

**Strukturuntersuchungen des zellpenetrierenden Peptids
Transportan-10 mittels ¹⁹F-Festkörper-NMR- und
orientierter Zirkulardichroismus-Spektroskopie**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich
vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Chemikerin Susanne Fanghänel

aus

Zwickau

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Burkhard Luy

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2011

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2007 bis Februar 2011 am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT), unter der Leitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich angefertigt.

Ich versichere hiermit wahrheitsgemäß die Arbeit bis auf die dem Aufgabensteller bereits bekannte Hilfe selbständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Änderung übernommen wurde.

Karlsruhe, den 02.03.11

Danksagungen

Frau Prof. Dr. Ulrich danke ich für die interessante Aufgabenstellung, ihr ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit und ihre wertvollen Ratschläge.

Danken möchte ich weiterhin:

Dr. Parvesh Wadhvani für die kompetente Betreuung und zahlreichen Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem gesamten PepSy-Labor, Andrea Eisele, Kerstin Scheubeck, Nico Heidenreich und den ehemaligen Mitgliedern Steffi Maurer und Christian Mink, für die Hilfe und Unterstützung und vor allem den Spaß während der Arbeitszeit.

Dr. Erik Strandberg und im Besonderen Markus Schmitt für die Unterstützung und die wertvollen Hinweise bei den NMR-Messungen.

Dr. Jochen Bürck und Sigmar Roth für die Betreuung und Hilfe bei der Durchführung der CD- und OCD-Messungen.

Prof. Dr. Dagmar Gerthsen und Mohammed Fotouhi für die Möglichkeit der Nutzung des Transmissionselektronenmikroskops und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Prof. Dr. Roland Brock und Wouter Verdurmen für die Durchführung der fluoreszenzmikroskopischen Experimente.

Dem gesamten Arbeitskreis Ulrich für die kollegiale und angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und meinem Freund Daniel für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt in allen Belangen danken.

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AN	Acetonitril
Boc	tertiär Butyloxycarbonyl
CF ₃ -Bpg	3-(Trifluormethyl)bicyclopent-[1.1.1]-1-ylglycin
CD	Zirkular Dichroismus (<i>engl.</i> : circular dichroism)
CF	5,6-Carboxyfluorescein
CFU	<i>engl.</i> : cell forming unit
CHCl ₃	Chloroform
COS-7-Zellen	Zellen aus <i>Cercopithecus aethiops</i> (Grüne Meerkatze)
CF ₃ -Phg	4-Trifluormethylphenylglycin
CPP	zellpenetrierendes Peptid (<i>engl.</i> : cell-penetrating peptide)
d	Tag(e)
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dde	4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene-ethyl
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMPC	Dimyristoylphosphocholin
DMPG	Dimyristoylphosphoglycerol
DHPC	Dihexanoylglycerophosphocholin
eq	Äquivalente
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl

g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>engl.</i> : green fluorescent protein)
h	Stunde(n)
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks-Zellen (Gebärmutterhalskrebszellen)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>engl.</i> : high performance liquid chromatography
HCl	Salzsäure
k	Kilo-
KOH	Kaliumhydroxid
K ₂ SO ₄	Kaliumsulfat
M	molar, molare Masse
MALDI	<i>engl.</i> : matix assisted laser desorption ionisation
MAP	<i>engl.</i> : model amphiphilic peptide
MH-Medium	Mueller Hinton-Medium
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
MS	Massenspektrometrie
MTS	<i>engl.</i> : membrane translocation sequence
NaCl	Natriumchlorid
NMP	1-Methyl-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz (<i>engl.</i> : nuclear magnetic resonance)

NOESY	<i>engl.:</i> nuclear overhauser enhancement spectroscopy
OCD	orientierte Zirkulardichroismus Spektroskopie (<i>engl.:</i> oriented circular dichroism)
PB	Phosphatpuffer
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
P/L	Peptid-zu-Lipid-Verhältnis
PTD	Proteintransduktionsdomäne (<i>engl.:</i> protein transduction domain)
RMSD	<i>engl.:</i> root mean square deviation
RP	<i>engl.:</i> reversed phase
RPMI 1640	Zellkulturmedium nach Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdocecylsulfat (<i>engl.:</i> sodium dodecyl sulphate)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>engl.:</i> solid phase peptide synthesis)
Tab.	Tabelle
tBu	teriär Butyl
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	2,2,2-Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TIS	Triisopropylsilan
TOCSY	<i>engl.:</i> total correlation spectroscopy
TP	Transportan
TP10	Transportan-10
TOF	<i>engl.:</i> time of flight
TRITC	Tetramethylrhodamin- β -isothiocyanat
Trt	Trityl
V	Volumen
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

Die verwendeten Abkürzungen für die Aminosäuren 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, bis auf die oben aufgeführte Ausnahme CF₃-D-Bpg, sind L-Enantiomere.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Motivation</i>	1
1.2 <i>Biologische Membranen</i>	2
1.3 <i>Wege in die Zelle</i>	3
1.4 <i>Zellpenetrierende Peptide</i>	4
1.5 <i>Transportan</i>	6
1.5.1 Die Entwicklung von Transportan	6
1.5.1.1 Galanin	6
1.5.1.2 Mastoparan	7
1.5.1.3 Transportan	8
1.5.2 Zellpenetrierende Eigenschaften von Transportan	9
1.5.3. Strukturuntersuchungen an Transportan in Mizellen und Bizellen	11
1.5.4 Aggregation von Transportan	12
1.6 <i>Transportan-10</i>	13
1.6.1 Die Entwicklung von Transportan-10	13
1.6.2 Zellpenetrierende Eigenschaften von Transportan-10	14
1.6.3 Toxizität von Transportan-10	18
1.6.4 Aggregation von Transportan-10	18
1.7 <i>Festkörper-NMR-Spektroskopie</i>	19
1.7.1 Strukturanalyse mittels ¹⁹ F-Festkörper-NMR-Spektroskopie	19
1.7.2 Spinwechselwirkungen	20
1.7.2.1 Die Anisotropie der chemischen Verschiebung	20
1.7.2.2 Dipolare Kopplung	21
1.7.3 Einfluss der Molekülbewegung	22
1.7.4 ³¹ P-Festkörper-NMR-Spektroskopie	24
1.8 <i>Fluorierte nicht-proteinogene Aminosäuren</i>	25
1.9 <i>Zirkulardichroismus-Spektroskopie</i>	27
1.10 <i>Orientierte Zirkulardichroismus-Spektroskopie</i>	29
2. Aufgabenstellung	31
3. Materialien und Methoden	32
3.1 <i>Materialien</i>	32
3.1.1 Verwendete Chemikalien	32
3.1.2 Verwendete Geräte	33

3.1.2.1 Festphasenpeptidsynthese	33
3.1.2.2 Massenspektrometrie	33
3.1.2.3 RP-HPLC.....	33
3.1.2.4 Zirkulardichroismus-Spektroskopie	33
3.1.2.5 Fluoreszenzmikroskopie.....	33
3.2.1.6 Orientierte Zirkulardichroismus-Spektroskopie	34
3.1.2.7 Transmissionselektronenmikroskopie	34
3.1.2.8 Festkörper-NMR-Spektroskopie	34
3.2 Methoden	34
3.2.1 Peptidsynthese	34
3.2.1.1 Peptidsynthese am multiplen Synthesizer.....	34
3.2.1.2 Schwellen des Harzes	35
3.2.1.3 Knüpfung der Peptidbindung am multiplen Synthesizer.....	35
3.2.1.4 Manuelle Kupplung der ¹⁹ F-markierten Aminosäure	35
3.2.1.5 Entschützen.....	35
3.2.1.6 Abspaltung vom Harz (Cleavage)	35
3.2.1.7 Testabspaltung vom Harz (Testcleavage).....	36
3.2.1.8 Markierung mit 5,6-Carboxyfluorescein.....	36
3.2.2 Verwendete Elutionsmittel in der RP-HPLC	37
3.2.3. Vorbereitung der Proben für die CD-Spektroskopie.....	37
3.2.3.1 Proben in Phosphatpuffer.....	37
3.2.3.2 Proben in Trifluorethanol/Phosphatpuffer (50% v/v)	37
3.2.3.3 Proben in Vesikeln	37
3.2.4 Durchführung der CD-Experimente.....	38
3.2.5 Vorbereitung der Proben und Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie	38
3.2.6 Antimikrobielle Untersuchungen.....	39
3.2.6.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration.....	39
3.2.6.2 Verwendete Bakterienkulturen	40
3.2.7 Vorbereitung der Proben für die OCD-Spektroskopie	40
3.2.8 Durchführung der OCD-Experimente	40
3.2.9 Vorbereitung der Proben und Durchführung der TEM	41
3.2.10 Vorbereitung der Proben für die ³¹ P- und ¹⁹ F-Festkörper-NMR-Spektroskopie ..	41
3.2.11 Durchführung der ³¹ P- und ¹⁹ F-Festkörper-NMR-Experimente	42
3.2.12 Strukturanalyse	42
4. Ergebnisse	43
4.1 Festphasenpeptidsynthese	43

4.2	<i>CD-Spektroskopie</i>	44
4.2.1	CD-Messungen in wässriger Lösung	44
4.2.1.1	CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga	44
4.2.1.2	CF- und CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga	45
4.2.1.3	CF- markierte TP-Analoga	46
4.2.2	CD-Messungen in TFE/Phosphatpuffer	46
4.2.2.1	CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga	47
4.2.2.2	CF- und CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga	47
4.2.2.3	CF-markierte TP-Analoga	48
4.2.3	CD-Messungen in Lipidvesikeln	48
4.2.3.1	CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga	48
4.2.3.2	CF- und CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga	50
4.2.3.3	CF-markierte TP-Analoga	50
4.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der CD-Spektroskopie	51
4.3	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	51
4.4	<i>Minimale Hemmkonzentration</i>	53
4.5	<i>OCD-Spektroskopie</i>	54
4.5.1	OCD-Spektren der CF ₃ -Bpg markierten TP10-Analoga	54
4.5.1.1	OCD-Spektren der CF ₃ -Bpg markierten TP10-Analoga mit P/L=1:50	54
4.5.1.2	OCD-Spektren der CF ₃ -Bpg markierten TP10-Analoga mit P/L=1:100	58
4.5.1.3	OCD-Spektren der CF ₃ -Bpg markierten TP10-Analoga mit P/L=1:200	62
4.5.2	OCD-Spektren der CF- und CF ₃ -Bpg markierten TP10-Analoga	65
4.5.3	OCD-Spektren der CF- markierten TP-Analoga	69
4.5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der OCD-Spektroskopie	70
4.6	<i>Transmissionselektronenmikroskopie</i>	70
4.7	<i>Festkörper-NMR-Spektroskopie</i>	72
4.7.1	³¹ P-Festkörper-NMR-Spektroskopie	72
4.7.2	¹⁹ F-Festkörper-NMR-Spektroskopie	73
4.7.2.1	¹⁹ F-Festkörper-NMR-Spektren der CF ₃ -Bpg markierten TP10-Analoga	73
4.7.2.2	Strukturanalyse der CF ₃ -Bpg markierten TP10-Analoga	81
4.7.2.3	Einfluss der Lipidkomposition	88
4.7.2.4	¹⁹ F-Festkörper-NMR-Spektren der CF- und CF ₃ -Bpg markierten TP10-Analoga	89
5.	Diskussion	93
5.1	<i>Synthese der ¹⁹F-markierten TP10-Analoga</i>	93
5.2	<i>Einfluss der ¹⁹F-markierten Aminosäure auf Aktivität und Struktur</i>	93

5.3 Festkörper-NMR-Spektroskopie.....	95
5.4 Strukturanalyse	97
5.5 Aggregationsverhalten	101
6. Ausblick.....	108
7. Zusammenfassung.....	109
8. Literatur	111
9. Anhang	116
9.1 Endozytose-Mechanismen.....	116
9.1.1 Phagozytose.....	116
9.1.2 Makropinozytose	116
9.1.3 Caveolae-vermittelte Endozytose.....	116
9.1.4 Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose	117
9.1.5 Clathrin-vermittelte Endozytose	117
9.2 Allgemeine Grundlagen der NMR	117
9.3 Darstellung von CF ₃ -Bpg.....	120
9.4 Allgemeine Methoden der Peptidsynthese.....	121
9.4.1 Klassische Kupplungsreagenzien	121
9.4.2 In situ-Aktivierung mit modernen Kupplungsreagenzien	122
9.4.3 Allgemeines Prinzip der Peptidsynthese an der festen Phase	123
9.5 CD-Spektroskopie	126
9.5.1 CD-Messungen in wässriger Lösung	126
9.5.2 CD-Messungen in TFE/Phosphatpuffer	127
9.5.3 CD-Messungen in Lipidvesikeln	128
9.6. Experimenteller Teil.....	130
9.6.1. Synthese der ¹⁹ F-markierten TP10-Analoga	130
9.6.2 Synthese der Carboxyfluorescein-markierten TP und TP10-Analoga.....	133
9.6.2.1 Synthese der CF ₃ -Bpg- und N-terminal Carboxyfluorescein- markierten TP10-Analoga	133
9.6.2.2 Synthese der N-terminal, C-terminal und innerhalb der Sequenz mit Carboxyfluorescein-markierten Transportan-Analoga.....	134
9.6.3 Aufreinigung der Rohpeptide mittels RP-HPLC	134
9.6.4 Vorbereitung der CD-Proben in Lipidvesikeln	136
9.6.4.1 CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga.....	136
9.6.4.2 Carboxyfluorescein- und CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga.....	137

