltenen Ergebnisse der Konzentrationsunabhängigkeit unter dynamischen Gesichtspunkten, gelangt man für den N-Terminus zu folgenden Aussagen. Der hohe Wert des Ordnungsparameters S_{mol} weist auf ein rigides, anisotropes System hin. Weiterhin bestätigen die vertikal aufgenommenen Festkörper-NMR-Spektren (Halbierung der dipolaren Kopplung und Spiegelung um die isotrope Position) eine Rotationsdiffusion des Peptids um die Membrannormale des Lipids DMPC. Für hohe Peptidkonzentrationen bedeutet dies, dass die Oligomere (der Kanal) eine Rotationsfreiheit um eine gemeinsame Achse parallel zur Membrannormalen besitzen. Die einzelnen Monomere innerhalb des Oligomers verfügen aber keinerlei isotrope Ausmittlung und sitzen sehr stabil in der ausgebildeten Anordnung. Ob dieses Oligomer ein Kanal ist, kann mittels der verwendeten Methode nicht bestimmt werden, für den Fall einer hohen Peptidkonzentration wird dies allerdings in der Literatur aufgrund biophysikalischer Messungen³⁴ diskutiert. Hier muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass diese Messungen immer in Anwesenheit einer angelegten Spannung durchgeführt wurden. Hinsichtlich der Dynamik bei geringen Peptidkonzentrationen (Bereich bis P/L=1:1000) in der DMPC-Lipidmembran verhält sich das Alm identisch. Somit konnte die hohe Sensitivität der Fluoratome ausgenutzt werden, die Orientierung des Alm-N-Terminus für sehr geringe Konzentrationen zu bestimmen. Eine solche Beobachtung wurde bisher für den N-terminalen Bereich nicht gemacht und wird in

dieser Arbeit erstmalig demonstriert. So muss angenommen werden, dass selbst die Monomere sehr stabil in einer Membran vorliegen und eine diskrete Orientierung einnehmen. Ob dieses Ergebnis eventuell auch Ursache einer Einführung der lipophiliesteigernden Trifluormethylgruppe ist, kann nicht ausgeschlossen werden.

- Hat die Lipidzusammensetzung einen Einfluss auf die Orientierung?

Hierfür wurden aufgrund der gefundenen Konzentrationsunabhängigkeit bisher nur Proben in einem P/L-Verhältnis von 1:100 für zwei Arten von Modellmembranen gemessen (Kapitel 4.6.2.2). Diese sollen jeweils die Situation einer eukaryotischen und einer prokaryotischen Modellmembran simulieren. Die berechneten Orientierungsparameter (siehe Tabelle 4.8) ergeben identische Lösungen verglichen mit der einfachen zwitterionischen Modellmembran DMPC im flüssigkristallinen Zustand. Die vorher diskutierten Ergebnisse und Folgerungen lassen sich somit auf die beiden Systeme DMPC/Cholesterol und DMPG/POPE übertragen. Das bedeutet, dass weder eine netto negativgeladene Membran (DMPG) noch das als Membranstabilisator fungierende Cholesterol⁶ einen Einfluss auf die Orientierung des Alm in diesen Lipidmembranen unter den experimentellen Bedingungen ausüben.

- Welchen Einfluss hat die Temperatur, und damit die Lipidphase, auf die Orientierung des Alm in Lipidmodellmembranen?

Zu diesem Zweck wurden Temperaturserien im Bereich von 10°C-35°C dreier Proben, nämlich pures DMPC, DMPC/Cholesterol (8/2) und DMPG/POPE (7/3) in einem P/L-Verhältnis von 1:100 mittels ¹⁹F-Festkörper-NMR aufgenommen. Die erhaltenen Dipolkopplungen und berechneten Strukturparametern (hier für 15°C) für niedrige Temperaturen zeigen für zwei Fälle eine erhebliche bzw. leichte Umorientierung des N-Terminus des Alm. Auch hier gilt, dass passende Lösungen nur für den N-Terminus des Alm erhalten wurden.

Für die Modellmembran DMPC im Gelzustand wird ein Kippwinkel einer α -Helix von ca. 70° bezüglich der Membrannormalen berechnet. Der Rotationswinkel ρ bezüglich der Helixachse nimmt einen diskreten Wert um ca. 170° an. Dieser Rotationswinkel stellt eine plausible Lösung für einen S-state dar, da die (wie in Abbildung 5.4 dargestellt) hydrophilen Seitenketten zu den ebenfalls hydrophilen Kopfgruppen der DMPC-Modellmembran oder in die wässrige Phase hinweisen¹⁰⁹.

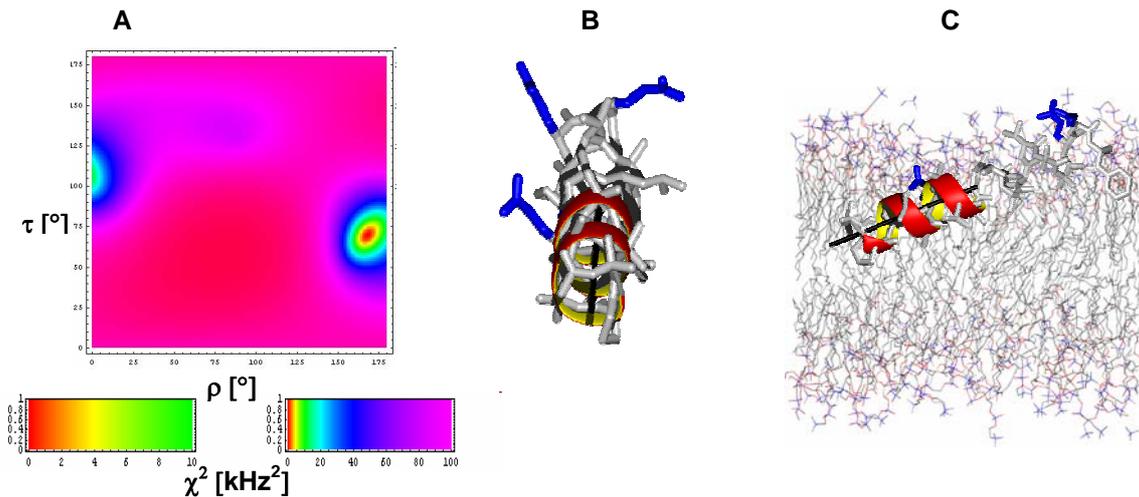


Abbildung 5.4: τ , ρ -Plot für alle im Raum möglichen τ - und ρ -Werte (A) mit der sich ergebenden Struktur des Alm-Moleküls als α -Helix, vom N-Terminus aus gesehen (B) mit $\tau=70^\circ$ und $\rho=170^\circ$. Man kann erkennen, dass die hydrophilen Seitenketten (blau hervorgehoben) in Richtung der DMPC-Membranoberfläche reichen (C).

Damit wurde erstmalig via ^{19}F -Festkörper-NMR eine Umorientierung des N-Terminus zur Membranoberfläche des Alm nachgewiesen. Dass eine generelle Umorientierung unterhalb der Phasenübergangstemperatur für DMPC stattfindet, wurde schon von Vogel et al.²³ qualitativ mittels CD-Spektroskopie beobachtet. Der Ordnungsparameter S_{mol} verändert sich mit einer Temperaturerniedrigung nur marginal, d. h. auch in diesem Fall liegt eine diskrete Orientierung des N-Terminus des Alm vor. Interessanterweise ergeben die vertikal gemessenen Proben keine Rotation um die Membrannormale. Diese Beobachtung könnte anhand der Eigenschaften des Lipids unterhalb des Phasenübergangs (Gelzustand) erklärt werden. Dabei liegt das Lipid in einer hochgeordneten, dicht gepackten Konstitution vor, die laterale Beweglichkeit der einzelnen Lipidmoleküle ist stark eingeschränkt. Möglicherweise ist es energetisch gesehen unvorteilhaft, ein insertiertes Alm in der geordneten Lipidmolekülmatrix anzuordnen. Das Alm lagert sich dann gemäß seiner amphipatischen Natur an der Membranoberfläche an (siehe Abbildung 5.4).

Im Gelzustand des Lipidsystem DMPG/POPE findet nur eine marginale Umorientierung des Alm statt, das Peptid befindet sich im I-state. Eine Rotation um die Membrannormale wird ebenfalls nicht beobachtet, allerdings ist aufgrund des Wertes des Ordnungsparameters $S_{\text{mol}}=0,64$ auf eine erhöhte isotrope Beweglichkeit des Alm zu schließen. Diese Beobachtungen stehen bezüglich der Ergebnisse des simplen Membranmodells DMPC in erheblichem Widerspruch. Hier kann entweder die netto negativ-geladene Kopfgruppe des DMPG oder das konisch geformte Lipid POPE⁶ Einfluss auf die Orientierung des Alm nehmen. Welche Eigenschaft der

Lipide die beobachtete Orientierung des N-Terminus des Alm dominiert, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt.

Die berechneten Orientierungsstrukturparameter des Alm, rekonstituiert in DMPC/Cholesterol, ergeben für eine α -Helix keine befriedigende Strukturanpassung. Die Fehlerfunktion χ^2 für eine 3_{10} -Helix des N-terminalen Bereiches gibt zwar eine sehr gute Lösung, die entsprechenden Parameter erscheinen aber nicht plausibel, da der Winkel ρ die hydrophile Domäne des Alm in den hydrophoben Bereich der Lipidmembran hineinzwingen würde. Zudem erscheint der Wert für $S_{mol} > 1$ nicht plausibel.

In wieweit experimentelle Fehler für eine unzureichende Bestimmung der Orientierungsparameter verantwortlich sind, oder ob hier eine Phasenseparation des heterogenen Lipidsystems vorliegt, konnte bisher nicht bestimmt werden. Deswegen soll zu diesem Lipidsystem keine weiteren Aussagen getroffen werden.

5.4 CD-Spektroskopie

Ein Vergleich der aufgenommenen OCD-Spektren von Alm F30 mit einem fluorierten Alm-Analogon soll ebenfalls die Erhaltung der Struktur des Alm sowie dessen analoges Verhalten in einer DMPC-Lipidmembran dokumentieren. Insbesondere sollte durch eine zweite, komplementäre Methode die temperaturabhängige Umorientierung in DMPC als Modellmembran bestätigt werden.

Das gemessene Spektrum des rekonstituierten 10-(S)-TfmAla-Alm oberhalb der Lipidphasenübergangstemperatur ergibt dieselbe Orientierung (I-state) einer Helix zum zirkular eingestrahlt Licht wie der synthetisierte Wildtyp. Die Form des Spektrums sowie die Lage der Banden des Wildtyps stimmen mit den in der Literatur bekannten Spektren überein³⁷. Eine tendenzielle Verbreiterung des OCD-Spektrums des 10-(S)-TfmAla-Alm könnte auf einen beta-aggregierten Anteil hindeuten. Ob dies die Folge einer Einführung der fluorierten Aminosäure oder experimentelle Ungenauigkeiten durch Streueffekte war, konnte nicht bestimmt werden. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur zeigen beide Peptide eine leicht unterschiedliche Orientierung, jedoch für einen T-state typische Spektren. Dieses Phänomen der Umorientierung aus einer transmembranen in eine anders geartete Orientierung der Helix mit Abnahme der Temperatur wurde ebenfalls von Vogel et al.²³ mittels CD-Spektroskopie des Alm in DTPC-Lipiddoppelschichten beobachtet.

6 Ausblick

Insgesamt haben die Untersuchungen der Struktur und Orientierung des Alm in Lipidmodellmembranen verlässliche Ergebnisse geliefert. In der Literatur bekannte Ergebnisse bezüglich der Struktur des N-Terminus des Alm konnten nur teilweise bestätigt werden.

Die angewandten Strukturmodelle (α -Helix und 3_{10} -Helix) sind jedoch nicht mit dem C-terminalen Ende des Peptids vereinbar, weswegen eine weitere, einschränkende Markierung notwendig ist (Position 17), um diesen Bereich besser zu charakterisieren.