9.6.4.3 Carboxyfluorescein-markierte Transportan-Analoga.....	137
9.6.5 Vorbereitung der OCD-Proben.....	138
9.6.5.1 CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga.....	138
9.6.5.2 Carboxyfluorescein- und CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga.....	139
9.6.5.3 Carboxyfluorescein-markierte Transportan-Analoga.....	140
9.6.6 Vorbereitung der NMR-Proben.....	140
9.6.6.1 CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga.....	140
9.6.6.2 Carboxyfluorescein- und CF ₃ -Bpg markierte TP10-Analoga.....	141
Publikationsliste	142
Tagungsbeiträge.....	142
Lebenslauf.....	143

1. Einleitung

1.1 Motivation

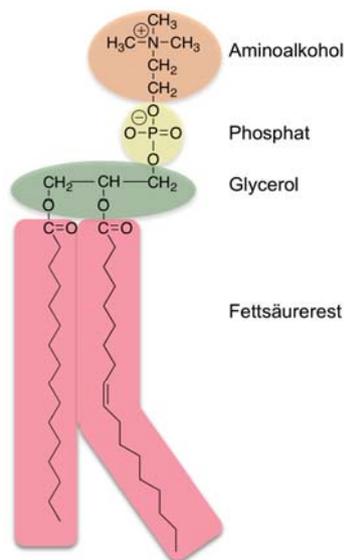
Peptide und Proteine sind in der belebten Welt allgegenwärtig und gehören zu den Grundbausteinen aller lebenden Zellen. Die Funktionen von Proteinen im Organismus sind vielfältig. Sie wirken als Enzyme, Transport- und Speichermoleküle, Gerüstsubstanzen, in der Immunabwehr, als Hormone und Reservestoffe. Da insbesondere Peptide und Peptid-ähnliche Verbindungen in der Lage sind endokrine, neurologische, immunologische und enzymatische Prozesse hochspezifisch und erstaunlich wirksam zu beeinflussen, finden sie in der Medizin vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Membranaktive Peptide, d.h. antimikrobielle, Fusions- und zellpenetrierende Peptide, besitzen ein enormes Potential zur Bekämpfung verschiedenster Krankheiten. Bedingt durch die Fähigkeit vieler Mikroorganismen die Wirkung von antibiotisch aktiven Substanzen abzuschwächen oder ganz zu neutralisieren, d.h. so genannte Antibiotika-Resistenzen zu entwickeln, ist die Suche nach neuen Wirkstoffen eine permanente Aufgabe. Eine Möglichkeit für die erfolgreiche Bekämpfung von Mikroorganismen bieten antimikrobielle Peptide. Zellpenetrierende Peptide können als Transportvektoren von Makromolekülen und damit von Wirkstoffen für neuartige Therapien, wie beispielsweise zur Behandlung von Krebs oder Herzinfarkten¹, zum Einsatz kommen.

Um die Wirkungsweise solcher Substanzen auf molekularer Ebene aufzuklären, müssen zunächst Informationen über deren Struktur und Wechselwirkung mit ihrer natürlichen Umgebung, im konkreten Fall die Wechselwirkung mit der Zellmembran, verfügbar sein. Speziell für membranaktive Peptide ist die Festkörper-Kernresonanzspektroskopie eine geeignete Methode. Sie bedarf allerdings der Einführung geeigneter Nuklide in die zu untersuchende Substanz. Eine Möglichkeit diese Nuklide einzuführen, stellt die Peptidsynthese dar.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der strukturellen Untersuchung des zellpenetrierenden Peptids Transportan-10, dessen Entwicklung und bisher bekannte Eigenschaften nach einem kurzen allgemeinen Überblick über biologische Membranen, Mechanismen der Zellüberquerung und andere zellpenetrierende Peptide im Folgenden vorgestellt werden sollen.

1.2 Biologische Membranen

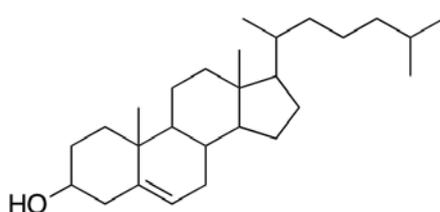
Membranen sind 5 bis 8 nm dicke schichtförmige Strukturen aus Lipiden und darin eingebetteten Proteinen, die die Grenzen einer Zelle markieren und den zytosolischen Raum von der extrazellulären Umgebung abgrenzen². Innerhalb einer Zelle umschließen Membranen Organellen wie Zellkern, Mitochondrien oder Golgi-Apparat und schaffen so Zellkompartimente. Die Membran regelt den Stoffaustausch und Informationsfluss der Zelle. Die Phospholipide, als Hauptbestandteil der Membran, bestehen aus einer polaren Kopfgruppe und einem unpolaren aliphatischen Schwanz. Die Lipide sind zur Ausbildung von Doppelschichten befähigt, wobei die hydrophoben Schwänze miteinander assoziieren und die



hydrophilen Köpfe eine geschlossene Kontaktfläche zur wässrigen Phase bilden. Die wichtigsten in der Membran vorkommenden Lipide sind Phosphatidylcholin (Abbildung 1.1), Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin. Cholesterin (Abbildung 1.2) unterscheidet sich strukturell von den Phospholipiden, besitzt aber ebenfalls einen amphiphilen Charakter.

Abbildung 1.1: Struktur von Phosphatidylcholin als Beispiel für den Aufbau eines Phospholipids.

Die Phospholipidmoleküle können sich innerhalb einer Schicht durch Diffusion frei bewegen, um die eigene Achse rotieren und Schwenkbewegungen ausführen, während ein Wechsel von einer Schicht in die andere („Flip-Flop“) äußerst selten auftritt. Die Fluidität der Membran hängt wesentlich vom Cholesteringehalt ab,



welches benachbarte Alkylketten der Phospholipide immobilisiert und somit die Membran versteift.

Abbildung 1.2: Struktur des Sterols Choleserin.

Von grundlegender Bedeutung für biologische Membranen sind die eingebetteten Membranproteine, die einseitig eingelagert sind oder die Membran vollständig durchspannen. Während die Lipide der Membran eine spezielle Struktur verleihen, wird die Funktion wesentlich von den Membranproteinen bestimmt. Die Membran ist ein dynamisches System, denn wie die Lipide, können auch die Proteine diffundieren. Man bezeichnet sie daher als ein flüssiges Mosaik³ (engl.: fluid mosaic) (Abbildung 1.3).

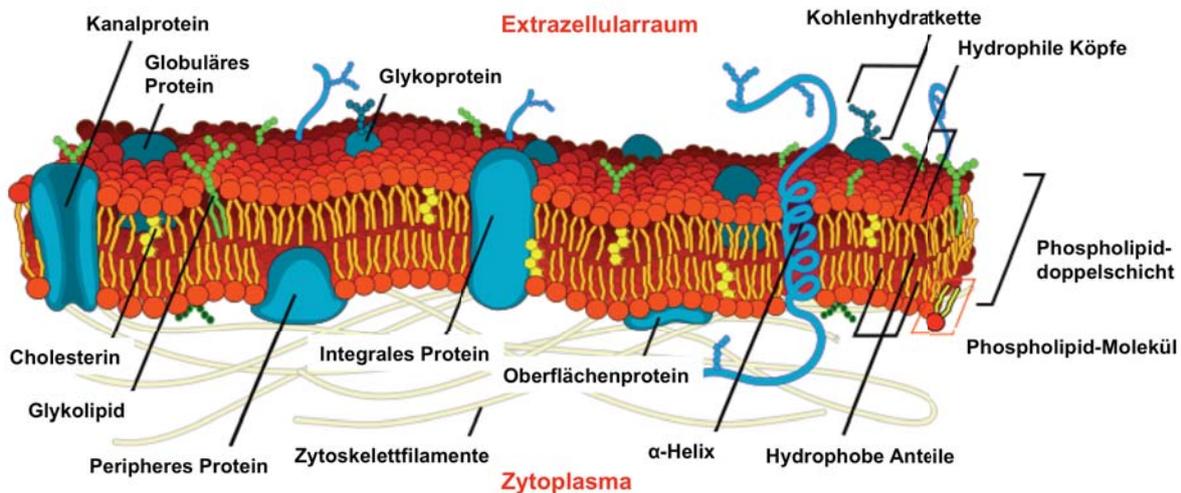


Abbildung 1.3: Flüssik-Mosaik-Modell einer eukaryotischen Zelle übernommen von⁴.

1.3 Wege in die Zelle

Die Zellmembran ist, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, eine dynamische Struktur, die das Zellinnere von der extrazellulären Umgebung abgrenzt und den Ein- und Austritt von kleinen und großen Molekülen in die Zelle bzw. aus ihr heraus reguliert. Kleine Moleküle mit der entsprechenden Polarität oder Nettoladung können die Zellmembran durch Diffusion passieren, andere essentielle kleine Moleküle wie beispielsweise Aminosäuren, Zucker oder Ionen gelangen mittels Ionenpumpen oder über Membrankanäle ins Zytoplasma. Makromoleküle können nur durch Endozytose die Barriere der Zellmembran überwinden. Der Begriff ‚Endozytose‘ umfasst mehrere Mechanismen und wird in zwei große Kategorien unterteilt: Phagozytose und Pinozytose. Phagozytose, oder ‚Zellessen‘ beschreibt die Aufnahme von großen Partikeln und Pinozytose, oder ‚Zelltrinken‘ die Aufnahme von Flüssigkeiten oder gelösten Substanzen. Die Pinozytose umfasst vier verschiedene Mechanismen: Makropinozytose, Clathrin-vermittelte⁵, Caveolae-vermittelte und

Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose⁶, welche im Anhang Kapitel 9.1 näher erläutert werden.

1.4 Zellpenetrierende Peptide

Um die Barriere der Zellmembran überwinden zu können, um membranundurchlässige Moleküle in die Zelle zu befördern, wurden verschiedene chemische und physikalische Methoden entwickelt. Beispiele hierfür sind die Elektroporation, Mikroinjektion und Liposom-Transfektion. Diese Methoden sind allerdings mit Nebenwirkungen verbunden und auf *in vitro* Anwendungen beschränkt. Zellpenetrierende Peptide (CPP's, *engl.*: cell penetrating peptides) können die Zellmembran überqueren ohne deren Stabilität zu beeinträchtigen und dabei Moleküle, die sogenannte ‚Cargo‘ (Fracht, Ladung), in die Zelle schleusen. Die Cargo kann ein kleines Molekül, ein Protein oder ein supramolekulares Teilchen, und somit 100 fach größer als das CPP selbst, sein. Dadurch eröffnen sich neue Möglichkeiten DNA, Oligonukleotide, Proteine oder kleine Effektormoleküle in die Zelle zu transportieren. Darüber hinaus bieten CPP's die Möglichkeit bestimmte Kompartimente in der Zelle gezielt anzusteuern, wie z.B. den Zellkern. Sie sind nicht zellspezifisch und können somit bei allen Zelltypen angewendet werden ohne dabei höchstwahrscheinlich immunogene, antigene oder entzündliche Eigenschaften zu besitzen.

Zellpenetrierende Peptide, die im Normalfall eine Länge von 30 Aminosäuren nicht überschreiten, werden auch als Protein-Transduktions-Domänen (PTD, *engl.*: protein transduction domain), Membran-Translokations-Sequenzen (MTS, *engl.*: membrane translocation sequence) oder trojanische Peptide bezeichnet. Eine einheitliche Klassifizierung von CPP's existiert bisher nicht, aber eine Eigenschaft, die alle zellpenetrierenden Peptide aufweisen, ist Amphiphilie und eine positive Nettoladung. CPP's können in drei Klassen unterteilt werden⁷: erstens Peptide, die sich von einem Protein ableiten, zweitens Modelpeptide und drittens synthetische chimärische CPP's. Von einem Protein abgeleitete Peptide bestehen meistens aus der kleinsten Aminosäuresequenz des jeweiligen Translokationsproteins, das eine effektive Überquerung der Zellmembran ermöglicht. Modelpeptide gehören zu den ‚Designerpeptiden‘, die eine wohldefinierte amphiphile α -helikale Struktur ausbilden oder die Struktur bekannter CPP's nachahmen sollen. Die dritte Klasse der

chimärischen Peptide umfasst CPP's, die aus einer hydrophilen und einer hydrophoben Domäne verschiedenen Ursprungs generiert werden. Der Vorreiter aller CPP's war eine Translokationssequenz im HIV-Tat-Protein, die im Jahr 1988 entdeckt wurde⁸. Einige Jahre später wurde die 60 Aminosäurereste lange Homeodomäne des Antennapedia-Proteins in *Drosophila* entdeckt⁹. Durch gezielte Mutagenese sollte der Translokationsmechanismus dieses Proteins aufgeklärt werden und tatsächlich fanden Derossi et al.¹⁰, dass die dritte Helix für die Überquerung der Zellmembran verantwortlich sein musste. Das daraus abgeleitete Peptid erhielt den Namen Penetratin. Es folgten weitere zellpenetrierende Peptide, wie das synthetisch entwickelte MAP (*engl.*: model amphiphilic peptide)¹¹ und das chimärische Peptid Transportan (TP). Eine Übersicht der Sequenzen einiger zellpenetrierender Peptide zeigt Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1: Beispiele für zellpenetrierende Peptide.

Peptid	Aminosäuresequenz	Ursprung
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	<i>Drosophila Antennapedia</i> Homeodomäne (AS 43-58)
Tat fragment (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ	HIV (AS 48-60)
MAP	KLALKLALKALKKAALKLA-NH ₂	Modelpeptid
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	Chimärisches Peptid
R ₈	RRRRRRRR	Modelpeptid

Tatsächlich war eine Herabregulation des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP, *engl.*: amyloid precursor protein) mithilfe von Penetratin, das mit einer antisense DNA beladen war, möglich¹² und ebenso des Galanin-Rezeptors mithilfe von Transportan, beladen mit einer Peptid-Nukleinsäure (PNA, *engl.*: peptide nucleic acid, in deutsch auch kurz PNS)¹³. CPP's bieten somit die Möglichkeit als Transportvektoren Einfluss auf zellinterne Prozesse zu nehmen ohne oder zumindest kaum schädliche Nebenwirkungen.

Der Mechanismus der Translokation bleibt umstritten. Es wurden endozytotische und nicht-endozytotische Mechanismen diskutiert. Das Hauptargument gegen Endozytose war dabei die erfolgreiche Überquerung der Zellmembran selbst bei niedrigen Temperaturen, die einen endozytotischen Aufnahmemechanismus eigentlich ausschließen. Allerdings zeigten Richards et al.¹⁴ an Tat und R₉, dass

bedingt durch die Zellfixierung Translokationsartefakte auftreten können. Welche physikochemischen Eigenschaften für die Überquerung der Zellmembran verantwortlich sind, bleibt ebenfalls Gegenstand der Kontroverse. Wie oben bereits erwähnt, enthalten die meisten CPP's basische Aminosäuren und besitzen damit eine positive Ladung. Aber Futaki et al.¹⁵ zeigten, dass die Ladung allein nicht der bestimmende Faktor sein kann, da (Arg)₈ erfolgreich die Membran passieren konnte, wohingegen (Arg)₁₆ keine signifikante Translokation zeigte. Der Einfluss von Arginin und damit der Guanidingruppe wurde von Wender et al.¹⁶ untersucht. Ein Homopolymer aus Citrullinresten zeigte dabei keine zellpenetrierenden Eigenschaften. Die Sekundärstruktur scheint ebenfalls einen Einfluss auf die Translokation auszuüben. Im Allgemeinen zeigen CPP's eine α -helikale Sekundärstruktur. Somit stellen zellpenetrierende Peptide eine neue Klasse von Transportvektoren dar, deren mechanistische Aspekte der Translokation genauer untersucht werden müssen.

Transportan-10, ein von Transportan abgeleitetes CPP, welches im Rahmen dieser Arbeit bezüglich struktureller und aggregierender Eigenschaften untersucht wurde, soll im Folgenden vorgestellt werden.

1.5 Transportan

1.5.1 Die Entwicklung von Transportan

Bei der Entwicklung von Peptiden aus zwei unterschiedlichen Fragmenten (chimärischer Ansatz), zeigt das Endprodukt zuweilen unvorhersehbare Eigenschaften, die wesentlich von denen der Ausgangskomponenten abweichen¹⁷.

Transportan ist ein chimärisches Peptid, bestehend aus einem C-terminalen Galanin-Fragment, das durch einen zusätzlichen Lysinrest N-terminal mit dem Peptidtoxin Mastoparan, das eine hohe Affinität gegenüber Membranen aufweist, verknüpft ist.

1.5.1.1 Galanin

Galanin gehört zu den Neuropeptiden, wurde 1978 von der Gruppe um Viktor Mutt am Karolinska Institut, Schweden, entdeckt¹⁸ und besteht aus 29 bzw. 30 Aminosäureresten beim Menschen. Der Name bezieht sich auf die C- und N-

terminalen Reste Gly bzw. Ala. Eine Übersicht über die Peptidsequenzen verschiedener Arten zeigt Tabelle 1.2.

Tabelle 1.2: Aminosäuresequenzen von Galanin in unterschiedlichen Arten.

Tierart	Sequenz
Schwein	GWTLNSAGYLLGPHAIDNHRSFHDKYGLA-NH ₂
Mensch	GWTLNSAGYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS-COOH
Kuh	GWTLNSAGYLLGPHALDSHRSFQDKHGLA-NH ₂
Ratte	GWTLNSAGYLLGPHAIDNHRSFSDKHGLT-NH ₂

Galanin kommt vorwiegend im Zusammenhang mit den klassischen Neurotransmittern im zentralen und peripheren Nervensystem, sowie im Gastrointestinaltrakt vor. Galanin hemmt die Insulinsekretion, die Ausschüttung von Acetylcholin und spielt eine wichtige Rolle bei der Schmerzweiterleitung und dem Fressverhalten. Die N-terminalen Aminosäurereste 1 bis 16 sind für die Bindung an Galaninrezeptoren verantwortlich.

1.5.1.2 Mastoparan

Mastoparan wurde aus Wespengift isoliert und ist ein unspezifisch wirkendes Sekretagogum, ein sekretionsfördernder Stoff mit folgender Aminosäuresequenz:



Es regt die Sekretion von Histamin aus Mastzellen, von Serotonin aus Blutplättchen, Katecholamin aus chromaffinen Zellen und Prolaktin aus der Hypophyse an, wobei angenommen wird, dass die Wirkung von Mastoparan durch G-Proteine vermittelt wird. Higashijima et al.¹⁹ testeten die Wirkung von Mastoparan auf G-Proteine unterschiedlicher Klassen, G_o, G_i, G_t und G_s, wobei eine erhöhte Selektivität für G_i und G_o im Gegensatz zu Transducin und G_s auftrat. Das in wässriger Umgebung unstrukturierte Peptid, bildet in Anwesenheit einer Lipiddoppelschicht eine amphiphile α -helikale Struktur aus und gleicht damit strukturell einer kationischen intrazellulären Schleife in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Es wird daher

angenommen, dass Mastoparan die Plasmamembran überquert und direkt mit den G-Proteinen auf der cytoplasmatischen Seite wechselwirken kann. Es stellt ein Gift dar, das durch Mimikry/Nachahmung von G-Protein-Rezeptor Agonisten wirkt.

1.5.1.3 Transportan

Transportan entstand im Zuge eines Forschungsprojekts der Gruppe von Ülo Langel zur Entwicklung von Liganden für Galaninrezeptoren und war damit eher ein Zufallsprodukt, welches entgegen den Zielbestrebungen zellpenetrierende Eigenschaften aufwies. Die Synthesestrategie basierte auf der Erkenntnis, dass Galanin (1-13) das kleinste mögliche Fragment ist, welches eine genügend hohe Affinität zu Galaninrezeptoren Typ 1 besitzt²⁰. Weiterhin sollte der C-Terminus des chimären Peptids mit der Zellmembran interagieren, weshalb Mastoparan ausgewählt wurde, um die Affinität gegenüber Membranen zu erhöhen. Tatsächlich zeigte das neu entstandene Peptid, dem man den Namen Galparan gab²¹, eine hohe Affinität gegenüber Galaninrezeptoren. Im Gegensatz zum Ausgangspeptid Galanin steigert Galparan jedoch die Ausschüttung von Acetylcholin im Hirn von Ratten²² und stimuliert im Gegensatz zu Mastoparan das Enzym Na^+/K^+ -ATPase in der hippokampalen Membran von Ratten und die Ausschüttung von Insulin in β -Zellen von Ratten²³. Darüber hinaus zeigte Galparan eine völlig unerwartete Wirkung auf die Aktivität von GTPasen. Zorko et al.²⁴ untersuchten den Einfluss von Galparan, im Vergleich zu Mastoparan und Galanin, auf G-Proteine und deren GTPase-Aktivität von kortikalen Membranen aus dem Hirn von Ratten. Mastoparan zeigte dabei einen aktivierenden, Galanin keinerlei und Galparan einen hemmenden Effekt hauptsächlich auf G-Proteine des G_o/G_i -Typs. Es wurde vermutet, dass Galparan mithilfe seines C-terminalen Mastoparananteils, ähnlich wie Mastoparan selbst, an G-Proteine bindet, aber mit dem N-terminalen Galaninteil mit einer zusätzlichen Bindungsstelle wechselwirkt und somit die GTPase-Aktivität möglicherweise allosterisch hemmt. Zur Untersuchung der unerwarteten Eigenschaften, die höchstwahrscheinlich auf besonderen extra- und intrazellulären Prozessen basieren, wurde ein neues markiertes Galparan-Analogon generiert. Die Markierung wurde dabei in die Peptidkette eingeführt, da angenommen wurde, dass der N-Terminus für die Rezeptorbindung verantwortlich ist und somit nicht mit einer Markierung versehen werden sollte. Daher erfolgte eine Substitution von Pro^{13} durch Lys, was

nachweislich in Galanin keinen Einfluss auf die Rezeptorbindung hat²⁵. Die ϵ -Amino-Gruppe des Lysinrests bietet die Möglichkeit bestimmte Markierungen wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffe in die Peptidsequenz einzuführen. Als Markierung diente Biotin, da dieses Molekül eine weniger störende Modifikation der Struktur im Gegensatz zu anderen gängigen Fluorophoren darstellt. In indirekten Immunfluoreszenz-Experimenten konnte das Galparan-Analogon im Gegensatz zu einem ähnlich markierten Galanin-Analogon im Zytoplasma und im Zellkern nachgewiesen werden. Das neu generierte Peptid erhielt den Namen Transportan, in Anlehnung daran, dass dieses Peptid in der Lage war die Zellmembran zu überwinden und damit bestimmte Makromoleküle in die Zelle zu transportieren. Die Sequenzen der neu generierten Peptide zeigt Tabelle 1.3.

Tabelle 1.3: Aminosäuresequenzen von Galparan und Transportan.

Peptid	Sequenz
Galparan	GWTLNSAGYLLGPINLKALAALAKKIL-NH ₂
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂

1.5.2 Zellpenetrierende Eigenschaften von Transportan

Pooga et al.²⁴ zeigten 1998, dass die Internalisierung von Transportan in Bowes Melanomzellen rasch und höchstwahrscheinlich rezeptorunabhängig verläuft.

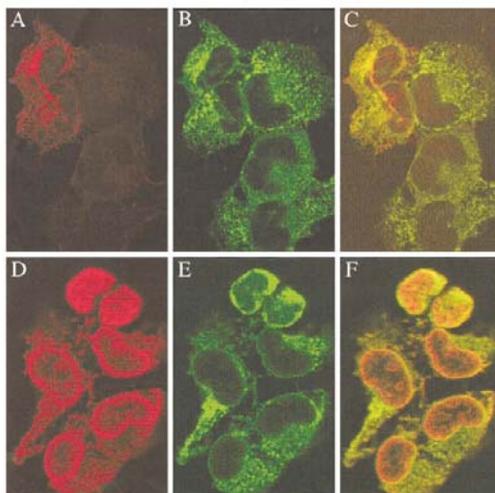


Abbildung 1.4: Internalisierung von Biotinyl-Transportan: Die Inkubation von Bowes Melanomzellen und Biotinyltransportan (10mM) erfolgte bei 0°C (A-C) oder 37°C (D-F) über einen Zeitraum von 60 min. Transportan wurde mithilfe von Streptavidin-Texas-Red visualisiert (B, E) und die Membranen mit Concavalin A-FITC (A, D) gefärbt. Die Überlagerungen zeigen Bilder C und F. Übernommen aus²⁴.

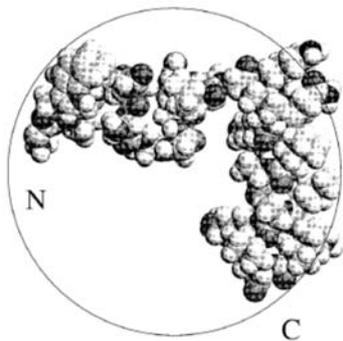
Innerhalb von 1 min bei einer Temperatur von 37°C konnte Biotinyl-Transportan mithilfe von indirekter Immunfluoreszenz im Zytoplasma nachgewiesen werden

(Abbildung 1.4). Im Zellinneren verteilte sich Transportan in der Kernhülle oder in anderen intrazellulären Membranstrukturen und assimilierte sich letztendlich in den Nucleoli. Dabei beschränkte sich die Aufnahme von Transportan nicht auf die Bowes Melanomzelllinie, sondern auch andere Zelllinien, wie HeLa-, COS-7-, Jurkat-Zellen u.a. wurden getestet und zeigten eine Internalisierung von Transportan. Bei niedrigeren Temperaturen (0°C) erfolgte ebenfalls eine Translokation von Transportan in die Zellen, wenn auch in verlangsamer Form, was damals gegen einen endozytotischen Aufnahmemechanismus sprach. Anhand verschiedener Konstrukte wurde die Fähigkeit von Transportan untersucht bestimmte Makromoleküle, die sogenannte ‚Cargo‘, in die Zelle zu befördern²⁶. Transportan konnte Proteine mittlerer Größe (30 kDa), wie z.B. das grün fluoreszierende Protein (Abkürzung GFP; *engl.*: green fluorescent protein), in verschiedene Zelllinien (Bowes Melanom- und COS-7-Zellen) schleusen. Dabei blieb der gefaltete Zustand des Proteins erhalten, erkennbar an der grünen Fluoreszenz, für die eine intakte Faltung des Proteins notwendig ist. Auch größere Proteine (bis zu 150 kDa) wie Avidin-TRITC-Konjugate (TRITC: Tetramethylrhodamin- β -isothiocyanat) konnten mithilfe von Transportan die Zellmembran passieren und ins Zytoplasma gelangen. Die Fähigkeit Zellmembranen zu überqueren ist nicht auf eukaryotische Zellen beschränkt, Chugh et al.²⁷ konnten nachweisen, dass Transportan in Pflanzenzellen internalisiert wird.

Neben der direkten Translokation von Transportan, werden auch endozytotische Aufnahmemechanismen diskutiert. Padari et al.²⁸ untersuchten mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Fluoreszenzmikroskopie Biotinyl-Transportan-Streptavidin- bzw. Biotinyl-Transportan-Avidin-Komplexe. Streptavidin wurde durch kolloidales Gold und Avidin durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Padari et al. beobachteten parallel ablaufende Aufnahmemechanismen wie Makropinozytose, Clathrin-abhängige Endozytose und Caveolae-vermittelte Endozytose, aber auch die direkte Überquerung der Zellmembran wurde diskutiert. Die Temperaturabhängigkeit der Aufnahme der Transportan-Protein-Komplexe stützte diese Theorie, da eine Erniedrigung der Temperatur auf 20°C die Internalisierung merklich verringerte. Die Morphologie und Größe der Vesikel wies darauf hin, dass die Makropinozytose der vorherrschende Translokationsmechanismus ist, durch den Bowes Melanom- und HeLa-Zellen Transportan-Protein-Komplexe aufnehmen.