Die vorhandenen ^{19}F - ^{19}F -Dipolkopplungen sollen auch als einschränkende Parameter in eine MD-Simulation eingehen, um erste Einblicke in die möglichen Strukturen des gesamten Alamethicin zu gewährleisten.

Weiterhin bedürfen die Ergebnisse, die für Biomembranen in der Gelphase erhalten wurden (speziell das DMPC/Cholesterol-Lipidsystem), weitere NMR-Untersuchungen. Dynamische Differenzkalorimetrie werden in diesem Fall genauere Einblicke über die Phasenveränderung der Lipide und somit deren thermodynamisches Verhalten geben.

Eine weitere Möglichkeit, den Kanal des Alm zu charakterisieren, besteht in der Einführung einzelner Fluoratome und der anschließenden Abstandsmessung durch deren dipolare Kopplung⁴⁸.

Abschließend kann die in dieser Arbeit demonstrierte erfolgreiche Synthesemethodik auf andere, kürzere Peptaibole übertragen werden, um eventuelle Unterschiede oder Gemeinsamkeiten des Mechanismus der Kanalbildung via ^{19}F -Festkörper-NMR zu untersuchen.

7 Zusammenfassung

Das membranaktive Peptaibol Alamethicin stellt eines der meistuntersuchten Ionophore dar. Es ist in der Lage, Ionenkanäle in Zellmembranen auszubilden und somit die Zellen zu permeabilisieren. Die hiermit verbundenen molekularen Aspekte dieses Vorgangs, der Mechanismus der Ausbildung dieses Kanals ist im Detail jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der hohen Sensitivität der ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie die Sekundärstruktur und Dynamik des Peptaibols Alamethicin in seiner biologisch relevanten Umgebung zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde eine erfolgreiche Synthesestrategie zur selektiven Fluormarkierung des Alamethicin entwickelt und etabliert. Die im Alamethicin häufig vorkommende α,α -dialkylierte Aminosäure Aib wurde durch die trifluorierte analoge Aminosäure TfmAla an verschiedenen Positionen ersetzt. Dabei gelang die Darstellung von sechs Alamethicin-Analoga über eine Kombination von Peptidsynthese in Lösung und an fester Phase. Die in Zwischenschritten auftretenden Epimere konnten getrennt und die Stereochemie eindeutig über RP-HPLC in chiraler mobiler Phase erfolgreich zugeordnet werden. Die somit hergestellten fluorierten Alamethicine zeigten, verglichen mit der nativen Verbindung, in CD-spektroskopischen und funktionellen Untersuchungen keine Störung in der Sekundärstruktur und Wirkung.

Zur detaillierten dreidimensionalen Strukturaufklärung wurden die Alamethicin-Derivate mittels ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie in flüssigkristallinen Lipidmembranen vermessen. Dabei ergab die Strukturanalyse eine transmembrane Orientierung der N-terminalen α -Helix mit einem Kippwinkel von 8° als Sekundärstrukturelement. Weiterhin wurde eine bis dahin nicht bekannte Konzentrationsunabhängigkeit der stabilen transmembranen Orientierung des Alamethicin demonstriert. Im Gelzustand der Membran konnte eine Orientierungsabhängigkeit von der Zusammensetzung der membranbildenden Lipide beobachtet werden. Während in zwitterionischen Phospholipiden (Modell für eine Eukaryotenmembran) eine Umlagerung der N-terminalen α -Helix zur Membranoberfläche stattfindet, verbleibt der N-Terminus des Peptids in negativ geladenen Membranen (Modell für eine Prokaryoten-membran) in einer transmembranen Orientierung.

Diese neuen Aspekte können als Grundlage für weitere funktionelle Untersuchungen dienen, um die Auswirkung des Alamethicin auf die Zellmembran besser zu verstehen.

8 Experimenteller Teil

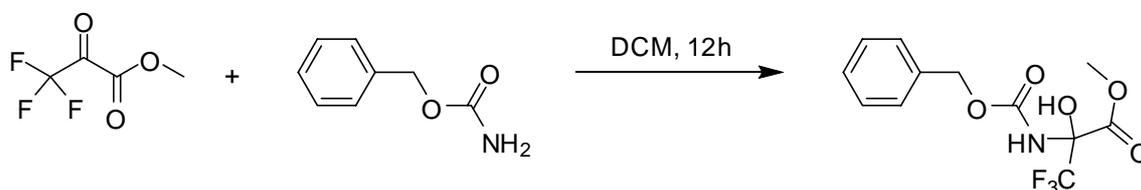
Alle chemischen Verschiebungen beziehen sich für im Falle der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie auf Trimethylsilan, im Falle der $^{19}\text{F-NMR}$ -Spektroskopie auf Trifluoressigsäure.

8.1 Synthese des *Z-TfmAla-OH*

Die Synthese ist in der Literatur beschrieben und wurde ohne Modifikation übernommen^{82, 110}.

8.1.1 2-Benzyloxycarbonylamino-3,3,3-trifluor-2-hydroxypropionsäuremethylester

10,51 g Benzylcarbammat (70 mmol) wird in möglichst wenig Dichlormethan gelöst. Unter Rühren werden 10,92 g Trifluorbrenztraubensäuremethylester (70 mmol) langsam zugetropft und anschließend 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt fällt analysenrein aus (Ausbeute: 86%, Smp.: 136-138°C).

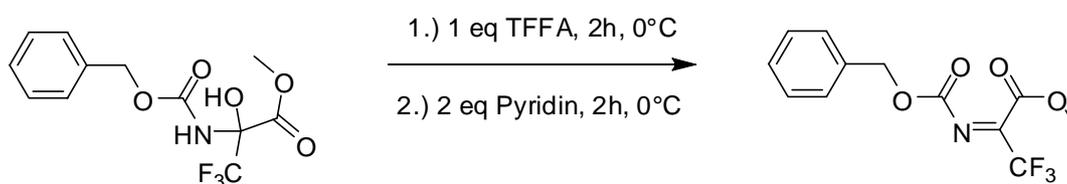


$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 3,76$ (s, CH_3); $5,04$ (*m*, CH_2^Z), $5,50$ (s, NH), $7,27$ (s, aromatisch^Z), $7,78$ (s, OH)

8.1.2 2-Benzyloxycarbonylimino-3,3,3-trifluorpropionsäuremethylester

18,43 g 2-Benzyloxycarbonylamino-3,3,3-trifluor-2-hydroxypropionsäuremethylester (60 mmol) werden in 300 ml wasserfreiem Diethylether gelöst und im Verlaufe einer Stunde bei 0°C unter intensivem Rühren 8,4 ml TFAA (60 mmol) zugegeben. Anschließend wird eine Stunde bei 0°C gerührt, danach werden 9,7 ml Pyridin (120 mmol) zugegeben und weitere zwei Stunden bei 0°C gerührt. Das ausgefallene Pyridiniumtrifluoracetat wird abfiltriert und der etherische Rückstand wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird mehrmals mit Petrolether extrahiert (insgesamt mit etwa 500 ml). Der Extrakt wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Es scheidet

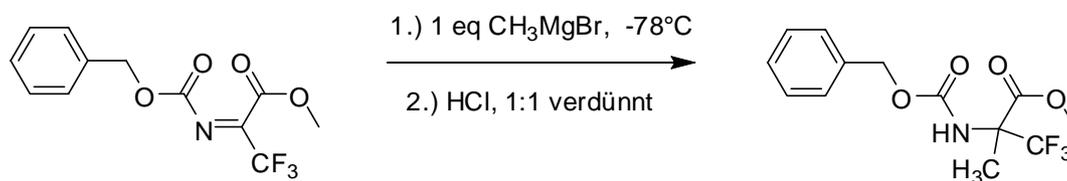
sich dadurch noch etwas mitextrahiertes Pyridiniumtrifluoracetat ab. Der Niederschlag wird erneut abgetrennt und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Es verbleibt ein blassgelbliches Öl, welches ohne weitere Aufreinigung zur weiteren Synthese eingesetzt werden kann (Ausbeute: 83%).



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 3,71$ (s, $\text{CH}_3^{\text{TfmAla}}$); $5,27$ (s, CH_2^{Z}); $7,26$ - $7,38$ (m, aromatisch $^{\text{Z}}$)

8.1.3 D/L-N-Benzyloxycarbonyl-2-trifluormethylaminosäuremethylester

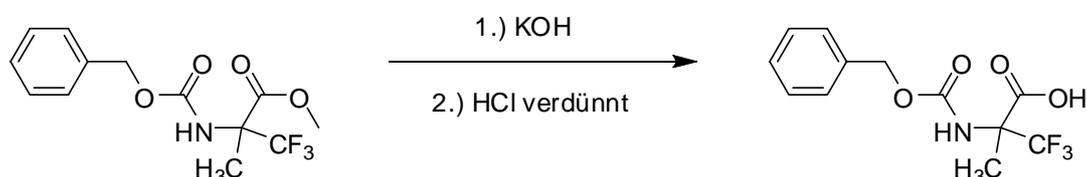
Zu 14,7 g -Benzyloxycarbonylimino-3,3,3-trifluorpropionsäuremethylester (51 mmol) in 200 ml wasserfreiem Diethylether wird unter Argon bei -78°C eine äquivalente Menge an Methylmagnesiumbromid (16,6 ml einer 3 molaren Lösung in Et_2O) getropft. Nach beendeter Zugabe wird das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt und mit eiskalter Salzsäure (1:1 verdünnt) hydrolysiert. Nach Phasentrennung wird die Wasserphase noch zweimal mit je 100 ml Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. (Ausbeute: 94% braunes Rohprodukt \rightarrow Kugelrohrdestillation ergibt 83% Reinprodukt: farbloses Öl, K_p 170°C , 0,29 mbar).



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 1,72$ (s, $\text{CH}_3^{\text{TfmAla}}$); $3,73$ (s, CH_3^{OMe}); $5,03$ (s, CH_2^{Z}); $5,47$ (s, $\text{NH}^{\text{TfmAla}}$); $7,25$ - $7,32$ (m, aromatisch $^{\text{Z}}$)

8.1.4 D/L-N-Benzoyloxycarbonyl-2-trifluormethylalanin

12,2 g D/L-N-Benzoyloxycarbonyl-2-trifluormethylaminosäuremethylester (40 mmol) werden in 100 ml 1N Kalilauge (wässrig) gegeben und anschließend portionsweise soviel MeOH hinzugefügt, bis sich der Ester vollständig gelöst hat (etwa 250 ml). Anschließend wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das MeOH wird im Vakuum abdestilliert, der wässrige Rückstand viermal mit je 75 ml Et₂O extrahiert und dann mit eiskalter verdünnter Salzsäure angesäuert. Die wässrige Phase wird erneut viermal mit Diethylether extrahiert, die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wird aus CHCl₃/Petrolether umkristallisiert. (Ausbeute: 73%, weißes Pulver)



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 1,74 (s, CH₃^{TfmAla}); 5,06 (s, CH₂^Z); 5,52 (s, NH^{TfmAla}); 7,27-7,30 (m, aromatisch^Z)

8.2 Synthese der markierten Di- und Tripeptide

8.2.1 Peptidkupplung über TCTU-Aktivierung (Methode A)

Zu 1 äq. Z-TfmAla-OH, gelöst in 15 ml DMF, werden 1 äq. TCTU und 1 äq. DIPEA gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 1,2 äq. der tBu-C-terminal geschützten Aminokomponente und 1,2 äq. DIPEA zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) wird das organische Lösemittel im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Lösung wird je 3mal mit 10%iger Zitronensäure, Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die organische Phase wird unter vermindertem Druck entfernt und das verbleibende Rohprodukt (Öl) wird weiter Säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt. Es ergibt sich der reine Feststoff 1a-c.