1.5.3. Strukturuntersuchungen an Transportan in Mizellen und Bizellen

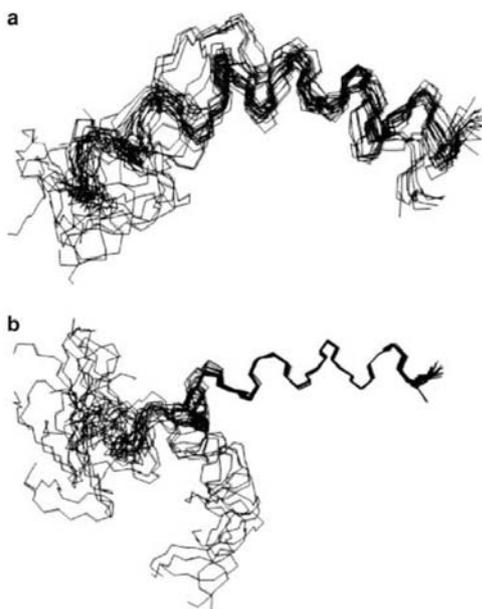
Lindberg et al.²⁹ untersuchten die Struktur von Transportan in SDS-Mizellen mithilfe von Zirkulardichroismus- und Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie. Der α -helikale Anteil von Transportan in SDS-Mizellen betrug demnach 60% im Vergleich zu 75% in Mastoparan. Die Flüssigkeits-NMR-Messungen bestätigten, dass der C-terminale Mastoparanteil des chimärischen Peptids eine wohldefinierte α -helikale Struktur ausbildet, während der N-terminale Galaninteil eine geringere Tendenz zur Ausbildung einer α -Helix zeigt und somit weniger geordnet vorliegt. Mithilfe von NOESY-, TOCSY- und Spin-Label-Experimenten (Linienverbreiterung durch paramagnetische Substanzen) konnte gezeigt werden, dass der C-terminale α -helikale Mastoparanteil am weitesten in den hydrophoben Kern der Mizelle eindringt,



während der weniger geordnete N-terminale Galaninteil sich nahe der Oberfläche der Mizelle anordnet. Somit ergibt sich für Transportan eine geknickte Konformation (Abbildung 1.5).

Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von Transportan in einer SDS-Mizelle. Die gewinkelte Konformation ist deutlich erkennbar. Aus²⁹.

Strukturuntersuchungen in neutralen Phospholipidbizellen ($q=[DMPC/DHPC]=0.33$)



bestätigten diese Resultate³⁰. Der Mastoparanteil bildet eine amphiphile helikale Struktur aus, wobei die hydrophoben Reste der Helix ins Innere der Bizelle orientiert sind.

Abbildung 1.6: Struktur von Transportan in neutralen Bizellen ($q=[DMPC]/[DHPC]=0.33$). Überlagerung von 25 Strukturen mit der geringsten Störungsenergie unter Einbezug der Rückgrat-Atome der Reste 3-26 (a) und 16-26 (b). Übernommen aus³⁰.

Der Galaninteil zeigte ebenfalls ein gewisse Tendenz zur Ausbildung einer amphiphilen, wenn auch strukturell weniger ausgeprägten, Helix. Die Grenze zwischen beiden Teilen und damit der Teil des Peptids, in dem sich der Knick befindet, ist Asn15. Bárány-Wallje et al. postulierten, dass sich das Peptid parallel in der Kopfgruppen-Region der Membranoberfläche anordnet. Eine Überlagerung von 25 simulierten Strukturen mit der geringsten Störungsenergie zeigt Abbildung 1.6. Auch hier ist eine gewinkelte Struktur zu erkennen.

1.5.4 Aggregation von Transportan

Zellpenetrierende Peptide können in monomerer Form oder in Form von Aggregaten/Oligomeren internalisiert werden. Obwohl Transportan in Wasser keine definierte Struktur ausbildet und als Zufallsknäuel vorliegt, können multimere Peptidaggregate entstehen. Mithilfe von Elektrophorese konnte nachgewiesen werden, dass sich biotinyliertes Transportan zu unterschiedlich großen Oligomeren zusammenlagert, wobei die dimere Form überwiegt³¹. Weiterhin wurde bei Fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Experimenten an Biotinyl-Transportan die Ausbildung von großen stabförmigen Strukturen beobachtet, die auf Peptidaggregate hinweisen (Abbildung 1.7). Dabei wird angenommen, dass die Oligomere bereits in Lösung entstehen. Große Agglomerate konnten vor allem bei einer Inkubation von Streptavidin und Biotinyl-Transportan in kleinen Volumina oder hohen Konzentrationen (5 μM) beobachtet werden³². Bei niedrigeren Konzentrationen im Bereich von 0,5 bis 1 μM entstanden hingegen keine Agglomerate.

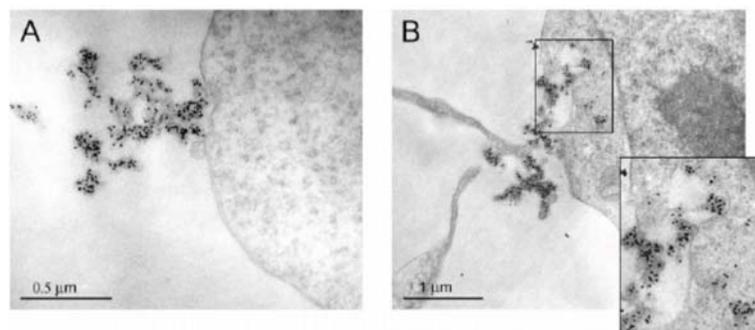


Abbildung 1.7: Wechselwirkung zwischen Transportan-Streptavidin-Agglomeraten und der Plasmamembran von humanen Bowes Melanomzellen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 min mit goldmarkiertem Streptavidin und Biotinyl-Transportan inkubiert. Aus²⁸.

1.6 Transportan-10

1.6.1 Die Entwicklung von Transportan-10

Soomets et al.³³ generierten verschiedene Transportan-Analoga, um die Bereiche der Sequenz zu identifizieren, die für die zellpenetrierenden Eigenschaften verantwortlich sind. Dazu wurden die Penetration der Transportan-Analoga in Bowes Melanomzellen und der Einfluss auf die GTPase-Aktivität in Rin m5F-Zellmembranen untersucht. Die untersuchten Analoga sind in Tabelle 1.4 aufgelistet. Der Großteil der Transportan-Analoga zeigte dem Ursprungspeptid vergleichbare zellpenetrierende Eigenschaften und hatte einen hemmenden Einfluss auf die GTPase-Aktivität. Wurde die Sequenz um sechs Aminosäuren am N-Terminus gekürzt, hatte dies keinen merklichen Einfluss auf die zellpenetrierenden Eigenschaften, während fehlende Aminosäuren am C-Terminus und in der Mitte der Sequenz die Aufnahme in die Zellen verringerte oder ganz verhinderte.

Tabelle 1.4: Aminosäuresequenz und Eigenschaften von Galanin, Mastoparan (MP), Transportan (TP) und den Transportan-Analoga. ,+++’ bedeutet vergleichbare, ,++’ oder ,+’ verminderte, ,+/-’ schwache und ,-’ keine Aufnahme in die Zellen im Vergleich zu Transportan. Die Werte wurden anhand der indirekten Immunofluoreszenz bestimmt. Alle TP-Analoga wurden an der ε-Aminogruppe des fettgekennzeichneten Lysinrests mit Biotin markiert. Die fehlenden Aminosäuren sind durch Punkte gekennzeichnet. Modifiziert nach³³.

Peptid	Aminosäuresequenz	Anzahl der AS	Aufnahme in Zellen		α-helikaler Anteil [%]	GTPase-Aktivität (IC ₅₀ , μM)
			0°C	37°C		
Galanin	GWTLNSAGYLLGPHAVGNHRFSKNGGLTS	30	-	+/-		
MP	INLKALAALAKKIL	14	+	+		
TP	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	27	+++	+++	32	22
TP7	... LNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	24	+++	+++	35	-
TP8 LLGKINLKALAALAKKIL	18	-	+/-	41	-
TP9	GWTLNSAGYLLGK.LKALAALAKKIL	25	+++	+++	46	47
TP10 AGYLLGKINLKALAALAKKIL	21	+++	+++	37	kein Effekt
TP11	GWTLNS..... KINLKALAALAKKIL	21	+	+	38	-
TP12	... LNSAGYLLGK.LKALAALAKKIL	22	++	++	50	58
TP13	... LNSAGYLLGK.... ALAALAKKIL	20	-	+/-	29	-
TP14 AGYLLGK.LKALAALAKKIL	19	++	++	42,5	69
TP15	... LNSAGYLLGK.LKALAALAKK..	19	-	+/-	37	-

Eine Ausnahme bildete Transportan-10 (TP10), das weder die basale GTPase-Aktivität bis zu einer Konzentration von 0,1 mM modulierte, noch mit Galaninrezeptoren wechselwirkte. Dem Peptid TP10 fehlen N-terminal sechs Aminosäuren im Vergleich zum Ausgangspeptid Transportan, wobei der Mastoparanteil vollständig ist. Daher besitzt TP10 einen amphiphilen Charakter. Der hydrophobe Galanin-Schwanz ist deutlich verkürzt, worin eine Ursache für die fehlende Wirkung auf die GTPase-Aktivität vermutet wurde. TP10 kann somit als ‚N-terminal verlängertes Mastoparan‘ betrachtet werden. Für die Anwendung von zellpenetrierenden Peptiden im pharmazeutischen Bereich ist die Vermeidung von Nebenwirkungen von essentieller Bedeutung, was Transportan-10 zu einem vielversprechenden Kandidaten für eine neue Generation von Transportvektoren machte und die Grundlage für diese Arbeit darstellt. Abbildung 1.8 zeigt eine Übersicht der Darstellung von TP10.

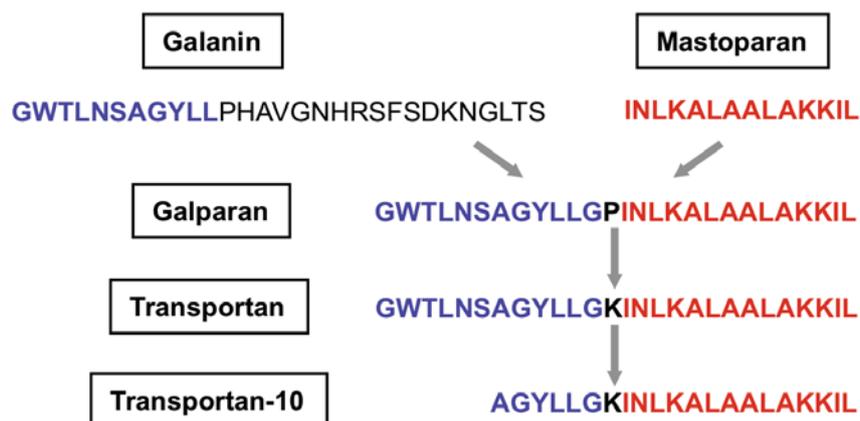


Abbildung 1.8: Darstellung von TP10 aus Galanin und Mastoparan.

1.6.2 Zellpenetrierende Eigenschaften von Transportan-10

Bereits Soomets et al.³³ zeigten, dass TP10 dem Ursprungspeptid Transportan vergleichbare zellpenetrierende Eigenschaften aufweist. TP10 wurde in Immunofluoreszenzexperimenten (Abbildung 1.9) im Zytoplasma und Nukleus von Bowes Melanomzellen detektiert und häufte sich vor allem in intrazellulären Membranstrukturen, wie dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgiapparat, und in der Kernhülle an. Auch hier wurden endozytotische Aufnahmemechanismen vorerst ausgeschlossen, da eine Erniedrigung der Temperatur auf 4°C die Aufnahme in die Zellen nicht merklich beeinflusste.

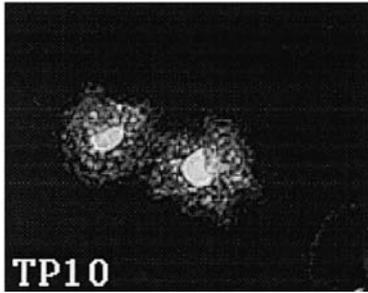


Abbildung 1.9: Aufnahme von TP10 in Bowes Melanomzellen, die mittels Streptavidin-FITC visualisiert wurden. Die Inkubation der Zellen mit dem biotinylierten Peptid in einer Konzentration von 10 μM erfolgte bei 37°C und über einen Zeitraum von 60 min. Übernommen aus³³.

Padari et al.²⁸ untersuchten die zellpenetrierenden Eigenschaften von TP10 unter dem Fokus der Morphologie der Transportvesikel in HeLa- und Bowes Melanomzellen. Die Charakterisierung des zellularen Transports von Komplexen aus Biotinyl-TP10 und Gold-markiertem Streptavidin erfolgte mittels TEM. Die Peptid-Protein-Komplexe assoziierten schnell (innerhalb von 5 bis 10 min) mit der Zelloberfläche. Während die Bindung von großen CPP-Protein-Agglomeraten zur Bildung von Membraneinstülpungen bis hin zu endozytotischen Vakuolen führte, hatten kleine Komplexe keine Auswirkungen auf die Morphologie der Plasmamembran. Bereits nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C konnten die TP10-Streptavidin-Gold-Komplexe in der kortikalen Membran von HeLa- und Bowes Melanomzellen detektiert werden und verteilten sich innerhalb von 1 bis 2 h im Zytoplasma. Die Komplexe befanden sich dabei hauptsächlich in vesikulären Strukturen, aber auch ein nicht zu vernachlässigender Teil der Goldpartikel lag frei im Zytoplasma vor, was die Vermutung nahe legte, dass die Komplexe aus den Vesikeln ‚entfliehen‘ (*engl.*: endosomal escape) können. Bei einer Temperatur von 10°C, die Endozytose ausschließt, konnten TP10-Protein-Komplexe vereinzelt in der Nähe der Plasmamembran und sehr selten in Vesikeln am Rande des Zytoplasmas detektiert werden. Eine Erniedrigung der Temperatur auf 10°C verhinderte die Aufnahme der Komplexe damit nicht komplett, aber die Bildung von großen vesikulären Strukturen und deren Transport zum Zellinneren konnte nicht beobachtet werden. Neben endozytotischen Aufnahmemechanismen könnten somit auch andere Mechanismen, wie die direkte Translokation, für die Zellpenetration von TP10 verantwortlich sein. Bei 4°C erfolgte dagegen keine Aufnahme der TP10-Streptavidin-Komplexe in die Zellen. TP10-Protein-Komplexe können somit parallel mittels verschiedener, aber hauptsächlich endozytotischer, Mechanismen in die Zelle gelangen, wobei nach Padari et al.²⁸ die Morphologie der Vesikel auf

Makropinozytose als den Hauptweg der TP10-Protein-Komplexe in HeLa- und Bowes Melanomzellen betrachtet werden kann.