8.2.2 N-terminales Entschützen: Hydrogenolyse (Methode B)

Zu dem Z-geschützte Dipeptid 1a-c, in Methanol gelöst, werden 10% Pd/C gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht in einer H₂-Atmosphäre gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) wird die Reaktionslösung über *Celite*® abfiltriert, die organische Phase unter vermindertem Druck entfernt und im Hochvakuum vollkommen getrocknet. Das erhaltene Produkt 2a-c kann ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet werden.

8.2.3 Peptidkupplung über das asymmetrische Anhydrid (Methode C)

1,69 äq. der zu aktivierenden Fmoc-geschützten Aminosäure werden in trockenem THF unter Argonatmosphäre gelöst und auf -20°C gebracht. Dann werden 1,64 äq. NEM und 1,69 äq. CAIBE zugegeben und die Reaktionsmischung für 30 min bei derselben Temperatur gerührt. Anschließend wird Verbindung 2a-c, ebenfalls gelöst in trockenem THF, zur Reaktionslösung zugegeben und für weitere 3h bei -20°C gerührt. Danach wird die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur gebracht und bis zur vollständigen Umsetzung (3-5d) der Reaktion weiter gerührt, die Reaktionskontrolle erfolgt dabei über DC. Nach Beendigung der Reaktion wird das organische Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Lösung wird je 3mal mit 10%iger Zitronensäure, Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die organische Phase wird unter vermindertem Druck entfernt und das verbleibende Rohprodukt (Öl) wird weiter Säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt. Es ergibt sich der reine Feststoff 3a-c.

Im Falle der Verbindung 3b können hier schon die resultierenden Epimere auf der Kieselgelsäule aufgetrennt werden.

8.2.4 C-terminale Entschützen via TFA (Methode D)

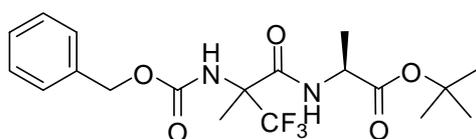
Die *t*Bu-C-terminal geschützten Tripeptide 3a-c werden in 50%TFA in DCM (v/v) gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die organischen Lösemittel werden unter vermindertem Druck entfernt, das verbleibende Öl wird in einer Mischung von Wasser und Acetonitril aufgenommen, eingefroren und lyophilisiert. Es

verbleibt ein weißes Pulver. Im Falle der Verbindungen 4a und 4c können die sich ergebenden Epimere mittels Säulenchromatographie aufgetrennt werden.

8.2.5 Fmoc-Ala-(R/S)-TfmAla-Ala-OH

8.2.5.1 Z-(R/S)-TfmAla-Ala-OtBu (1a)

Die Kupplung zu dem Dipeptid 1a wurde nach Methode A mit einer Ansatzgröße von 2,58 mmol durchgeführt. Das erhaltene Produkt fällt als weißer Feststoff an.



R_f-Wert: 0,45 (Ethylacetat/Petrolether=2/3)

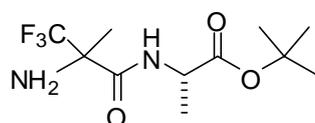
Ausbeute: 1,08 g (93%)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 1,35 (d, J=7,2 Hz, CH₃^{Ala}), 1,38 (d, J=7,2 Hz, CH₃^{Ala}-Diast.), 1,47 (s, tBu-CH₃), 1,87 (s, CH₃^{TfmAla}), 1,89 (s, CH₃^{TfmAla}-Diast.), 4,38-4,47 (m, α-CH^{Ala} beider Diast.), 5,08 (d, J=12,3 Hz, CH₂^Z-Gruppe), 5,13 (d, J=12,3 Hz, CH₂^Z-Gruppe-Diast.), 5,86 (s, NH^{TfmAla}), 5,90 (s, NH^{TfmAla}-Diast.), 6,70 (d, J=6,9 Hz, NH^{Ala}), 6,81 (d, J=6,9 Hz, NH^{Ala}-Diast.), 7,23-7,3 (m, aromatisch^Z).

¹⁹F-NMR (400MHz, CDCl₃): δ(ppm)= 1,43 (s, CF₃), 1,57 (s, CF₃-Diast.)

8.2.5.2 H-(R/S)-TfmAla-Ala-OtBu (2a)

Die hydrogenolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe erfolgte analog der beschriebenen Methode B in der Ansatzgröße 1,47 mmol.



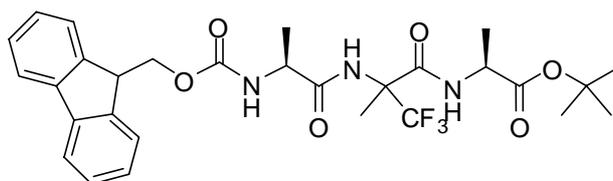
R_f-Wert: 0,35 (Ethylacetat/Petrolether=1/1)

Ausbeute: 0,40 g (95%)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	$\delta(\text{ppm}) = 1,36$ (<i>d</i> , $J=7,2$ Hz, CH_3^{Ala}), $1,39$ (<i>d</i> , $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_3^{\text{Ala-Diast.}}$), $1,46$ (<i>s</i> , <i>t</i> Bu- CH_3), $1,53$ (<i>s</i> , beide $\text{CH}_3^{\text{TfmAla}}$), $2,40$ (<i>s</i> , $\text{NH}_2^{\text{TfmAla}}$ beider Diast.), $4,38$ - $4,47$ (<i>m</i> , $\alpha\text{-CH}^{\text{Ala}}$ beider Diast.), $7,71$ (<i>s</i> , $\text{NH}^{\text{Ala-Diast.}}$).
$^{19}\text{F-NMR}$ (400MHz, CDCl_3):	$\delta(\text{ppm}) = -0,02$ (<i>s</i> , CF_3), $-0,25$ (<i>s</i> , $\text{CF}_3\text{-Diast.}$)

8.2.5.3 Fmoc-Ala-(R/S)-TfmAla-Ala-OtBu (3a)

Die Reaktion zum Tripeptid wurde gemäß der Methode C durchgeführt mit 2,24 mmol als Ansatzgröße durchgeführt. Das Ende der Reaktion wurde mittels DC-Kontrolle nach 3 d festgestellt. Nach der Aufreinigung über Säulenchromatographie an Kieselgel fällt das Tripeptid 3a als weißes Pulver an.

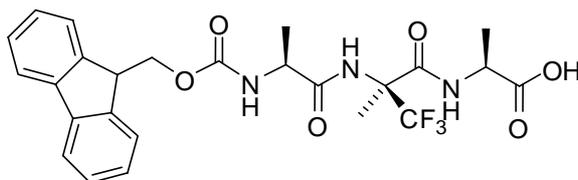


R _f -Wert:	0,18 (Ethylacetat/Petrolether = 2/3)
Ausbeute:	0,51 mg (63%)
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):	$\delta(\text{ppm}) = 1,35$ (<i>d</i> , $J=7,2$ Hz, CH_3^{Ala}), $1,38$ (<i>d</i> , $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_3^{\text{Ala-Diast.}}$), $1,44$ (<i>s</i> , $\text{CH}_3^{\text{TfmAla}}$, beide Diast), $1,45$ (<i>s</i> , <i>t</i> Bu- CH_3), $1,85$ (<i>s</i> , CH_3^{Ala}), $1,91$ (<i>s</i> , $\text{CH}_3^{\text{Ala-Diast.}}$), $4,19$ - $4,24$ (<i>m</i> , CH^{Fmoc} , CH^{Ala}), $4,38$ - $4,45$ (<i>m</i> , $\text{CH}_2^{\text{Fmoc}}$, CH^{Ala}), $5,29$ (<i>m</i> , NH^{Ala}), $6,85$ (<i>m</i> , NH^{Ala}), $7,08$ (<i>m</i> , $\text{NH}^{\text{TfmAla}}$), $7,29$ - $7,78$ (<i>m</i> , aromatisch CH^{Fmoc}).
$^{19}\text{F-NMR}$: (CDCl_3):	$\delta(\text{ppm}) = 2,13$ (<i>s</i> , CF_3), $1,78$ (<i>s</i> , $\text{CF}_3\text{-Diast.}$)
FAB-MS:	berechnet: 778,59 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 778,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$

8.2.5.4 Fmoc-Ala-(R/S)-TfmAla-Ala-OH (4a)

Die C-terminale Schutzgruppe wurde nach Methode D durchgeführt. Das Produkt konnte anschließend über Säulenchromatographie in seine beiden Epimere getrennt werden.

Verbindung 4a-1



R_f-Wert: 0,44 (Ethylacetat/Hexan)=2/1 + 5%Vol. Essigsäure)

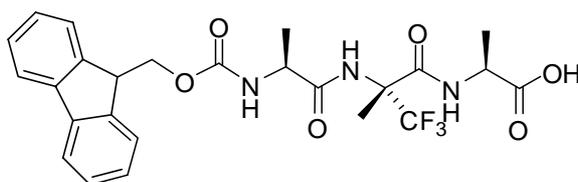
Ausbeute: 0,17 mg (39%)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) = 1,19 (dd, J=7,2 Hz, CH₃^{Ala}), 1,62 (s, CH₃^{TfmAla}), 4,14-4,24 (m, CH^{Fmoc}, CH^{Ala}), 4,25-4,32 (m, CH₂^{Fmoc}, CH^{Ala}), 7,29-7,78 (m, aromatisch CH^{Fmoc}, 2NH^{Ala}), 8,89 (m, NH^{TfmAla}).

¹⁹F-NMR: (CDCl₃): δ(ppm) = 0,20 (s, CF₃)

FAB-MS: berechnet: 522,49 [M+H]⁺, gefunden: 522,2 [M+H]⁺

Verbindung 4a-2



R_f-Wert: 0,35 (Ethylacetat/Hexan)=2/1 + 5%Vol. Essigsäure)

Ausbeute: 0,51 mg (60%)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) = 1,19 (dd, J=7,2 Hz, CH₃^{Ala}), 1,58 (s, CH₃^{TfmAla}), 3,93-4,08 (m, CH^{Fmoc}, CH^{Ala}), 4,18-4,30 (m, CH₂^{Fmoc}, CH^{Ala}), 7,28-7,90 (m, aromatisch CH^{Fmoc}, 2NH^{Ala}), 8,74 (m, NH^{TfmAla}).

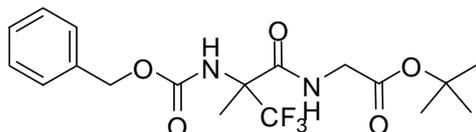
¹⁹F-NMR: (CDCl₃): δ(ppm)= -0,18 (s, CF₃)

FAB-MS: berechnet: 522,49 [M+H]⁺, gefunden: 554,2 [M+H]⁺

8.2.6 Fmoc-Val-(R/S)-TfmAla-Gly-OH

8.2.6.1 Z-(R/S)-TfmAla-Gly-OtBu (1b)

Die Kupplung zu dem Dipeptid 1b wurde nach Methode A mit einer Ansatzgröße von 12,40 mmol durchgeführt. Das erhaltene Produkt fällt als weißer Feststoff an.



R_f-Wert: 0,46 (Ethylacetat/Petrolether=2/3)

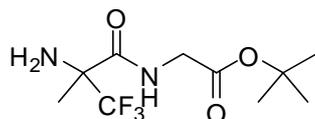
Ausbeute: 4,77 g (95%)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 1,47 (s, tBu-CH₃), 1,88 (s, CH₃^{TfmAla}), 3,93-3,97 (m, α-CH^{Gly}), 5,11 (s, CH₂^{Z-Gruppe}), 5,85 (s, NH^{TfmAla}), 6,64 (d, J = 6,9 Hz, NH^{Gly}), 7,25-7,38 (m, aromatisch^Z).

¹⁹F-NMR (400MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 1,57(s, CF₃-Diast.).

8.2.6.2 H-(R/S)-TfmAla-Gly-OtBu (2b)

Die hydrogenolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe erfolgte analog der beschriebenen Methode B in der Ansatzgröße 9,65 mmol.



R_f-Wert: 0,35 (Ethylacetat/Petrolether=1/1)

Ausbeute: 2,50 g (96%)

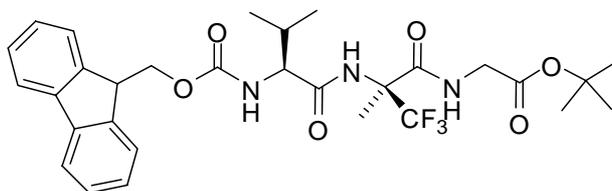
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 1,46 (s, tBu-CH₃), 1,53 (s, CH₃^{TfmAla}), 1,81 (s, NH₂^{TfmAla}), 3,93-3,97 (m, α-CH^{Gly}), 7,73 (s, NH^{Gly}).

¹⁹F-NMR (400MHz, CDCl₃): δ(ppm) = -0,43 (s, CF₃).

8.2.6.3 Fmoc-Val-(R/S)-TfmAla-Gly-OtBu (3b)

Die Reaktion zum Tripeptid wurde gemäß der Methode C durchgeführt mit 14,24 mmol als Ansatzgröße durchgeführt. Das Ende der Reaktion wurde mittels DC-Kontrolle nach 5 d festgestellt. Nach der Aufreinigung über Säulenchromatographie an Kieselgel fällt das Tripeptid 3b als weißes Pulver an. Das Produkt konnte anschließend über Säulenchromatographie in seine beiden Epimere getrennt werden.

Verbindung 3b-1



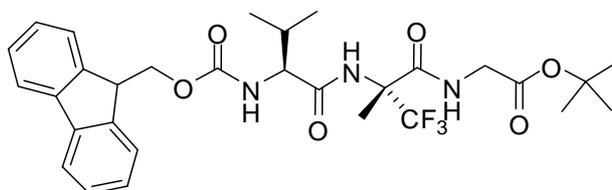
R_f-Wert: 0,55 (Ethylacetat/Hexan = 1/1)

Ausbeute: 0,89 g (59%)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 0,98 (d, J=7,2 Hz, γ,γ'-CH₃^{Val}), 1,43 (s, tBu-CH₃), 1,93 (s, CH₃^{TfmAla}), 2,11 (m, β-CH^{Val}), 3,84 (d, J=7,2 Hz, α-CH₂^{Gly}), 3,95 (d, J=7,2 Hz, α-CH^{Val}), 4,22 (t, J=8,6 Hz, CH^{Fmoc}), 4,40 (d, J=7,2 Hz, CH₂^{Fmoc}), 5,36 (m, NH^{Val}), 6,80 (m, NH^{Gly}), 6,88 (m, NH^{TfmAla}), 7,28-7,77 (m, aromatisch CH^{Fmoc})

¹⁹F-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ(ppm)= 1,87

Verbindung 3b-2



R_f-Wert: 0,46 (Ethylacetat/Hexan = 1/1)

Ausbeute: 0,22 g (14%)

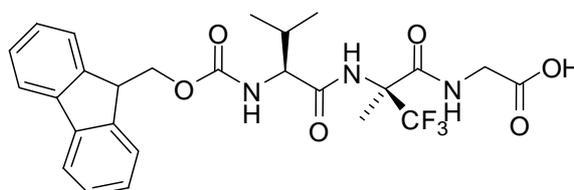
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 0,96$ (*d*, $J=7,2$ Hz, $\gamma,\gamma'- CH_3^{Val}), 1,45 (*s*, *t*Bu- CH_3), 1,88 (*s*, $\text{CH}_3^{\text{TfmAla}}$), 2,09 (*m*, $\beta\text{-CH}^{\text{Val}}$), 3,93 (*d*, $J=7,2$ Hz, $\alpha\text{-CH}_2^{\text{Gly}}$), 3,95 (*d*, $J=7,2$ Hz, $\alpha\text{-CH}^{\text{Val}}$), 4,23 (*t*, $J=8,6$ Hz, CH^{Fmoc}), 4,44 (*d*, $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_2^{\text{Fmoc}}$), 5,28 (*m*, NH^{Val}), 6,72 (*m*, NH^{Gly}), 6,97 (*m*, $\text{NH}^{\text{TfmAla}}$), 7,29-7,78 (*m*, aromatisch CH^{Fmoc})$

$^{19}\text{F-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 2,19$

8.2.6.4 Fmoc-Val-(R/S)-TfmAla-Gly-OH (4b)

Die C-terminale Schutzgruppe wurde nach Methode D durchgeführt.

Verbindung **4b-1**

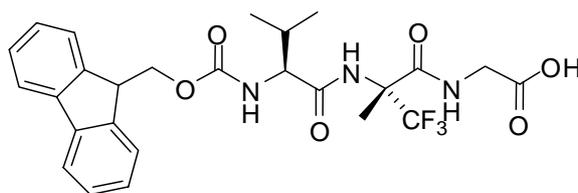


Ausbeute: 0,79 g (98%)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm}) = 0,88$ (*d*, $J=7,2$ Hz, γ,γ' - CH_3^{Val}), 1,63 (*s*, $\text{CH}_3^{\text{TfmAla}}$), 2,00 (*m*, $\beta\text{-CH}^{\text{Val}}$), 3,70 (*m*, $\alpha\text{-CH}_2^{\text{Gly}}$), 3,95 (*m*, $\alpha\text{-CH}^{\text{Val}}$), 4,22-4,43 (*m*, CH^{Fmoc} , $\text{CH}_2^{\text{Fmoc}}$), 7,34-7,95 (*m*, aromatisch CH^{Fmoc} , NH^{Val} , NH^{Gly}), 8,63 (*m*, $\text{NH}^{\text{TfmAla}}$)

$^{19}\text{F-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 3,90$

FAB-MS: berechnet: 536,51 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 536,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Verbindung **4b-2**

Ausbeute: 0,19 g (94%)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 0,88$ (*d*, $J=7,2$ Hz, γ,γ' - CH_3^{Val}), 1,69 (*s*, $\text{CH}_3^{\text{TfmAla}}$), 2,00 (*m*, $\beta\text{-CH}^{\text{Val}}$), 3,70 (*m*, $\alpha\text{-CH}_2^{\text{Gly}}$), 3,95 (*m*, $\alpha\text{-CH}^{\text{Val}}$), 4,22-4,42 (*m*, CH^{Fmoc} , $\text{CH}_2^{\text{Fmoc}}$), 7,34-8,05 (*m*, aromatisch CH^{Fmoc} , NH^{Val} , NH^{Gly}), 8,71(*m*, $\text{NH}^{\text{TfmAla}}$)

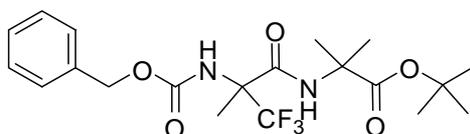
$^{19}\text{F-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 2,19$

FAB-MS: berechnet: 536,51 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 536,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

8.2.7 Fmoc-Val-(*R/S*)-TfmAla-Aib-OH

8.2.7.1 *Z-(R/S)-TfmAla-Aib-OtBu* (1c)

Die Kupplung zu dem Dipeptid 1a wurde nach Methode A mit einer Ansatzgröße von 3,49 mmol durchgeführt. Das erhaltene Produkt fällt als weißer Feststoff an.



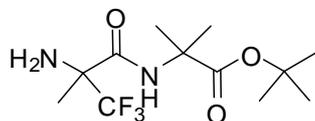
R_f -Wert: 0,45 (Ethylacetat/Hexan=3/2)

Ausbeute: 1,02 g (68%)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 1,48$ (*m*, 2 CH_3^{Aib}), 1,60 (*s*, $t\text{Bu-CH}_3$), 1,87 (*s*, $\text{CH}_3^{\text{TfmAla}}$), 1,82 (*s*, $\text{CH}_3^{\text{TfmAla-Diast.}}$), 5,88 (*s*, $\text{NH}^{\text{TfmAla}}$), 6,94 (*s*, NH^{Aib}), 7,23-7,32 (*m*, aromatisch^Z).

8.2.7.2 H-(R/S)-TfmAla-Aib-OtBu (2c)

Die hydrogenolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe erfolgte analog der beschriebenen Methode B in der Ansatzgröße 2,36 mmol.



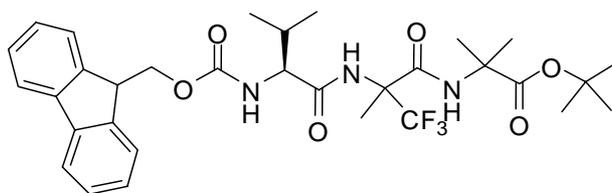
R_f-Wert: 0,35 (Ethylacetat/Petrolether=1/1)

Ausbeute: 0,72 g (96%)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 1,49 (m, CH₃^{Aib}), 1,47 (s, tBu-CH₃), 1,59 (s, beide CH₃^{TfmAla}), 2,44 (s, NH₂^{TfmAla} beider Diast.), 7,71 (s, NH^{Ala}-Diast.).

8.2.7.3 Fmoc-Val-(R/S)-TfmAla-Aib-OtBu (3c)

Die Reaktion zum Tripeptid wurde gemäß der Methode C durchgeführt mit 2,24 mmol als Ansatzgröße durchgeführt. Das Ende der Reaktion wurde mittels DC-Kontrolle nach 5 d festgestellt. Nach der Aufreinigung über Säulenchromatographie an Kieselgel fällt das Tripeptid 3c als weißes Pulver an.



R_f-Wert: 0,45 (Ethylacetat/Petrolether = 2/3)

Ausbeute: 0,77 mg (53%)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 0,90 (m, 2 CH₃^{Val}), 1,40 (s, tBu-CH₃), 1,46 (m, CH₃^{Aib}), 2,00 (s, CH₃^{TfmAla}), 2,10 (m, β-CH^{Val}), 4,07 (m, β-CH^{Val}), 4,12-4,26 (m, CH^{Fmoc}), 4,33-4,42 (m, CH₂^{Fmoc}), 5,33 (m, NH^{Val}), 6,91 (m, NH^{Aib}), 6,98 (s, NH^{TfmAla}), 7,22-7,75 (m, aromatisch CH^{Fmoc}).

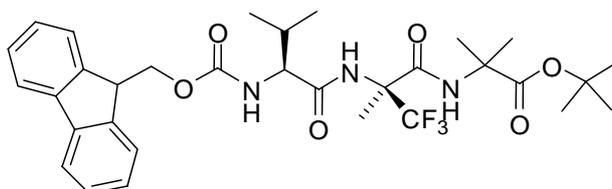
¹⁹F-NMR: (CDCl₃): δ(ppm) = 7,19 (s, CF₃), 4,76 (s, CF₃-Diast.)

FAB-MS: berechnet: 643,5 [M+Na]⁺, gefunden: 643,6 [M+H]⁺

8.2.7.4 Fmoc-Val-(R/S)-TfmAla-Aib-OH (4c)

Die C-terminale Schutzgruppe wurde nach Methode D durchgeführt. Das Produkt konnte anschließend über Säulenchromatographie in seine beiden Epimere getrennt werden.

Verbindung 4c-1



R_f-Wert: 0,31 (Ethylacetat/Hexan)=2/1 + 5%Vol. Essigsäure)

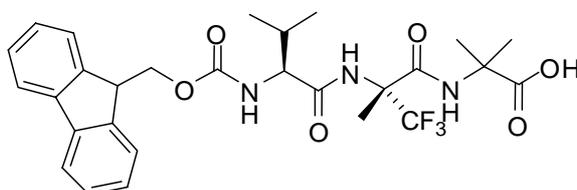
Ausbeute: 0,41 mg (53%)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) = 0,62 (*m*, 2 CH₃^{Val}), 1,24 (*s*, CH₃^{Aib}), 1,31 (*s*, CH₃^{Aib}), 1,57 (*s*, CH₃^{TfmAla}), 1,91 (*m*, β-CH^{Val}), 3,86-3,96 (*m*, α-CH^{α-Val}), 4,08-4,30 (*m*, CH^{Fmoc}, CH₂^{Fmoc}), 7,33-7,87 (*m*, aromatisch CH^{Fmoc}, NH^{Val}, NH^{Aib}), 8,80 (*s*, NH^{TfmAla}).