Desweiteren erforschten Säälük et al.³⁴ den speziellen Endozytose-Mechanismus der Translokation von TP10 mithilfe der Endozytose-Marker Flotillin-1, Caveolin, Rab5 und PI3P in HeLa-Zellen. Konfokale Fluoreszenz- und TEM-Experimente zeigten, dass nur eine vernachlässigbar kleine Überlappung von Avidin/Neutraavidin, dass mittels TP10 in die Zellen transportiert wurde, mit dem Lipidraft-Marker Flotillin-1 und den Markern für frühe Endosomen Rab5 und PI3P auftrat. Jedoch, kolokalisierten 20% der CPP-Protein-Komplexe mit dem Caveolar-Marker Caveolin (Abbildung 1.10).

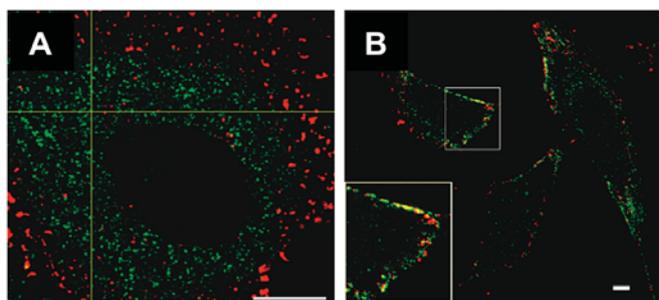


Abbildung 1.10: Lokalisierung von TP10-Protein-Komplexen in HeLa-Zellen in Bezug auf (A) Flotillin-1 und (B) Caveolin. Die Zellen wurden 30 min mit 0,5 µM biotinyliertem TP10 und 0,15 µM Avidin-Texas-Red (rot) inkubiert. Flotillin-1 bzw. Caveolin wurde mittels

Antiflotillin-1 pAb bzw. Anticaveolin pAb und AF488-konjugiertem sekundärem Ab (grün) angefärbt. Aus³⁴.

Die Caveolin-abhängige Endozytose schien folglich der bevorzugte Weg von TP10-Protein-Komplexen in das getestete Zellsystem zu sein.

Ein thermodynamisches Modell der TP10-Phospholipid-Wechselwirkung stellten Yandek et al.³⁵ auf. Die Kinetik der Vesikelbindung von TP10 und der peptid-induzierte Ausfluss des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs (Carboxyfluorescein) aus dem Vesikellumen wurde mittels Stopped-Flow-Fluoreszenzexperimenten untersucht. In Abbildung 1.11 ist das Modell gezeigt. Nach diesem Modell binden die Peptide zuerst an die Oberfläche der Lipiddoppelschicht, wobei deren Akkumulation ein Masseungleichgewicht bewirkt, welches die Doppelschicht unter Spannung versetzt. Eine Überquerung eines TP10-Monomers durch das Innere der Lipiddoppelschicht, unter gleichzeitigem Ausfluss des in dem Vesikel eingeschlossenen Fluoreszenzfarbstoffs, gleicht diese Störung der Membran wieder aus. Ist die Konzentration an Peptid auf beiden Seiten der Membran gleich, kommt dieser Ausfluss zum stoppen, da die Integrität der Membran wieder hergestellt wird.

Die Ladung der Lipide spielte auch eine Rolle, da die Bindung an negativ geladene Lipide wesentlich schneller als an rein zwitterionische erfolgte.

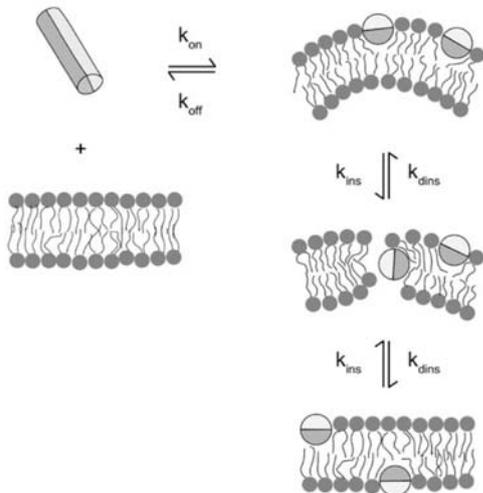


Abbildung 1.11: Schematisches Modell der peptid-induzierten transienten Porenbildung und Translokation der Phospholipiddoppelschicht von TP10. Übernommen aus³⁵.

Desweiteren verlief die Freisetzung des Farbstoffs stufenweise. In Bezug auf die Störung der Membranstruktur spielt auch die Cargo des CPP's eine wichtige Rolle³⁶. Ein

Konstrukt aus biotinyliertem TP10 und dem 55 kDa großen Streptavidin zeigte eine signifikante Abnahme der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs in Membran-Leakage-Experimenten („Ausfluss“) im Vergleich zu biotinyliertem TP10 oder einem 5,4 kDa großen TP10-PNA-Konstrukt (*engl.*: peptide nucleic acid). Daher könnte der bevorzugte Mechanismus der Überquerung der Zellmembran ohne eine hydrophile Cargo die direkte Translokation über eine transiente Pore sein, während das Peptid mit einer hydrophilen Cargo möglicherweise nur mittels Endozytose in die Zellen aufgenommen werden kann.

Die Eigenschaften von TP10 als Vektor für den Import von Plasmiden wurde von Kilk et al.³⁷ mittels verschiedener Plasmidübertragungstest *in vitro* untersucht. Dabei wurden TP10 allein, TP10-PNA- und TP10-PEI-Konstrukte (*engl.*: polyethyleneimine) in Bezug auf die Übertragung eines EGFP- (*engl.*: enhanced green fluorescent protein) oder Luziferase-kodierenden Plasmids in drei verschiedene Zelllinien getestet. TP10 allein, ohne die Zugabe von DNA-kondensierenden Substanzen, bewirkte keine Transfektion. Die Bindung von TP10 an PEI oder DNA mithilfe eines geeigneten Linkers oder die Zugabe von freiem TP10 und die Zugabe von TP10-PNA-Konstrukten erhöhte jedoch die Transfektionseffizienz erheblich. Eine wichtige Rolle spielte dabei, dass die höchste Effizienz bei niedrigen PEI-Konzentrationen auftrat, was die Toxizität reduziert und somit für die medizinische Anwendung des Systems von enormer Bedeutung ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zellpenetrierenden Eigenschaften von TP10 maßgeblich von der Cargo beeinflusst werden, mit der das Peptid verknüpft ist.

1.6.3 Toxizität von Transportan-10

In fluoreszenzmikroskopischen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass TP10 die Fähigkeit besitzt in Gram-positive und Gram-negative Bakterien und in Pilze einzudringen³⁸. TP10 akkumulierte sich dabei rasch innerhalb weniger Minuten an der Zelloberfläche bevor es ins Zytoplasma gelangte. Weiterhin hemmte TP10 das Wachstum von *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*, zeigte aber keine hämolytischen Effekte in HeLa-Zellen. Sogar in Anwesenheit von HeLa-Zellen und ohne deren Schädigung, konnte TP10 *S. aureus* permeabilisieren und damit abtöten. Die Toxizität von TP10 gegenüber Krebszellen (K562, Leukämie und MDA-MB-231, Brustkrebs) wurde mittels Laktatdehydrogenase-Leakage-Experimenten untersucht³⁹, wobei TP10 ein signifikanten Einfluss zeigte. Die Toxizität in Abhängigkeit der Cargo testeten El-Andaloussi et al.⁴⁰ anhand von TP10, beladen mit dem Fluorophor Carboxyfluorescein, doppelsträngiger DNA oder einem Protein (Streptavidin und Avidin). Doppelsträngige DNA und Streptavidin/Avidin schienen dabei die Toxizität von TP10 zu senken, wohingegen N-terminal Carboxyfluorescein-markiertes TP10 eine höhere Toxizität im Vergleich zum freien also unbeladenen Peptid aufwies. Desweiteren konnte eine antiparasitäre Wirkung von TP10 gegen den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* und den Erreger der Nagana-Seuche *Trypanosoma brucei brucei* (infiziert Nutztiere wie Ziegen, Schafe und Rinder) nachgewiesen werden⁴¹.

1.6.4 Aggregation von Transportan-10

Ähnlich dem Ursprungspeptid TP konnten in elektronenmikroskopischen Experimenten vor allem bei hohen Konzentrationen größere ausgedehnte Agglomerate von biotinyliertem TP10 und Streptavidin detektiert werden (vergl. Padari et al.²⁸). Auch an der Oberfläche von Bakterienzellen trat TP10 in akkumulierter Form auf (vergl. Nekhotiaeva et al.³⁸). Inwieweit diese Oligomerisierung die Translokation in die Zelle beeinflusst bleibt Gegenstand der Forschung.

1.7 Festkörper-NMR-Spektroskopie

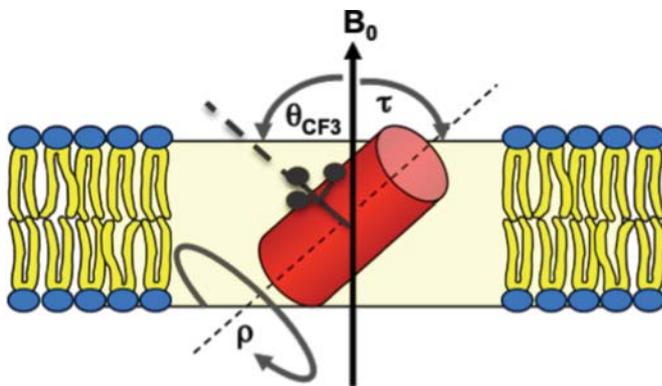
1.7.1 Strukturanalyse mittels ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Wirkungsweise von membranaktiven Peptiden ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Um den Mechanismus auf molekularer Ebene zu verstehen, ist es essentiell die Struktur und Wechselwirkung dieser Peptide mit Lipiddoppelschichten zu untersuchen, wozu die Festkörper-NMR-Spektroskopie^{42,43} besonders geeignet ist. Sie hat gegenüber anderen Methoden wie z.B. der Röntgenstrukturanalyse den Vorteil, dass Peptide und Lipide in voll hydratisierten flüssig-kristallinen Membranen untersucht werden können. In der Regel werden für NMR-Messungen Markierungen mit Nukliden wie ^{15}N , ^{13}C oder ^2H verwendet, wodurch die Eigenschaften eines Moleküls kaum beeinflusst werden. Der ^{19}F -Kern^{44,45} besitzt nach ^1H im Vergleich zu anderen Spin-1/2-Kernen wie ^{13}C , ^{15}N oder ^{31}P das größte gyromagnetische Verhältnis. Daher ist dieser Kern durch eine hohe NMR-Empfindlichkeit (83% im Vergleich zu ^1H) und starke dipolare Kopplungen charakterisiert und somit für die Untersuchung von Peptiden in geringen Konzentrationen geeignet. Weiterhin ist kein störendes Hintergrundsignal zu erwarten, da Fluor nicht natürlich in Peptiden vorkommt. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, muss die ^{19}F -Sonde starr und genau definiert am Peptidrückgrat positioniert sein, so dass die strukturelle Information exakt interpretiert werden kann. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Substitution von ^1H durch ^{19}F die Struktur und Eigenschaften eines Moleküls verändern kann. Das Ziel von ^{19}F -Festkörper-NMR-Messungen⁴² ist die Bestimmung der Orientierung eines (fluormarkierten) Peptids mit einer bekannten Sekundärstruktur wie z.B. einer α -Helix in einer Lipiddoppelschicht. Dazu werden im Allgemeinen folgende Parameter (Abbildung 1.12) benötigt:

- a) der Winkel θ der CF_3 -Gruppe relativ zum Magnetfeld B_0 ,
- b) der Winkel τ , der den Neigungswinkel der Helixachse zur Membrannormalen M_N , die parallel zum externen Magnetfeld B_0 verläuft, beschreibt,
- c) der azimuthale Rotationswinkel ρ um die Helixachse
- d) und der Ordnungsparameter S_{mol} , welcher eine Aussage über die Beweglichkeit der Helix ermöglicht

Der Winkel θ spiegelt die lokale Orientierung der NMR-Sonde relativ zum externen Magnetfeld wider und kann im Fall der CF_3 -Gruppe durch die gemessene dipolare

Kopplung berechnet werden (siehe Kapitel 1.7.2). Da meist die stereochemische Anordnung der fluormarkierten Sonde bekannt ist, können dann aus mehreren einzeln ermittelten Werten von θ an unterschiedlichen markierten Positionen die drei



anderen Parameter S_{mol} , τ und ρ bestimmt werden. Um genauere Information über die Struktur erhalten zu können, müssen mindestens vier Positionen eines zu untersuchenden Peptides mit ^{19}F markiert werden.

Abbildung 1.12: Strukturparameter für ein α -helikales Peptid⁴⁶.