¹⁹F-NMR: (400MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) = 0,48 (*s*, CF₃)

FAB-MS: berechnet: 586,57 [M+Na]⁺, gefunden: 587,53 [M+H]⁺

Verbindung 4c-2



R_f-Wert: 0,20 (Ethylacetat/Hexan)=2/1 + 5%Vol. Essigsäure)

Ausbeute: 0,32 mg (42%)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm) = 0,84 (*m*, 2 CH₃^{Val}), 1,27 (*s*, CH₃^{Aib}), 1,28 (*s*, CH₃^{Aib}), 1,55 (*s*, CH₃^{TfmAla}), 1,97 (*m*, β-CH^{Val}), 3,87-3,98 (*m*, α-CH^{α-Val}), 4,10-4,32 (*m*, CH^{Fmoc},

$\text{CH}_2^{\text{Fmoc}}$, 7,27-7,88 (*m*, aromatisch CH^{Fmoc} , NH^{Val} , NH^{Aib}), 8,67 (*s*, $\text{NH}^{\text{TfmAla}}$).

^{19}F -NMR: (400MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = -1,43 (*s*, CF_3)

FAB-MS: berechnet: 587,57 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gefunden: 587,60 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

8.3 Synthese der fluorierten Alamethicin-Analoga

Die fluorierten Alm-Analoga werden gemäß in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methoden über sequenzielle Festphasenpeptidsynthese, Fragmentkondensation der Tripeptide an fester Phase und anschließender Abspaltung durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgt über semipräparative RP-HPLC mit dem in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Gradienten. Die Reinheit der erhaltenen Produkte wird mittels analytischer RP-HPLC (Kapitel 3.2.2.1) überprüft, die entsprechenden Chromatogramme und die zugehörigen Ausbeuten sind in Abbildung 4.2 bzw. Tabelle 4.4 dargestellt.

Tabelle 8.1: Übersicht der MALDI-TOF- und hochaufgelösten ^{19}F -NMR-Daten der synthetisierten Alm-Analoga

Peptid	berechnete Masse [m/z]	gefundene Masse [m/z]	^{19}F -NMR in MeOH- d_4 δ [ppm]
Alm F30	1964,31	1986,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	-
5-(<i>R</i>)-TfmAla-Alm	2018,32	2040,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	2,11
5-(<i>S</i>)-TfmAla-Alm	2018,32	2040,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	3,66
10-(<i>R</i>)-TfmAla-Alm	2018,32	2040,7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	2,70
10-(<i>S</i>)-TfmAla-Alm	2018,32	2040,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	4,26
16-(<i>R</i>)-TfmAla-Alm	2018,32	2040,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	2,70
16-(<i>S</i>)-TfmAla-Alm	2018,32	2040,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	3,41

Die Charakterisierung erfolgte über MALDI-TOF-Massenspektrometrie und hochaufgelöste ^{19}F -NMR, die dadurch erhaltenen Daten sind in Tabelle 8.1 dargestellt. Als Referenz für die hochaufgelöste ^{19}F -NMR diente TFA, die chemische Verschiebung erhält bei einem tieffeldverschobenen Signal bezüglich des TFA-Signals ein positives Vorzeichen.

9 Literatur

1. Zasloff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, 415, (6870), 389-395.
2. Brogden, K. A., Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **2005**, 3, (3), 238-250.
3. Breithaupt, H., The new antibiotics. *Nature Biotechnology* **1999**, 17, (12), 1165-1169.
4. Kirschbaum, J.; Krause, C.; Winzheimer, R. K.; Brückner, H., Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. *Journal of Peptide Science* **2003**, 9, (11-12), 799-809.
5. Singer, S. J.; Nicolson, G. L., Fluid Mosaic Model of Structure of Cell-Membranes. *Science* **1972**, 175, (4023), 720-731.
6. Gennis, R. B., *Biomembranes molecular structure and function*. 2nd ed.; Springer-Verlag: New York, NY, 1998.
7. Yeaman, M. R.; Yount, N. Y., Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews* **2003**, 55, (1), 27-55.
8. Leitgeb, B.; Szekeres, A.; Manczinger, L.; Vagvolgyi, C.; Kredics, L., The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol. *Chem Biodivers* **2007**, 4, (6), 1027-51.
9. Chugh, J. K.; Wallace, B. A., Peptaibols: models for ion channels. *Biochem Soc Trans* **2001**, 29, (Pt 4), 565-70.
10. Reusser, F., Biosynthesis of Antibiotic U-22,324 a Cyclic Polypeptide. *Journal of Biological Chemistry* **1967**, 242, (2), 243-&.
11. Meyer, C. E.; Reusser, F., A Polypeptide Antibacterial Agent Isolated from *Trichoderma Viride*. *Experientia* **1967**, 23, (2), 85-86.
12. Marahiel, M. A.; Stachelhaus, T.; Mootz, H. D., Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* **1997**, 97, (7), 2651-2673.
13. Kleinkauf, H.; Rindfleisch, H., Non-Ribosomal Biosynthesis of Cyclic Octadecapeptide Alamethicin. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **1975**, 22, (4), 411-418.
14. Rindfleisch, H.; Kleinkauf, H., Biosynthesis of Alamethicin. *Febs Letters* **1976**, 62, (3), 276-280.
15. Pandey, R. C.; Cook, J. C.; Rinehart, K. L., Peptaibophol Antibiotics .3. High-Resolution and Field Desorption Mass-Spectrometry Studies and Revised Structures of Alamethicin-I and Alamethicin-Ii. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, 99, (26), 8469-8483.
16. Fox, R. O., Jr.; Richards, F. M., A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution. *Nature* **1982**, 300, (5890), 325-30.
17. Karle, I. L., Folding, Aggregation and Molecular Recognition in Peptides. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science* **1992**, 48, 341-356.
18. Karle, I. L.; Balaram, P., Structural Characteristics of Alpha-Helical Peptide Molecules Containing Aib Residues. *Biochemistry* **1990**, 29, (29), 6747-6756.
19. Esposito, G.; Carver, J. A.; Boyd, J.; Campbell, I. D., High-Resolution H¹-NMR Study of the Solution Structure of Alamethicin. *Biochemistry* **1987**, 26, (4), 1043-1050.
20. Kelsh, L. P.; Ellena, J. F.; Cafiso, D. S., Determination of the Molecular-Dynamics of Alamethicin Using C¹³ NMR - Implications for the Mechanism of

- Gating of a Voltage-Dependent Channel. *Biochemistry* **1992**, 31, (22), 5136-5144.
21. Yee, A. A.; Oneil, J. D. J., Uniform ^{15}N Labeling of a Fungal Peptide - the Structure and Dynamics of an Alamethicin by ^{15}N and ^1H -NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **1992**, 31, (12), 3135-3143.
 22. Franklin, J. C.; Ellena, J. F.; Jayasinghe, S.; Kelsh, L. P.; Cafiso, D. S., Structure of Micelle-Associated Alamethicin from H-1-NMR - Evidence for Conformational Heterogeneity in a Voltage-Gated Peptide. *Biochemistry* **1994**, 33, (13), 4036-4045.
 23. Vogel, H., Comparison of the Conformation and Orientation of Alamethicin and Melittin in Lipid-Membranes. *Biochemistry* **1987**, 26, (14), 4562-4572.
 24. Haris, P. I.; Chapman, D., Fourier-Transform Infrared-Spectra of the Polypeptide Alamethicin and a Possible Structural Similarity with Bacteriorhodopsin. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1988**, 943, (2), 375-380.
 25. Fraternali, F., Restrained and Unrestrained Molecular-Dynamics Simulations in the Nvt Ensemble of Alamethicin. *Biopolymers* **1990**, 30, (11-12), 1083-1099.
 26. Duclouhier, H.; Wroblewski, H., Voltage-dependent pore formation and antimicrobial activity by alamethicin and analogues. *J Membr Biol* **2001**, 184, (1), 1-12.
 27. Sansom, M. S., The biophysics of peptide models of ion channels. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **1991**, 55, (3), 139-235.
 28. Sansom, M. S. P., Alamethicin and Related Peptaibols - Model Ion Channels. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **1993**, 22, (2), 105-124.
 29. Cafiso, D. S., Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1994**, 23, 141-65.
 30. Oren, Z.; Shai, Y., Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **1998**, 47, (6), 451-463.
 31. Boheim, G., Statistical-Analysis of Alamethicin Channels in Black Lipid-Membranes. *Journal of Membrane Biology* **1974**, 19, (3), 277-303.
 32. He, K.; Ludtke, S. J.; Huang, H. W.; Worcester, D. L., Antimicrobial Peptide Pores in Membranes Detected by Neutron Inplane Scattering. *Biochemistry* **1995**, 34, (48), 15614-15618.
 33. He, K.; Ludtke, S. J.; Heller, W. T.; Huang, H. W., Mechanism of alamethicin insertion into lipid bilayers. *Biophysical Journal* **1996**, 71, (5), 2669-2679.
 34. Boheim, G.; Hanke, W.; Jung, G., Alamethicin Pore Formation - Voltage-Dependent Flip-Flop of Alpha-Helix Dipoles. *Biophysics of Structure and Mechanism* **1983**, 9, (3), 181-191.
 35. Wu, Y.; Huang, H. W.; Olah, G. A., Method of Oriented Circular-Dichroism. *Biophysical Journal* **1990**, 57, (4), 797-806.
 36. Huang, H. W., Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* **2000**, 39, (29), 8347-52.
 37. Chen, F. Y.; Lee, M. T.; Huang, H. W., Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: A case study on alamethicin. *Biophysical Journal* **2002**, 82, (2), 908-914.
 38. Matsuzaki, K., Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1462, (1-2), 1-10.
 39. Mottamal, M.; Lazaridis, T., Voltage-dependent energetics of alamethicin monomers in the membrane. *Biophysical Chemistry* **2006**, 122, (1), 50-57.
 40. Tieleman, D. P.; Berendsen, H. J.; Sansom, M. S., An alamethicin channel in a lipid bilayer: molecular dynamics simulations. *Biophys J* **1999**, 76, (4), 1757-69.

41. Tieleman, D. P.; Berendsen, H. J. C.; Sansom, M. S. P., Surface binding of alamethicin stabilizes its helical structure: Molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal* **1999**, *76*, (6), 3186-3191.
42. Tieleman, D. P.; Sansom, M. S.; Berendsen, H. J., Alamethicin helices in a bilayer and in solution: molecular dynamics simulations. *Biophys J* **1999**, *76*, (1 Pt 1), 40-9.
43. Tieleman, D. P.; Hess, B.; Sansom, M. S. P., Analysis and evaluation of channel models: Simulations of alamethicin. *Biophysical Journal* **2002**, *83*, (5), 2393-2407.
44. Breed, J.; Kerr, I. D.; Sankararamakrishnan, R.; Sansom, M. S. P., Packing Interactions of Aib-Containing Helices - Molecular Modeling of Parallel Dimers of Simple Hydrophobic Helices and of Alamethicin. *Biopolymers* **1995**, *35*, (6), 639-655.
45. Bechinger, B.; Skladnev, D. A.; Ogresl, A.; Li, X.; Rogozhkina, E. V.; Ovchinnikova, T. V.; O'Neil, J. D.; Raap, J., ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR investigations on the orientation of zervamicin II and alamethicin in phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry* **2001**, *40*, (31), 9428-37.
46. North, C. L.; Barranger-Mathys, M.; Cafiso, D. S., Membrane orientation of the N-terminal segment of alamethicin determined by solid-state ¹⁵N NMR. *Biophys J* **1995**, *69*, (6), 2392-7.
47. Bak, M.; Bywater, R. P.; Hohwy, M.; Thomsen, J. K.; Adelhorst, K.; Jakobsen, H. J.; Sorensen, O. W.; Nielsen, N. C., Conformation of alamethicin in oriented phospholipid bilayers determined by (¹⁵N) solid-state nuclear magnetic resonance. *Biophys J* **2001**, *81*, (3), 1684-98.
48. Ulrich, A. S., Solid state F-19 NMR methods for studying biomembranes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2005**, *46*, (1), 1-21.
49. OHagan, D.; Rzepa, H. S., Some influences of fluorine in bioorganic chemistry. *Chemical Communications* **1997**, (7), 645-652.
50. Fyfe, C. A., *Solid state NMR for Chemists*. C.F.C. Press: Guelp, 1983; p 593 S.
51. Ulrich, R.; Glaser, R. W.; Ulrich, A. S., Susceptibility corrections in solid state NMR experiments with oriented membrane samples. Part II: Theory. *Journal of Magnetic Resonance* **2003**, *164*, (1), 115-127.
52. Afonin, S.; Dur, U. H. N.; Glaser, R. W.; Ulrich, A. S., 'Boomerang'-like insertion of a fusogenic peptide in a lipid membrane revealed by solid-state F-19 NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2004**, *42*, (2), 195-203.
53. Afonin, S.; Glaser, R. W.; Berdichevskaia, M.; Wadhvani, P.; Guhrs, K. H.; Mollmann, U.; Perner, A.; Ulrich, A. S., 4-Fluorophenylglycine as a label for F-19 NMR structure analysis of membrane-associated peptides. *ChemBiochem* **2003**, *4*, (11), 1151-1163.
54. Glaser, R. W.; Ulrich, A. S., Susceptibility corrections in solid-state NMR experiments with oriented membrane samples. Part I: applications. *J Magn Reson* **2003**, *164*, (1), 104-14.
55. Glaser, R. W.; Sachse, C.; Durr, U. H.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S., Orientation of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes determined from ¹⁹F-NMR dipolar couplings of 4-CF₃-phenylglycine labels. *J Magn Reson* **2004**, *168*, (1), 153-63.
56. Afonin, S.; Mikhailiuk, P. K.; Komarov, I. V.; Ulrich, A. S., Evaluating the amino acid CF₃-bicyclopentylglycine as a new label for solid-state F-19-NMR structure analysis of membrane-bound peptides. *Journal of Peptide Science* **2007**, *13*, (9), 614-623.

57. Glaser, R. W.; Sachse, C.; Durr, U. H. N.; Wadhvani, P.; Afonin, S.; Strandberg, E.; Ulrich, A. S., Concentration-dependent realignment of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes observed by solid-state F-19-NMR. *Biophysical Journal* **2005**, 88, (5), 3392-3397.
58. Duer, M. J., *Introduction to solid-state NMR spectroscopy*. Blackwell: Oxford, 2004; p xiv, 349.
59. Grage, S. L.; Ulrich, A. S., Orientation-dependent F-19 dipolar couplings within a trifluoromethyl group are revealed by static multipulse NMR in the solid state. *Journal of Magnetic Resonance* **2000**, 146, (1), 81-88.
60. Sewald, N.; Hollweck, W.; Mutze, K.; Schierlinger, C.; Seymour, L. C.; Gaa, K.; Burger, K.; Kokschi, B.; Jakubke, H. D., Peptide Modification by Introduction of Alpha-Trifluoromethyl Substituted Amino-Acids. *Amino Acids* **1995**, 8, (2), 187-194.
61. Jackel, C.; Kokschi, B., Fluorine in peptide design and protein engineering. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, (21), 4483-+.
62. F. Formaggio, Q. B. B., C. Toniolo, Synthesis of Peptides Based on C-alpha-tetrasubstituted alpha-Amino Acids. *Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry. Additional and suppl. vols. to the 4th ed; E22c* **2003**, 292-310.
63. Kokschi, B.; Sewald, N.; Jakubke, H. D.; Burger, K., Synthesis and incorporation of alpha-trifluoromethyl-substituted amino acids into peptides. *Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry* **1996**, 639, 42-58.
64. Sewald, N.; Burger, K., Synthesis of beta-Fluorine-containing Amino Acids. *Fluorine-containing Amino Acids: Synthesis and Properties* **1995**, 139-220.
65. Kokschi, B.; Sewald, N.; Hofmann, H. J.; Burger, K.; Jakubke, H. D., Proteolytically stable peptides by incorporation of alpha-Tfm amino acids. *Journal of Peptide Science* **1997**, 3, (3), 157-+.
66. Bohm, H. J.; Banner, D.; Bendels, S.; Kansy, M.; Kuhn, B.; Muller, K.; Obst-Sander, U.; Stahl, M., Fluorine in medicinal chemistry. *ChemBiochem* **2004**, 5, (5), 637-643.
67. Smart, B. E., Fluorine substituent effects (on bioactivity). *Journal of Fluorine Chemistry* **2001**, 109, (1), 3-11.
68. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, (14), 2149-8.
69. Fields, G. B.; Noble, R. L., Solid-Phase Peptide-Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Acids. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1990**, 35, (3), 161-214.
70. Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Sadataalae, S. Y.; Tien, J. H.; Langridge, D. C., ((9-Fluorenylmethyl)Oxy)Carbonyl (Fmoc) Amino-Acid Chlorides - Synthesis, Characterization, and Application to the Rapid Synthesis of Short Peptide Segments. *Journal of Organic Chemistry* **1986**, 51, (19), 3732-3734.
71. Carpino, L. A.; Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *Journal of Organic Chemistry* **1972**, 37, (22), 3404-8.
72. Sieber, P.; Riniker, B., Protection of Carboxamide Functions by the Trityl Residue - Application to Peptide-Synthesis. *Tetrahedron Letters* **1991**, 32, (6), 739-742.
73. Kaiser, E.; Colescot, R.; Bossinge, C.; Cook, P. I., Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Analytical Biochemistry* **1970**, 34, (2), 595-598.

74. Kocsch, B.; Quaedflieg, P. J. L. M.; Michel, T.; Burger, K.; Broxterman, Q. B.; Schoemaker, H. E., Enzymatic resolution of C-alpha-fluoroalkyl substituted amino acids. *Tetrahedron-Asymmetry* **2004**, 15, (9), 1401-1407.
75. Ulrich, A. S.; Heyn, M. P.; Watts, A., Structure Determination of the Cyclohexene Ring of Retinal in Bacteriorhodopsin by Solid-State Deuterium Nmr. *Biochemistry* **1992**, 31, (42), 10390-10399.
76. Koradi, R.; Billeter, M.; Wuthrich, K., MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics* **1996**, 14, (1), 51-55.
77. Burger, K.; Mutze, K.; Hollweck, W.; Kocsch, B.; Kuhl, P.; Jakubke, H. D.; Riede, J.; Schier, A., Protease-Catalyzed and Chemical Peptide-Bond Formation with Alpha-Trifluoromethyl Substituted Alpha-Amino-Acids. *Journal Fur Praktische Chemie-Chemiker-Zeitung* **1993**, 335, (4), 321-331.
78. Mollhoff, M.; Sternberg, U., Molecular mechanics with fluctuating atomic charges - a new force field with a semi-empirical charge calculation. *Journal of Molecular Modeling* **2001**, 7, (4), 90-102.
79. Dürr, U., Solid-state 19F-NMR studies on fluorine-labeled model compounds and biomolecules. *Dissertation* **2005**, Universität Karlsruhe.
80. Ruden, S., Synergistische Effekte antimikrobieller Peptide mit Silber(I)ionen und Silbernanopartikeln. *Diplomarbeit* **2007**, Universität Karlsruhe.
81. Kocsch, B.; Sewald, N.; Burger, K.; Jakubke, H. D., Peptide modification by incorporation of alpha-trifluoromethyl substituted amino acids. *Amino Acids* **1996**, 11, (3-4), 425-434.
82. Burger, K.; Schierlinger, C.; Mutze, K.; Hollweck, W.; Kocsch, B., 2-Trifluoromethyl-Substituted Amino-Acids .20. Incorporation of Alpha-Trifluoromethyl-Substituted Alpha-Amino-Acids into the N-Terminal and C-Terminal Position of Azapeptides. *Liebigs Annalen Der Chemie* **1994**, (4), 407-413.
83. Nagaraj, R.; Balaram, P., Solution Phase Synthesis of Alamethicin-I. *Tetrahedron* **1981**, 37, (6), 1263-1270.
84. Balasubramanian, T. M.; Kendrick, N. C. E.; Taylor, M.; Marshall, G. R.; Hall, J. E.; Vodyanoy, I.; Reusser, F., Synthesis and Characterization of the Major Component of Alamethicin. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, 103, (20), 6127-6132.
85. Schmitt, H.; Jung, G., Total Synthesis of the Alpha-Helical Eicosapeptide Antibiotic Alamethicin. *Liebigs Annalen Der Chemie* **1985**, (2), 321-344.
86. Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Haber, H.; Seydel, J. K.; Krause, E.; Bienert, M.; Carpino, L. A.; Elfaham, A.; Albericio, F., Stepwise Automated Solid-Phase Synthesis of Naturally-Occurring Peptaibols Using Fmoc Amino-Acid Fluorides. *Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60, (2), 405-410.
87. Bergmann, M.; Zervas, L., Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1932**, 65, (7), 1192-1201.
88. Carpino, L. A., The 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl Family of Base-Sensitive Amino-Protecting Groups. *Accounts of Chemical Research* **1987**, 20, (11), 401-407.
89. Kukhar, V. P.; Soloshonok, V. A., *Fluorine-containing amino acids : synthesis and properties*. Wiley: Chichester, 1995; p x, 411.
90. Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotiriu, P.; Yao, W. Q.; Schafer, W., Synthesis of Protected Peptide-Fragments Using Substituted Triphenylmethyl Resins. *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, (30), 3943-3946.

91. Barlos, K.; Chatzi, O.; Gatos, D.; Stavropoulos, G., 2-Chlorotriptyl Chloride Resin - Studies on Anchoring of Fmoc-Amino Acids and Peptide Cleavage. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1991**, 37, (6), 513-520.
92. Bruckner, H.; Konig, W. A.; Greiner, M.; Jung, G., Sequences of the Membrane-Modifying Peptide Antibiotic Trichotoxin-a-40. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1979**, 18, (6), 476-477.
93. Voelter, W.; Weitzel, G.; Gesellschaft für Biologische Chemie., *Structure and activity of natural peptides : selected topics : proceedings of the Fall Meeting, Gesellschaft fuer Biologische Chemie, Tuebingen, Germany, September 1979*. W. De Gruyter: Berlin ; New York, 1981; p xii, 634 p.
94. Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E., Convergent Solid-Phase Peptide-Synthesis. *Tetrahedron* **1993**, 49, (48), 11065-11133.
95. Benz, H., The Role of Solid-Phase Fragment Condensation (SPFC) in Peptide-Synthesis. *Synthesis-Stuttgart* **1994**, (4), 337-358.
96. Sewald, N.; Jakubke, H.-D., *Peptides chemistry and biology*. Wiley-VCH: Weinheim, 2002; p 562 S.
97. Dathe, M.; Wieprecht, T., Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1462, (1-2), 71-87.
98. Xu, Q.; Keiderling, T. A., Trifluoroethanol-Induced unfolding of concanavalin A: Equilibrium and time-resolved optical spectroscopic studies. *Biochemistry* **2005**, 44, (22), 7976-7987.
99. Provencher, S. W.; Glockner, J., Estimation of Globular Protein Secondary Structure from Circular-Dichroism. *Biochemistry* **1981**, 20, (1), 33-37.
100. Johnson, W. C., Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins-Structure Function and Genetics* **1999**, 35, (3), 307-312.
101. Reichert, J.; Grasnick, D.; Afonin, S.; Buerck, J.; Wadhwani, P.; Ulrich, A. S., A critical evaluation of the conformational requirements of fusogenic peptides in membranes. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **2007**, 36, (4-5), 405-413.
102. Fanghänel, S., Synthese von ¹⁹F-markierten Analoga des antibiotischen Peptaibols Harzianin für NMR-Strukturuntersuchungen. *Diplomarbeit* **2007**, Universität Karlsruhe.
103. Peggion, C.; Coin, I.; Toniolo, C., Total synthesis in solution of alamethicin F50/5 by an easily tunable segment condensation approach. *Biopolymers* **2004**, 76, (6), 485-493.
104. Peggion, C.; Jost, M.; Baldini, C.; Formaggio, F.; Toniolo, C., Total syntheses in solution of TOAC-labelled alamethicin F50/5 analogues. *Chem Biodivers* **2007**, 4, (6), 1183-99.
105. Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Krause, E.; Brudel, M.; Winter, R.; Schumann, M.; Carpino, L. A.; Bienert, M., Fmoc Amino-Acid Fluorides - Convenient Reagents for the Solid-Phase Assembly of Peptides Incorporating Sterically Hindered Residues. *Journal of Organic Chemistry* **1994**, 59, (12), 3275-3280.
106. Toniolo, C.; Benedetti, E., Structures of Polypeptides from Alpha-Amino-Acids Disubstituted at the Alpha-Carbon. *Macromolecules* **1991**, 24, (14), 4004-4009.
107. Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P., Design of folded peptides. *Chemical Reviews* **2001**, 101, (10), 3131-3152.
108. North, C. L.; Franklin, J. C.; Bryant, R. G.; Cafiso, D. S., Molecular Flexibility Demonstrated by Paramagnetic Enhancements of Nuclear-Relaxation -