1.7.2 Spinwechselwirkungen

Man unterscheidet zwischen internen und externen Spinwechselwirkungen. Zu den externen Wechselwirkungen gehört die im Anhang Kapitel 9.2 beschriebene Zeeman-Aufspaltung, die durch das Anlegen eines statischen Magnetfelds B_0 verursacht wird. Zu den internen Wechselwirkungen gehören die chemische Verschiebung, die durch die elektronische Umgebung des NMR-aktiven Kerns bestimmt wird, die dipolare Kopplung der Spins über den Raum und die J-Kopplung, die durch die Wechselwirkung von Bindungselektronen zustande kommt. Bei Kernen mit einem Spin $I > 1/2$ (z.B. ^2H) existieren, verursacht durch eine nicht-sphärische Ladungsverteilung, zusätzlich quadrupolare Wechselwirkungen. Im Folgenden wird auf die chemische Verschiebung und die dipolare Kopplung näher eingegangen, da hauptsächlich diese beiden Wechselwirkungen für die ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie von Bedeutung sind.

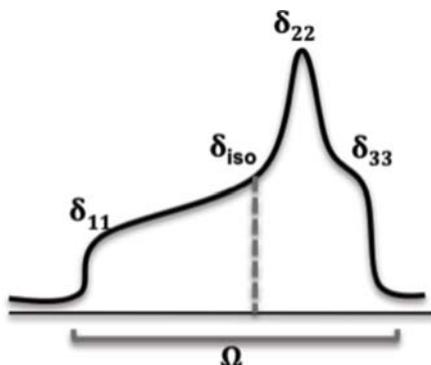
1.7.2.1 Die Anisotropie der chemischen Verschiebung

Das effektive Magnetfeld, welches ein Kern ‚spürt‘, wird von seiner elektronischen Umgebung beeinflusst, da die den Atomkern umgebenden Elektronen ihrerseits ein lokales Magnetfeld induzieren, das mit dem externen Magnetfeld wechselwirkt. Durch diese Ab- oder Entschirmung wird die Resonanzfrequenz des Kerns leicht verändert.

Dieser als chemische Verschiebung bezeichnete Effekt wird in ppm (*engl.*: parts per million) der Larmorfrequenz ν_0 angegeben, da das induzierte Magnetfeld um einen Faktor 10^6 kleiner ist als B_0 .

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6 \text{ ppm}$$

Durch die nicht-sphärische Verteilung der Elektronenwolken ergibt sich eine Orientierungsabhängigkeit der chemischen Verschiebung, die als Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA, *engl.*: chemical shift anisotropie) bezeichnet wird. In Lösung wird dieser Effekt durch die schnelle Bewegung der Moleküle ausgemittelt und ist somit nur anisotropen Medien, wie Festkörpern, detektierbar. Mathematisch lässt sich diese Orientierungsabhängigkeit (Anisotropie) durch einen CSA-Tensor beschreiben, einer 3×3 -Matrix, die sich als ein Ellipsoid mit den drei verschiedenen Hauptachsen δ_{11} , δ_{22} und δ_{33} darstellen lässt. Dabei gilt $\delta_{11} \geq \delta_{22} \geq \delta_{33}$ und δ_{11} beschreibt das CSA-Tensor-Element, welches am wenigsten abgeschirmt ist und somit die höchste Resonanzfrequenz besitzt. Der isotrope Wert der chemischen Verschiebung ergibt sich aus $\delta_{iso} = (\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33})/3$. Ein typisches Pulverspektrum (Abbildung 1.13)



besteht aus der Überlagerung aller im Raum möglichen Orientierungen und deckt den Frequenzbereich Ω ab. Dabei spiegelt die Intensität des Signals bei einer bestimmten Frequenz die Anzahl der Tensoren mit gleicher Orientierung relativ zum externen Magnetfeld B_0 wider.

Abbildung 1.13: Pulverspektrum.

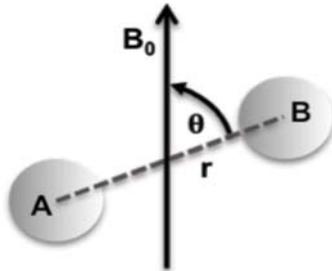
1.7.2.2 Dipolare Kopplung

Die Wechselwirkung der magnetischen Dipolmomente μ zweier Kerne, die sich in unmittelbarer Nähe befinden, resultiert in der dipolaren Kopplung (in Hz), wodurch das NMR-Signal aufgespalten wird. Die allgemeine dipolare Kopplungskonstante zweier Spins A und B ist definiert als:

$$D = \gamma_A \gamma_B \hbar \mu_0 / 2\pi r^3$$

Damit ist die Stärke der dipolaren Kopplung vom Abstand r (in Å) der beiden Kerne abhängig. Durch die Axialsymmetrie des dipolaren Tensors, variiert die Aufspaltung Δ_{AB} mit dem Winkel θ des Vektors der Kernverbindungsachse der beiden Spins und B_0 (Abbildung 1.14):

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



Die Proportionalitätskonstante Δ_{AB} repräsentiert dabei die maximal mögliche Aufspaltung bei $\theta = 0$.

Abbildung 1.14: Abhängigkeit der dipolaren Kopplung zweier Kerne A und B vom Abstand r und Winkel θ .

1.7.3 Einfluss der Molekülbewegung

Bei der Strukturanalyse von Biomolekülen muss auch der Einfluss der Molekülbewegung berücksichtigt werden. Beispielsweise führt jede schnelle Rotation zu einer Projektion aller Spinwechselwirkungen auf die Rotationsachse. Es gilt für den vom Winkel θ abhängigen Term der dipolaren Kopplung:

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

Dabei bezeichnet β den Winkel zwischen der Kernverbindungsline und der Rotationsachse und α den Winkel zwischen der Rotationsachse und B_0 . Die dipolare Kopplung einer schnell rotierenden CF_3 -Gruppe wird damit um den Faktor

$$\langle 3\cos^2 90^\circ - 1 \rangle / 2 = -1/2$$

reduziert, da der Vektor der Kernverbindungsline orthogonal zur Rotationsachse ist. Zusätzlich zur Rotation der CF_3 -Gruppe diffundiert ein kleines Molekül oder Peptid in flüssig-kristallinen Membranen bei Raumtemperatur um die Membrannormale N , falls keine Aggregation oder Oligomerisierung stattfindet. Somit rotiert auch die CF_3 -Gruppe, die starr am Peptidrückgrat fixiert ist, um die Membrannormale N (Abbildung 1.15). In diesem Fall beschreibt β den Winkel zwischen der Methylachse der CF_3 -Gruppe und der Membrannormalen N und α den Winkel zwischen N und dem Magnetfeld B_0 .

Für die dipolare Kopplung einer orientierten Probe mit $\alpha=0^\circ$ (die Membrannormale N ist damit parallel zum Magnetfeld B_0) und $\theta=\beta$ gilt:

$$\Delta_{CF_3} = \Delta_{CF_3}^0 \langle 3\cos^2 \beta - 1 \rangle / 2$$

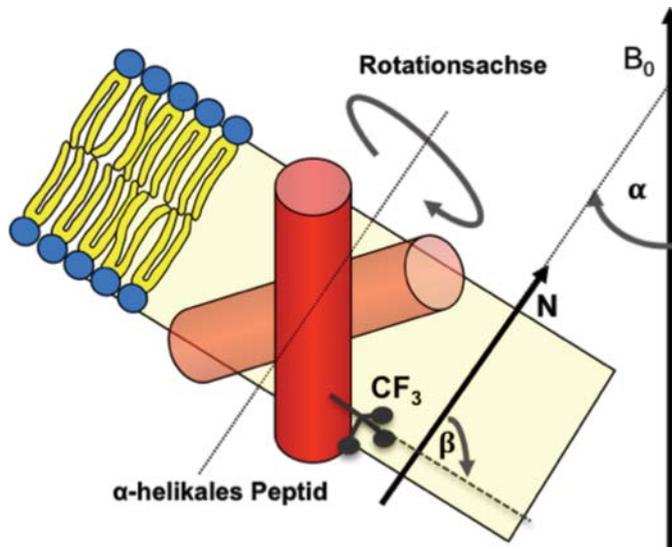


Abbildung 1.15: Rotation eines α -helikalen CF_3 -markierten Peptids um die Längsachse der Lipiddoppelschicht.

Damit ist die experimentell bestimmte dipolare Aufspaltung Δ_{CF_3} nur vom zeitlich gemittelten Winkel β zwischen der CF_3 -Achse (Abbildung 1.15) und der Membrannormalen N abhängig. In

diesem Fall ($\alpha=0^\circ$) kann allerdings nicht bestimmt werden, ob ein Molekül einer Rotation unterliegt oder nicht. Die Unterscheidung dieser beiden Fälle wird durch die Bestimmung der dipolaren Kopplung bei einem Winkel $\alpha \neq 0^\circ$ möglich. Beispielsweise vermindert sich die dipolare Kopplung bei einem Winkel von $\alpha=90^\circ$ um den Faktor -1/2 (Abbildung 1.16), wodurch die Rotation um die Längsachse der Membran bewiesen wird. Es gilt:

$$\Delta_{CF_3} = \Delta_{CF_3}^0 \langle 3\cos^2 \beta - 1 \rangle / 2 \times \langle 3\cos^2 \alpha - 1 \rangle / 2$$

$$\alpha = 0^\circ \rightarrow \Delta_{CF_3} = \Delta_{CF_3}^0 \langle 3\cos^2 \beta - 1 \rangle / 2$$

$$\alpha = 90^\circ \rightarrow \Delta_{CF_3} = (-1/2) \Delta_{CF_3}^0 \langle 3\cos^2 \beta - 1 \rangle / 2$$

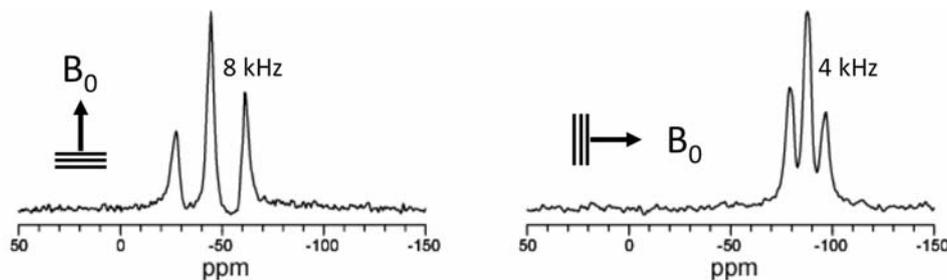


Abbildung 1.16: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren einer orientierten Probe, die die dipolare Kopplung bei einer Ausrichtung der Probe von 0° (links) und 90° (rechts) in Bezug auf das Magnetfeld B_0 zeigen.

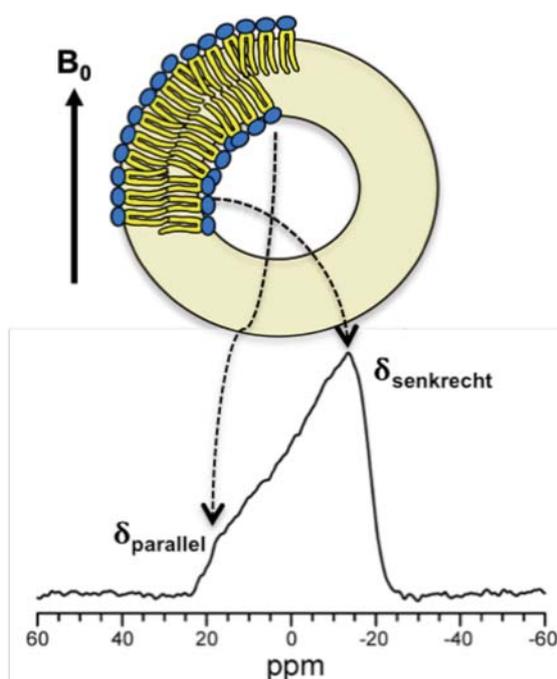
Darüber hinaus beeinflussen lokale Oszillationen oder ein Taumeln des gesamten Moleküls die dipolare Kopplung. Dieser Art von Bewegung wird durch einen Ordnungsparameter S_{mol} Rechnung getragen, der Werte zwischen 0 (große Beweglichkeit, nahezu isotropes Verhalten) und 1 (eingeschränkte Beweglichkeit) annehmen kann. Für die dipolare Kopplung einer CF_3 -Gruppe gilt somit:

$$\Delta_{CF_3} = \Delta_{CF_3}^0 (3\cos^2 \beta - 1)/2 \times S_{mol}$$

dabei bezeichnet β den zeitlich gemittelten Winkel zwischen dem betrachteten Spinwechselwirkungstensor und der Membrannormalen N .

1.7.4 ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektroskopie

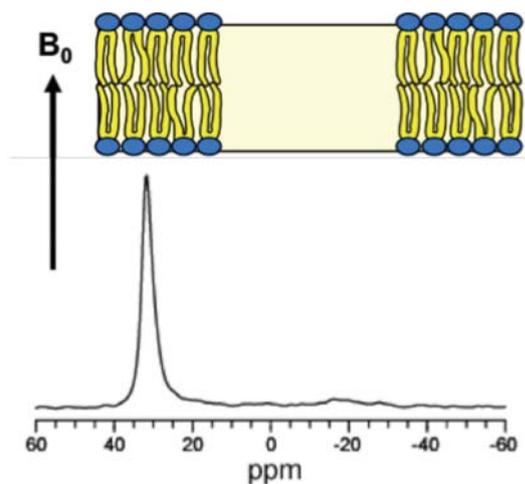
Mithilfe der ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektroskopie ist es möglich das Verhalten von Lipiden und die Qualität der rekonstituierten ^{19}F -NMR-Proben zu untersuchen. Die Phosphatgruppe enthält das zu 100 Prozent in der Natur vorkommende Isotop ^{31}P mit dem Kernspin $I=1/2$, weshalb für ^{31}P -NMR-Messungen von Lipiden keine Isotopenmarkierung notwendig ist. Modellmembranen bestehen aus Lipiddoppelschichten, in denen die Lipide im flüssig-kristallinen Zustand schnell um die eigene Achse rotieren. Die chemische Verschiebung des Phosphors in der Phosphatgruppe ist abhängig von deren Orientierung relativ zum statischen Magnetfeld B_0 . Durch die eingeschränkte Beweglichkeit der Membran ist die



chemische Umgebung eines Lipids stark anisotrop, und nur dessen Rotation um die eigene Längsachse führt zur partiellen Mittelung der chemischen Verschiebung. Damit sind auch die lokalen elektronischen Gegebenheiten und die chemische Verschiebung für eine bestimmte Orientierung festgehalten.