-
- Application to Alamethicin - a Voltage-Gated Peptide Channel. *Biophysical Journal* **1994**, 67, (5), 1861-1866.
109. Tremouilhac, P.; Strandberg, E.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S., Conditions affecting the re-alignment of the antimicrobial peptide PGLa in membranes as monitored by solid state H-2-NMR. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2006**, 1758, (9), 1330-1342.
110. Burger, K.; Schierlinger, C.; Hollweck, W.; Mutze, K., 2-Trifluoromethyl-Substituted Amino-Acids .19. 2-Trifluoromethyl Alpha-Amino-Acid Esters, Building-Blocks for Trifluoromethyl-Substituted Ureas, Thioureas and Other Potential Biological Active Structures. *Liebigs Annalen Der Chemie* **1994**, (4), 399-406.

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

AA	amino acid
Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
äq.	Äquivalente
Aib (U)	α -Aminoisobuttersäure
Alm	Alamethicin
AN	Acetontitril
au	absorption unit
CAIBE	Chlorameisensäureisobutylester
CHCA	α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
CD	circular dichroism
d	Tag(e)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
Diast.	Diastereomer
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]
DPhPC	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Phosphocholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPTC	1,2-Bis(<i>S</i> -decanoyl)-1,2-dithio- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
EtOH	Ethanol
FAB	Fast Atom Bombardement
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
h	Stunde(n)

HATU	2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetra- methyluroniumhexafluorophosphat
HPLC	high performance liquid chromatography
m	Masse
M	molar
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µmol	Mikromol
mmol	Millimol
MS	mass spectroscopy
NEM	N-Ethylmorpholin
NMP	1-Methyl-pyrrolidon
NMR	nuclear magnetic resonance
OCD	oriented circular dichroism
pH	pH-Wert
Pheol (Fol)	H-L-Phenylalaninol
POPE	1-Palmitoyl-2-oeoyl- <i>sn</i> -glycero-3-pospho- ehanolamin
rH	relative Humidity
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
Tab.	Tabelle
<i>t</i> Bu	tertiär Butyl
TCTU	O-(1H-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3- tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TFA	2,2,2-Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid

TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TfmAla	Trifluormethylalanin
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TOF	time of flight
Trt	Trityl
UV	Ultraviolett
Z	Benzyloxycarbonyl
z	Ladung
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol

Die verwendeten Abkürzungen für die Aminosäure- und Peptidderivate stimmen mit der Empfehlung der IUPAC-IUB Kommission für die biochemische Nomenklatur überein. *Eur. J. Biochem.*, **138**, 9-37 (1984)

Alle verwendeten Aminosäuren sind (außer den gekennzeichneten) L-Enantiomere.

10.2 Auswerteprogramm Axis

Mithilfe dieses Programms und einem modifizierten MOLMOL können PDB-Dateien direkt durch die entsprechenden Drehbefehle in eine Standardorientierung gebracht werden.

Näheres siehe: http://www-ifia.fzk.de/IFIA_Webseiten/Webseiten_Ulrich/index.html.

Quellcode des Programm Axis:

```
// axis.cc
// Ralf W. Glaser,
char *release="25.4.03";
// calculate necessary rotations to adjust molecule to normalized
orientation
// two steps:
// 1) helix axis along z-axis
// 2) CA on +y axis
// you need a modified molmol that prints cylinder coordinates

#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include <string.h>

#define MAXLN 256
#define MAX 40
```

```

char line[MAXLN];

void along_z(void) {
    float x1,x2,y1,y2,z1,z2,dx,dy,dz;
    int read;
    printf("MOLMOL> SelectAtom '@CA'\n");
    printf("MOLMOL> AddCylinder least_square\n");
    printf("paste helix axis coordinates\n");
    fgets(line,MAXLN-1,stdin);
    if((read=sscanf(line,"%f%f%f*s%f%f%f",&x1,&y1,&z1,&x2,&y2,&z2)) < 1)
        read=sscanf(line,"%*s*s%f%f*f*s%f%f%f",&x1,&y1,&z1,&x2,&y2,&z2);
    if(read<6) {
        printf("invalid input, %d numbers readable\n",read);
        return;
    }
    dx=x2-x1; dy=y2-y1; dz=z2-z1;
    float dxy=sqrt(dx*dx+dy*dy);
    float alfa=atan2(dy,dx);
    float beta=atan2(dxy,dz);
    printf("RotateZ %.2f\n",-alfa*180/M_PI);
    printf("RotateY %.2f\n",-beta*180/M_PI);
}

void CA_y(void) {
    float x1,x2,y1,y2,z1,z2,dx,dy,dz;
    float xc,yc,zc;
    int read;
    printf("MOLMOL> SelectAtom '@CA'\n");
    printf("MOLMOL> AddCylinder least_square\n");
    printf("paste helix axis coordinates\n");
    fgets(line,MAXLN-1,stdin);
    if((read=sscanf(line,"%f%f%f*s%f%f%f",&x1,&y1,&z1,&x2,&y2,&z2)) < 1)
        read=sscanf(line,"%*s*s%f%f*f*s%f%f%f",&x1,&y1,&z1,&x2,&y2,&z2);
    if(read<6) printf("invalid input, %d numbers readable\n",read);
    dx=x2-x1; dy=y2-y1; dz=z2-z1;
    float dxy=sqrt(dx*dx+dy*dy);
    float alfa=atan2(dy,dx);
    float beta=atan2(dxy,dz);
    if(beta>0.005) {
        printf("put the helix axis along z first!\n");
        printf("MOLMOL> RotateZ %.2f\n",-alfa*180/M_PI);
        printf("MOLMOL> RotateY %.2f\n",-beta*180/M_PI);
        return;
    }

    printf("> grep CA test_z.pdb | grep ' 12 '\n");
    printf("paste CA coordinates (no leading shit)\n");
    fgets(line,MAXLN-1,stdin);
    if((read=sscanf(line,"%f%f%f%",&xc,&yc,&zc)) < 3) {
        printf("invalid input, %d numbers readable\n",read);
        return;
    }
    dx=xc-(x2+x1)/2; dy=yc-(y2+y1)/2;
    float gamma=atan2(dx,dy);
    printf("MOLMOL> RotateZ %.2f\n",gamma*180/M_PI);
}

int main(int argc, char *argv[]) {
    printf("axis.cc %s:\ncalculate necessary rotations to adjust molecule to
normalized orientation\n\n",release);
    printf(">>>>>> read molecule into molmol\n");
    printf("MOLMOL> RotateInit\n");
    printf("\n1) helix axis along z\n");
}

```

```

along_z();

printf("MOLMOL> WritePdb test_z.pdb\n");
printf("MOLMOL> InitAll\n");
printf("MOLMOL> ReadPdb test_z.pdb\n");
printf("\n2) selected CA along +y\n");
CA_y();

printf("MOLMOL> WritePdb normal.pdb\n");
}

```

10.3 Mathematica-Notebook

Dieses Notebook wurde von Dr. Ulrich H. N. Dürr⁷⁹ im Rahmen seiner Dissertation entwickelt. Es dient der Berechnung der 3 NMR-Parameter aufgrund der erhaltenen Dipolkopplungen. Für weitere Details siehe⁵⁵.

Im nachfolgenden ist eines der verwendeten Mathematica-Notebooks (diente zur Auswertung für NMR-Experiment P/L=1:10 DMPC für Position 5 und 10, bei 35°C, sieh auch Abbildung 4.11:) als Beispiel abgebildet. Der rotgeschriebene Text stellt hierbei die einzugebenden Aufspaltungen bzw. die Koordinaten der C-CF₃-Achse dar. Die benötigte Euler-Matrix entstammt der Literatur⁵⁸.

1:10 DMPC 4Labels 308K

authors: Ulrich Duerr / Ralf W. Glaser

coupling data ??8.07, Input der Koordinaten aus geometrieoptimierten PDB (mit COSMOS), Startmolekül aus MOLMOL und PHI=-58 und PSI=-47

Start

```

Clear["Global`*"];

Print["loading mathematical routines"];
<<"C:/~/euler-4.m";
loading mathematical routines
EulerMatrix[a_,b_,g_]
    active Euler rotation matrix as given by Melinda Duer (2002):
    EulerMatrix[α,β,γ] :=
    
$$\begin{pmatrix} \cos[\alpha] \cos[\beta] \cos[\gamma] - \sin[\alpha] \sin[\gamma] & -\cos[\gamma] \sin[\alpha] - \cos[\alpha] \cos[\beta] \sin[\gamma] & \cos[\alpha] \sin[\beta] \\ \cos[\beta] \cos[\gamma] \sin[\alpha] + \cos[\alpha] \sin[\gamma] & \cos[\alpha] \cos[\gamma] - \cos[\beta] \sin[\alpha] \sin[\gamma] & \sin[\alpha] \sin[\beta] \\ -\cos[\gamma] \sin[\beta] & \sin[\beta] \sin[\gamma] & \cos[\beta] \end{pmatrix}$$

EulerRotate[Matrix_,a_,b_,g_]
    returns transform of matrix M according to M'= R.M.Rt
AveMat[diamatrix_,Sw_,Sr_]

```

returns diagonal matrix diamatrx, scaled by overall order
 parameter Sw and rotational Sr
 angle between two vectors
 dipolar splitting, orientation dependence

misc

ddmax is the maximum dipolar coupling at S=1.

sr only affects the color scale of the display

```
ddmax=15.8;
sr=2;
ez=58;
```

Experimental data

```
SequentialPosition={5,10};
ddExp10DMPC={ -3.0,+1.8,-3.3,-5.7};
ddErr=Table[1.0,{i,6}];
```

data 1:10 in DMPC at 35°C

Error is set to 1kHz, so that χ^2 is in kHz²

coordinates

helix_58_47, all 4 derivatives geometry-minimized:

```
CEL516={{-0.645,1.890,-8.801},{-0.601,-2.568,-1.208}};
CFL516={{-1.888,2.435,-9.605},{-0.010,-3.770,-2.029}};
CED516={{-0.579,1.915,-8.763},{-0.677,-2.549,-1.173}};
CFD516={{-0.059,3.316,-8.234},{-2.027,-3.147,-0.643}};
rL5748e=CFL516-CEL516;
rD5748e=CFD516-CED516;
```