Abbildung 1.17: Orientierungsabhängigkeit des ^{31}P -NMR-Pulverspektrums von Liposomen.

Aus der Summe aller Resonanzfrequenzen, gewichtet über die Häufigkeit der verschiedenen Orientierungen, ergibt sich für die kugelförmigen Liposomen ein sogenanntes ^{31}P -NMR-Pulverspektrum (Abbildung 1.17). Dessen chemische Verschiebungsanisotropie wird durch den Hochfeld-Peak und die Tieffeld-Schulter definiert, da die Verschiebung der Lipide, die parallel zum Magnetfeld orientiert sind



(0°), bei einem tieferen Feld zu finden ist, als die der Lipide die senkrecht (90°) dazu orientiert sind. Desweiteren repräsentiert die Intensität der Signale, genauer deren Fläche, die Anzahl der beitragenden Resonanzfrequenzen in Abhängigkeit zum externen Magnetfeld B_0 .

Abbildung 1.18: Charakteristisches ^{31}P -Spektrum für eine orientierte Phospholipidprobe mit einer 0° -Orientierung (relativ zum Magnetfeld B_0).

Bei einem Liposom sind die mit 90° zum Magnetfeld orientierten Phosphatgruppen stark überpräsentiert, während nur wenige Phosphatgruppen mit 0° -Orientierung zum Magnetfeld vorhanden sind. Das ^{31}P -NMR-Spektrum von Lipiden, die zwischen Glasplättchen orientiert sind (Abbildung 1.18), ist durch einen scharfen Peak charakterisiert, da alle Lipide parallel zum Magnetfeld orientiert sind.

1.8 Fluorierte nicht-proteinogene Aminosäuren

In dieser Arbeit wurde die ^{19}F -markierte Aminosäure CF_3 -Bicyclopentylglycin (CF_3 -Bpg) für die Festkörper-NMR-Strukturuntersuchungen verwendet, das anstelle von Gly, Leu und Ile in die Peptidsequenz inkorporiert wurde (Abbildung 1.19).

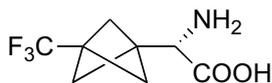


Abbildung 1.19: Struktur von CF_3 -Bicyclopentylglycin.

Die chemische Synthese von CF_3 -Bpg⁴⁷ ist im Anhang Kapitel 9.3 dargestellt. In Bezug auf die Hydrophobizität eignet sich CF_3 -Bpg eher zur Substitution der

unpolaren proteinogenen Aminosäuren Leu, Ile oder Met und bietet gegenüber anderen ^{19}F -markierten Aminosäuren entscheidende Vorteile. CF_3 -Bpg, das eine CF_3 -Gruppe trägt, die starr am Peptidrückgrat fixiert ist, unterliegt während der Peptidsynthese keiner Razemisierung und kann daher als reines *L*- oder *D*-Enantiomer in die Peptidsequenz eingeführt werden. Die räumliche Trennung des C^α -Atoms und der CF_3 -Gruppe durch das gesättigte Bicyclo-[1,1,1]-pentan verhindert elektronenziehende Effekte, wie sie bei aromatischen Ringsystemen auftreten. Anhand des antimikrobiellen Peptids PGLa konnte gezeigt werden, dass eine Substitution von Ala und Ile durch CF_3 -Bpg möglich ist und dass die Einführung der ^{19}F -markierten Aminosäure keinen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der Sekundärstruktur hat⁴⁸. Die Aufreinigung der Rohpeptide und die Identifizierung der Epimere wird somit erleichtert, was den entscheidenden Vorteil von CF_3 -Bpg gegenüber anderen ^{19}F -markierten Aminosäuren wie beispielsweise CF_3 -Phg⁴⁹ (Abbildung 1.20), das standardmäßig als racemisches Gemisch eingesetzt wird, darstellt. Der Versuch die enantiomerenreine Aminosäure zu inkorporieren, würde unter den durch DIPEA hervorgerufenen basischen Bedingungen wiederum zu einem epimeren Produkt führen (Abbildung 1.21). Das azide C^α -Proton wird durch die Base abstrahiert und da die anschließende Reprotonierung des resonanzstabilisierten Anions auf beiden Seiten des planaren Moleküls stattfinden kann, resultieren sowohl das *D*- als auch das *L*-Enantiomer der Aminosäure.

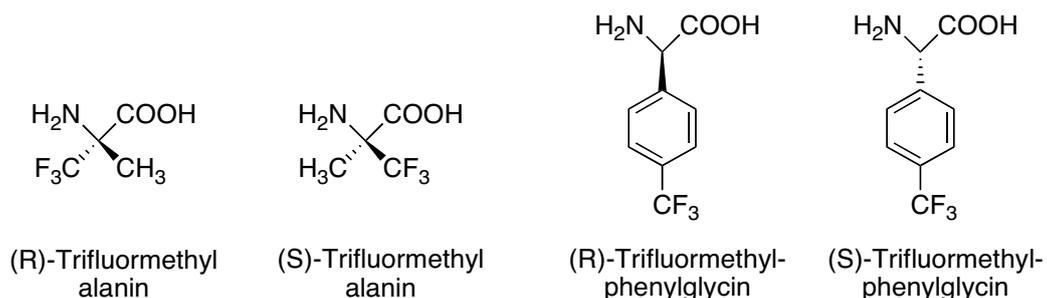


Abbildung 1.20: Struktur der ^{19}F -markierten Aminosäuren TfmAla und CF_3 -Phg.

Darüber hinaus ist es möglich CF_3 -Bpg mit Standardmethoden, wie z.B. der sequentiellen SPPS, in die Peptidsequenz einzuführen. Beispielsweise ist die Inkorporation von Trifluormethylalanin (TfmAla) (Abbildung 1.20) mit Schwierigkeiten verbunden und kann deshalb nicht mit Standardmethoden erfolgen. Der elektronenziehende Effekt der Tfm-Gruppe wirkt deaktivierend auf die Aminofunktion

und behindert den Angriff auf eine aktivierte Carboxylgruppe und damit die Bildung der Peptidbindung. Durch den sterischen Anspruch der Tfm-Gruppe wird die Knüpfung der Peptidbindung zusätzlich erschwert.

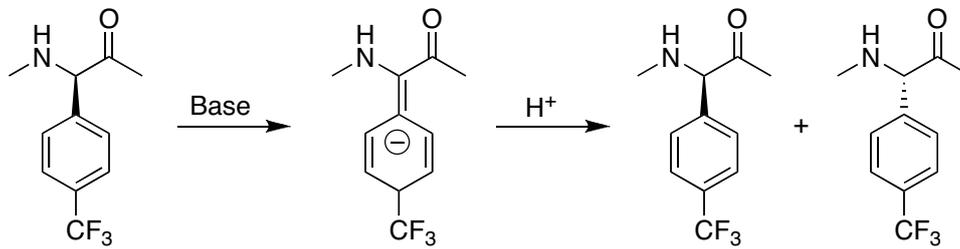


Abbildung 1.21: Razemisierung von CF₃-Phg.

1.9 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Mithilfe der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (*engl.*: CD = circular dichroism spectroscopy) lässt sich die Struktur von Proteinen oder kleinen Peptiden in Lösung untersuchen. Der CD-Effekt beruht auf der unterschiedlich starken Absorption von zwei gleich großen zirkular polarisierten Komponenten, d.h. zwei gegenläufig um die Ausbreitungsrichtung mit gleicher Frequenz rotierenden, zirkular polarisierten E-Feldvektoren E_L = links und E_R = rechts. Die Überlagerung dieser zwei zirkular polarisierten Lichtwellen führt wiederum zu linear polarisiertem Licht. Falls beim Durchtritt von linear polarisiertem Licht durch eine Probe diese zwei Komponenten nicht oder im selben Ausmaß absorbiert werden, führt die Rekombination beider Komponenten wieder zu linear polarisiertem Licht; falls die Probe die E_L - und E_R -Komponente jedoch unterschiedlich stark absorbiert, resultiert elliptisch polarisierte

Strahlung (Abbildung 1.22).

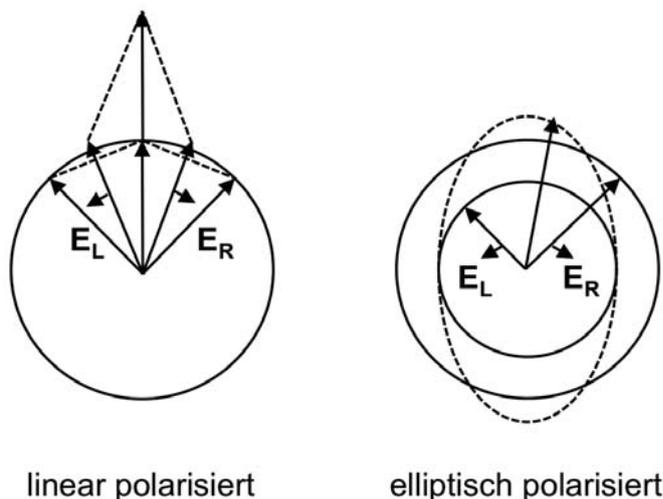


Abbildung 1.22: Der CD-Effekt. Links: die zwei E-Feldvektoren besitzen die gleiche Amplitude, die Kombination beider Komponenten resultiert in linear polarisiertem Licht. Rechts: die unterschiedliche Amplitude der zwei Komponenten resultiert in elliptisch polarisiertem Licht. Übernommen aus⁵⁰.

Die Messgröße eines CD-Spektropolarimeters ist die Absorptionsdifferenz zwischen links und rechts zirkular polarisiertem Licht.

$$\Delta A = A_L - A_R$$

Sie wird üblicherweise als Elliptizität

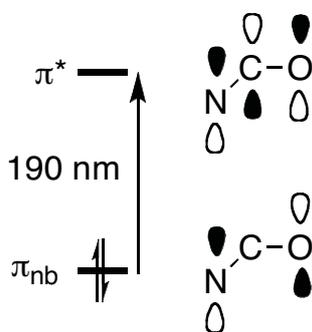
$$\theta = \arctan(b/a)$$

mit b als kleiner und a als großer Halbachse der Ellipse angegeben.

Es gilt:

$$\theta = 32,98 \Delta A$$

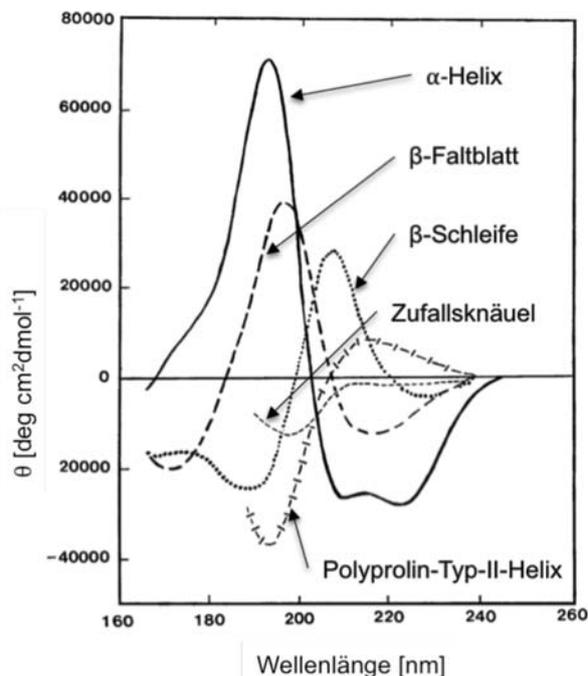
Der CD-Effekt tritt nur bei optisch aktiven, d.h. chiralen Proben auf. Bei Peptiden oder



Proteinen befindet sich in der Nähe des Chiralitätszentrums ein Chromophor, die Peptidbindung, die zwischen 180 und 260 nm durch $n \rightarrow \pi^*$ - und $\pi \rightarrow \pi^*$ - Übergänge absorbiert (Abbildung 1.23).

Abbildung 1.23: Elektronischer Übergang aus einem nichtbindenden (π_{nb}) in ein antibindendes (π^*) Molekülorbital einer Amidbindung.

Beispielsweise führt in einem Peptid mit einer α -helikalen Sekundärstruktur die Anregung der nichtbindenden π -Elektronen und der ungepaarten Elektronen des



Sauerstoffs in antibindende π -Orbitale (π^*) zu den charakteristischen Banden um 190 und 220 nm. Dadurch werden charakteristische CD-Banden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente erzeugt (Abbildung 1.24).

Abbildung 1.24: Charakteristisches CD-Spektrum für eine α -Helix, ein β -Faltblatt, eine β -Schleife, eine Polyprolin-Helix und eine ungeordnete Struktur (Zufallsknäuel). Übernommen aus⁵⁰.

Da sich die Tertiärstruktur eines Proteins zumeist aus mehreren Sekundärstrukturelementen zusammensetzt, stellt das resultierende CD-Spektrum eine Linearkombination aus Spektren der reinen Strukturelemente dar. Mithilfe von mathematischen Algorithmen, welche Referenzdaten bekannter Proteine aus Strukturuntersuchungen mittels Röntgenkristallographie nutzen, ist es möglich den Anteil der verschiedenen Strukturelemente eines strukturell unbekanntes Proteins aus dessen gemessenem CD-Spektrum abzuschätzen. Beispiele hierfür sind die Algorithmen SELCON⁵¹, CDSSTR⁵² oder CONTIN⁵³. Im Gegensatz zu hochauflösenden Techniken, wie beispielsweise der NMR-Spektroskopie, ist eine Zuordnung der Sekundärstrukturelemente zu bestimmten Aminosäure-Sequenzbereichen mithilfe der CD-Spektroskopie nicht möglich.