L 10

Data selection

```
rMOL=rL5748e
ddExp=ddExp200DMPC[[Range[1,2]]]
nm=2;
{{-1.243,0.545,-0.804},{0.591,-1.202,-0.821}}
{-3.,1.8}
```

colors

```
UniScale[chi_, cr_] := Module[{cn=chi/(nm), crx=cr},
  Return[cn/(cn+crx)];
];
pics=DensityPlot[UniScale[a, sr], {a, 0, 10}, {b, 0, 1},
  AspectRatio->0.2, PlotPoints->{100, 3},
  ColorFunctionScaling->False, Mesh->False,
  ColorFunction->Hue,
  DisplayFunction->Identity];
```

```

pics2=DensityPlot[UniScale[a,sr],{a,0,100},{b,0,1},
  AspectRatio->0.2,PlotPoints->{100,3},
  ColorFunctionScaling->False,Mesh->False,
  ColorFunction->Hue,
  DisplayFunction->Identity];
allpic={pics,pics2};
Show[GraphicsArray[allpic],ImageSize->600];

```



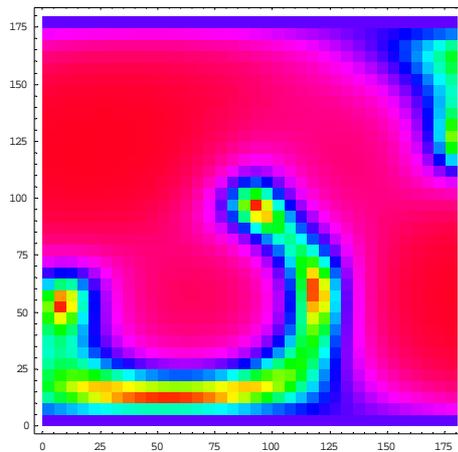
Overview plots with constant SMOL

```

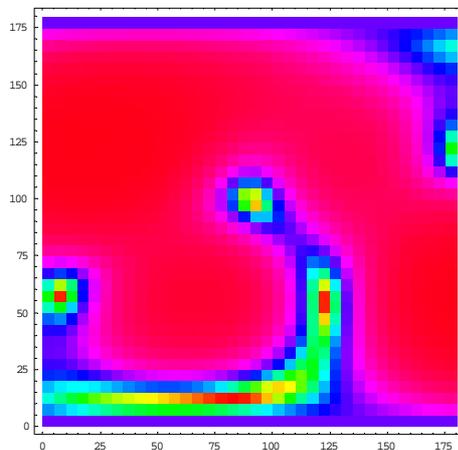
For[S=0.6,S<=1,S=S+0.2,
  (Print["S=",S];
  DensityPlot[UniScale[chisq[rho ,tau ,S],sr],
    {rho,0,180},{tau,0,180},PlotPoints->{36,36},
    AspectRatio->1.0,ImageSize->400,
    ColorFunction->Hue,
    Mesh->False,ColorFunctionScaling->False];
  )];

```

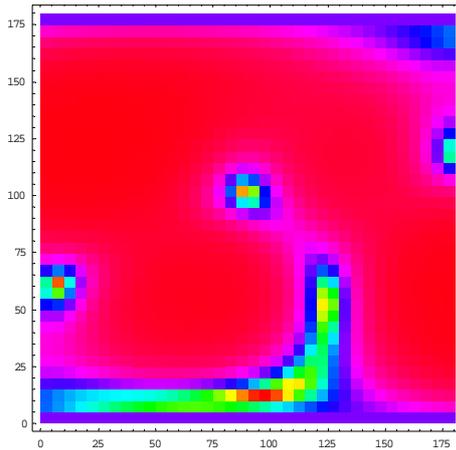
S= 0.6



S= 0.8

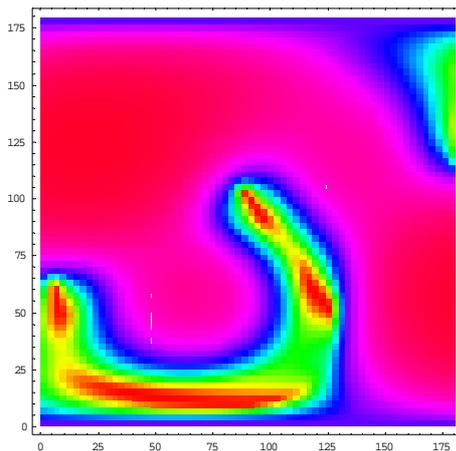


S= 1.



Projection of all allowed S

```
DensityPlot[UniScale[projection[rho , tau , 0.5, 1.0][[1]], sr],
  {rho, 0, 180}, {tau, 0, 180}, PlotPoints -> {64, 64},
  AspectRatio -> 1, ImageSize -> 400,
  ColorFunction -> Hue,
  Mesh -> False, ColorFunctionScaling -> False];
```



Values and Minimum

```
Clear[S];
FindMinimum[chisq[rho , tau , S], {rho, 105, 110}, {tau, 85, 90}, {S, 0.8, 0.85}]
{6.49522 × 10-16, {rho -> 105.999, tau -> 77.4417, S -> 0.379749}}
FindMinimum[chisq[rho , tau , S], {rho, 115, 120}, {tau, 15, 16}, {S, 0.8, 0.9}]
{3.14313 × 10-12, {rho -> 99.9652, tau -> 10.0533, S -> 1.09172}}
```

comparison

```
sim[118.7, 90.2, 0.572 ]
{-4.44541, -1.28212}
```

D 10

Data selection

```
rMOL=rD5748e;
ddExp=ddExp200DMPC[[Range[3,4]]];
```

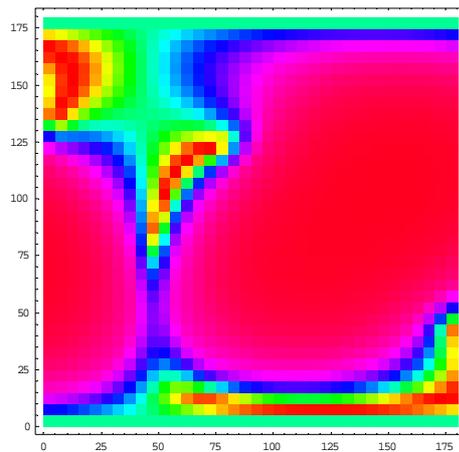
```
nm=2;
```

insert subsections from above as needed

Projection of all allowed S

Overview Plot

```
DensityPlot[UniScale[projection[rho , tau , 0.5, 1.0][[1]], sr],
  {rho, 0, 180}, {tau, 0, 180}, PlotPoints->{36, 36},
  AspectRatio->1.0, ImageSize->400,
  ColorFunction->Hue,
  Mesh->False, ColorFunctionScaling->False];
```



Values and Minimum

```
Clear[S];
FindMinimum[chisq[rho , tau , S], {rho, 130, 135}, {tau, 100, 105}, {S, 0.8, 0.85}]
{1.46535 × 10-23, {rho → 50.4035, tau → 100.854, S → 0.805667}}
sim[137.6, 96.9, 0.805]
{5.60765, 10.0226}
```

L+D 10

Data selection

```
rMOL=Join[rL5748e, rD5748e];
ddExp=ddExp200DMPC;
nm=4;
sr=10;
```

insert subsections from above as needed. You need new color scales after change in nm.

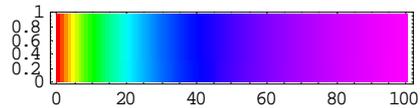
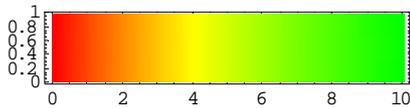
colors

```
UniScale[chi_, cr_] := Module[{cn=chi/(nm-2), crx=cr},
  Return[cn/(cn+crx)];
];
pics=DensityPlot[UniScale[a, sr], {a, 0, 10}, {b, 0, 1},
  AspectRatio->0.2, PlotPoints->{100, 3},
  ColorFunctionScaling->False, Mesh->False,
  ColorFunction->Hue,
```

```

    DisplayFunction->Identity];
pics2=DensityPlot[UniScale[a,sr],{a,0,100},{b,0,1},
    AspectRatio->0.2,PlotPoints->{100,3},
    ColorFunctionScaling->False,Mesh->False,
    ColorFunction->Hue,
    DisplayFunction->Identity];
allpic={pics,pics2};
Show[GraphicsArray[allpic],ImageSize->600];

```



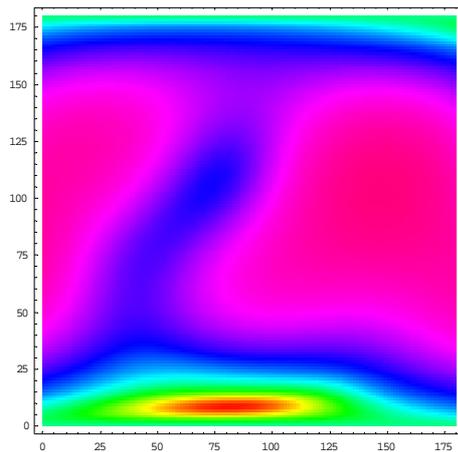
Projection of all allowed S

Overview Plot

```

DensityPlot[UniScale[projection[rho ,tau ,0.5,1.0][[1]],sr],
    {rho,0,180},{tau,0,180},PlotPoints->{144,144},
    AspectRatio->1.0,ImageSize->400,
    ColorFunction->Hue,
    Mesh->False,ColorFunctionScaling->False];

```



Values and Minimum

```

Clear[S];
FindMinimum[chisq[rho ,tau ,S],{rho,50,125},{tau,5,25},{S,0.5,0.99}]
{0.167594,{rho->81.8087,tau->8.09929,S->0.988039}}
sim[128.9,99.9,0.724]
{-5.40713,-4.52362,5.90512,7.64916}

```

Publikationsliste

1. „Synthesis and structure analysis of ^{19}F -labelled alamethicin in phospholipid bilayers using solid-state ^{19}F -NMR“, D. Maisch, S. Afonin, P. Wadhvani, J. Buerck, B. Kokschi, A. S. Ulrich, *Biopolymers* **2007**, 88, 608

Tagungsbeiträge

1. "Synthesis and structure analysis of ^{19}F -labelled alamethicin in DMPC bilayers using solid-state ^{19}F -NMR", D. Maisch, S. Afonin, J. Buerck, P. Wadhvani, E. Strandberg, B. Kokschi, A. S. Ulrich, *8th German Peptide Symposium*, 2007, Heidelberg
2. "Synthesis and Structure Analysis of ^{19}F -labelled Alamethicin in Phospholipid Bilayers using Solid-state ^{19}F -NMR", D. Maisch, S. Afonin, P. Wadhvani, J. Buerck, B. Kokschi, A. S. Ulrich, *20th American Peptide Symposium*, 2007, Montreal

Lebenslauf

Daniel Maisch

Geburtsdatum: 23.12.1975
Geburtsort: Karlsruhe
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1983-07/1986 Grund- und Hauptschule Bietigheim
09/1986-07/1995 Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium Durmersheim
07/1995 Abitur

Hochschulausbildung

09/1996-01/1998 Studium zum Diplom-Ingenieur im Fach Chemie an der Fachhochschule Fresenius Idstein
03/1998-09/2004 Diplomstudium Chemie an der Universität Karlsruhe (TH)
01/2003-09/2004 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie der Universität Karlsruhe (TH) bei Prof. Dr. Anne S. Ulrich;
Thema: „Einführung von Trifluormethylalanin in das Peptaibol Alamethicin“

Promotion

10/2004-02/2008 Promotion am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie der Universität Karlsruhe (TH) bei Prof. Dr. Anne S. Ulrich;
Thema: „Synthese und Strukturuntersuchungen des membranaktiven Peptaibols Alamethicin mittels ¹⁹F-Festkörper-NMR“

Praxis

WS 05/06 und WS 06/07 Dozent an der Berufsakademie Karlsruhe des Vorlesungs- und Laborzyklus „Organische/Chemische Analytik“