1.10 Orientierte Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die Grundlage der Strukturanalyse α -helikaler Peptide in orientierten Lipiddoppelschichten mittels Orientierter Zirkulardichroismus-Spektroskopie (*engl.*: OCD = oriented circular dichroism) stellt Moffit's Theorie⁵⁴ dar. Danach hängt das Übergangsdipolmoment des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs der Amidbindungen im Peptidrückgrat von der Orientierung der Helix ab, da das Übergangsdipolmoment des Peptids mit dem elektrischen Feldvektor E des Lichts wechselwirkt. Das OCD-Spektrum eines membrangebundenen helikalen Peptids zeigt, je nach Orientierung der Helix in Bezug auf die Membrannormale, eine charakteristische Linienform. Dabei ist die Intensität der Bande um 208 nm ein Hinweis für eine transmembrane (*engl.*: inserted state), also senkrechte, oder flach auf der Oberfläche der Membran (*engl.*: S-State = surface state), also parallele, Orientierung.

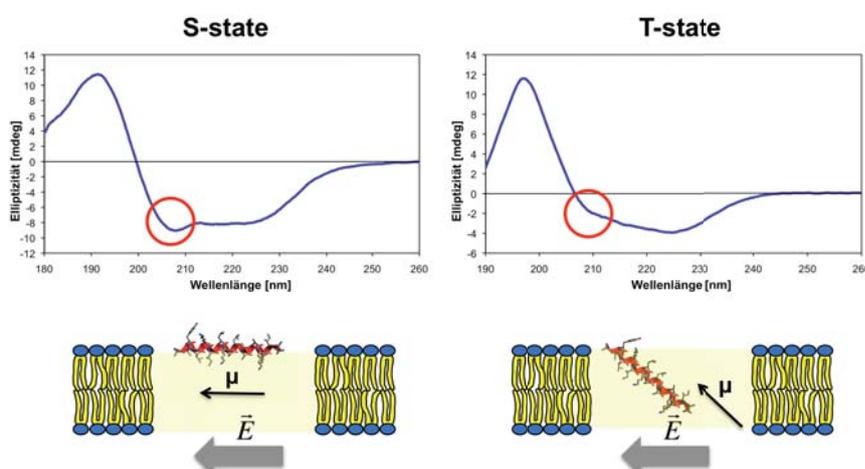


Abbildung 1.25: OCD-Spektrum für ein helikales Peptid mit paralleler Orientierung (links) und schräger Orientierung (rechts) in Bezug auf die Membranoberfläche.

Alle Zustände dazwischen bezeichnet man als geneigte Orientierung (*engl.*: T-state = tilted state) (Abbildung 1.25). Die Intensität dieser Bande nimmt von der parallelen hin zur senkrechten Ausrichtung ab, da die Wechselwirkung zwischen dem Übergangsdipolmoment μ und dem polarisierten Licht abnimmt.

Das OCD-Spektrum lässt nur qualitative Aussagen zu, da es Informationen über die gemittelte Summe aller in der Probe vorhandenen Orientierungen liefert. Für die genaue Bestimmung des Neigungswinkels müssen hochauflösende Techniken, wie die NMR-Spektroskopie, eingesetzt werden.

Obwohl die OCD-Spektroskopie vor allem eine Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Orientierungen von membrangebundenen α -Helices darstellt, können auch Aussagen zu anderen Strukturelementen, wie β -Faltblättern, gemacht werden. Beispiele hierfür sind das synthetische Polypeptid Poly(Leu-Lys)⁵⁵, das zyklische Peptid RTD-1⁵⁶, Protegrin-1⁵⁷ und MAP⁵⁸ (*engl.*: model amphiphilic peptide). Im Fall von MAP konnte bei hohen Peptid-zu-Lipid-Verhältnissen ein Übergang von einer α -helikalen zu einer für β -Faltblätter typischen Bandenform beobachtet werden (Abbildung 1.26). Festkörper-NMR-Spektren bestätigten die Peptidaggregation in Form von β -Faltblättern⁵⁹. Darüber hinaus konnte die Aggregation durch Inkorporation einer *D*-Aminosäure unterbunden werden. Die OCD-Spektroskopie erlaubt somit die Untersuchung des Aggregationsverhaltens von membrangebundenen Peptiden. Dabei zeigt ein Intensitätsverlust des OCD-Signals bereits eine partielle Umwandlung von helikalen Strukturanteilen in β -Faltblätter an.

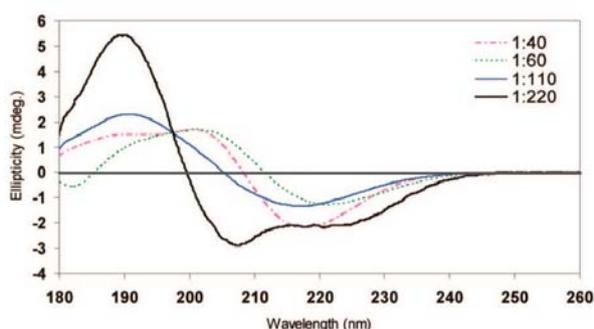


Abbildung 1.26: OCD-Spektrum von CF_3 -L-Phg markiertem MAP bei verschiedenen P/L's. Bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L=1:60) ist die für β -Faltblätter typische Bandenform deutlich erkennbar. Übernommen aus⁵⁹.

2. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist die strukturelle Charakterisierung des zellpenetrierenden Peptids Transportan-10 (TP10) in Biomembranen mittels der ^{19}F -Festkörper-NMR- und orientierten Zirkulardichroismus-Spektroskopie.

Als NMR-Sonde werden die ^{19}F -markierten Aminosäuren CF_3 -L- und -D-Bpg anstelle von Gly, Leu und Ile jeweils an den Positionen 2, 4, 5, 8, 10, 13, 16, 20 und 21 in die Peptidsequenz von TP10 inkorporiert.



Um zu prüfen, inwieweit die Markierung die biologischen und strukturellen Eigenschaften von TP10 beeinflusst, erfolgt eine Charakterisierung der Sekundärstruktur mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie.

Fluoreszenzmikroskopische Experimente der TP10-Analoga, die zusätzlich N-terminal mit dem Fluorophor Carboxyfluorescein markiert werden müssen, sollen zeigen, ob die biologische Aktivität erhalten bleibt und ob die zellpenetrierenden Eigenschaften durch die ^{19}F -markierte Aminosäure beeinflusst werden.

Die Strukturaufklärung durch die Bestimmung der relevanten Parameter τ , ρ , S_{mol} und σ_{τ} , σ_{ρ} erfolgt mittels ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie und soll mit literaturbekannten Strukturen des Ursprungspeptids Transportan (TP) verglichen und diskutiert werden.

Die große Herausforderung besteht darin, eine große Anzahl an Peptiden zu synthetisieren, aufzureinigen und in Biomembranen zu charakterisieren um die erhaltenen experimentellen Daten miteinander in Relation zu setzen, was die Grundlage für die Entwicklung eines wissenschaftlich fundierten strukturellen Modells darstellt.

Darüber hinaus soll geklärt werden, ob TP10 eine Aggregationstendenz, ähnlich dem Ursprungspeptid TP besitzt, wie sich die Aggregation unterbinden lässt und inwieweit die biologischen, insbesondere die zellpenetrierenden Eigenschaften beeinflusst werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Chemikalien

Acetonitril	Fisher Scientific
CHCl ₃	Merck
5,6-Carboxyfluorescein	Novabiochem
DCM	Biosolve
DIC	IRIS Biotech
DIPEA	IRIS Biotech
Diethylether	Merck
DMF	Biosolve
DMPC	Avanti polar lipids
DMPG	Avanti polar lipids
Fmoc-Ala-OH	Novabiochem
Fmoc-Asn(Trt)-OH	IRIS Biotech
Fmoc-CF ₃ -Bpg	Enamine Ltd.
Fmoc-Gly-OH	Novabiochem
Fmoc-Leu-OH	Novabiochem
Fmoc-Lys(Boc)-OH	IRIS Biotech
Fmoc-Lys(Dde)-OH	Novabiochem
Fmoc-Ile-OH	Novabiochem
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	IRIS Biotech
HBTU	Biosolve
HCl	Roth
HOBt	Biosolve
MH-Medium	Sigma-Aldrich
MeOH	Fisher Scientific
MeOH (Uvasol)	Merck
K ₂ SO ₄	VWR
NMP	Biosolve
Piperidin	Biosolve
Rink amide MBHA resin	Novabiochem

TFA	Biosolve
TFE	Merck
TIS	Merck

3.1.2 Verwendete Geräte

3.1.2.1 Festphasenpeptidsynthese

Für die Synthese der Peptide wurde ein multipler Synthesizer Syro II der Firma MultiSynTech verwendet.

3.1.2.2 Massenspektrometrie

Die Charakterisierung der synthetisierten Peptide erfolgte mittels einer LC-MS-Anlage mit einer HPLC der Firma Agilent und angegliedertem ESI-TOF der Firma Bruker.

3.1.2.3 RP-HPLC

Zur Aufreinigung der synthetisierten Peptide wurde eine HPLC-Anlage der Firma Jasco verwendet, bestehend aus zwei präparativen Pumpen 2087-PU, einem Hochdruckmischer 2080-DHD, einem Säulenthmostat der Firma Dionex TCC-100, einem Diodenarray-Detektor MD-2010, einem Injektor der Firma Rheodyne und einer Jasco-Steuerbox LC-NET II. Zur Steuerung beider Systeme wurde die mitgelieferte Software benutzt. Es wurde folgende RP-HPLC-Säule verwendet: Vydac[®] C18 (präparativ).

3.1.2.4 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die CD-Messungen erfolgten an einem J-815 Spektropolarimeter der Firma Jasco.

3.1.2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Experimente wurden in Kooperation mit Roland Brock und Wouter Verdurmen am Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences (NCMLS), Biochemistry of Integrated

Systems an einem TCS SP5 Konfokalmikroskop, ausgestattet mit einer HCX PL APO 63 x N.A. 1,2 Immersionslinse, durchgeführt.

3.2.1.6 Orientierte Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die Durchführung der OCD-Messungen erfolgte ebenfalls an einem J-810 Spektropolarimeter der Firma Jasco mit einem hauseigenen Aufbau für die OCD-Messzelle⁶⁰.

3.1.2.7 Transmissionselektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Experimente wurden in Kooperation mit Dagmar Gerthsen und Mohammad Fotouhi am CFN (Center for Functional Nanostructures) durchgeführt.

3.1.2.8 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Für die Festkörper-NMR-Messungen wurde ein 500 MHz-NMR-Spektrometer Avance-II der Firma Bruker unter Verwendung der Software Topspin 2.1 eingesetzt.

3.2 Methoden

3.2.1 Peptidsynthese

Die allgemeinen Methoden der Peptidsynthese sind im Anhang Kapitel 9.4 beschrieben^{61,62,63}.

3.2.1.1 Peptidsynthese am multiplen Synthesizer

Die TP10-Analoga wurden simultan an einem multiplen Synthesizer jeweils im 100 µmol-Ansatz mittels Festphasenpeptidsynthese nach dem Standardprotokoll für Fmoc-Peptidchemie von Fields und Noble⁶⁴ mit dem basenlabilen Fmoc als temporärer N- α -Schutzgruppe synthetisiert. Als semipermanente und zu Fmoc orthogonale Seitenschutzgruppen für Asn, Lys und Tyr wurden jeweils die säurelabilen Schutzgruppen Trt, Boc und tBu verwendet. Vor jedem Schritt erfolgten 4 Waschzyklen in einer Mischung aus DMF/NMP (50% v/v).

3.2.1.2 Schwellen des Harzes

Das Schwellen des Rink-Amid-MBHA-Harzes erfolgte über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde in einer Mischung aus DMF und DCM (50% v/v).

3.2.1.3 Knüpfung der Peptidbindung am multiplen Synthesizer

Als Kupplungsreagenz wurde eine Mischung aus HBTU/HOBt (1:1), gelöst in DMF, und einer Konzentration von 0,49 mol/l, verwendet. Die Konzentration der zu kuppelnden Aminosäuren in DMF betrug jeweils 0,57 mol/l und die der Base DIPEA, gelöst in NMP, 2,28 mol/l. Das stöchiometrische Verhältnis der Beladung des Harzes zu HBTU/HOBt, DIPEA und der zu kuppelnden Aminosäure betrug bei jedem Kupplungsschritt 1:4:8:4. Jede Peptidkupplung erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde. Um sicherzustellen, dass auch die Reaktion von sterisch anspruchsvollen Aminosäuren vollständig abläuft, wurde jede Kupplungsreaktion mit jeweils der gleichen Reaktionsdauer wiederholt.

3.2.1.4 Manuelle Kupplung der ¹⁹F-markierten Aminosäure

Die ¹⁹F-markierten Aminosäuren CF₃-L- und -D-Bpg wurden manuell über einen Zeitraum von 12 h gekuppelt. Als Kupplungsreagenz diente dabei DIC unter Zusatz von HOBt. Das stöchiometrische Verhältnis der Harzbeladung zu der zu kuppelnden Aminosäure, zum Kupplungsreagenz DIC und zu HOBt betrug 1:2:5:2. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels einer Testabspaltung („Testcleavage“ siehe 3.2.1.9) überprüft und im Falle der Unvollständigkeit für weitere 12 h wiederholt.

3.2.1.5 Entschützen

Das Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch Zugabe von Piperidin in DMF (20% v/v) über einen Zeitraum von 30 min.

3.2.1.6 Abspaltung vom Harz (Cleavage)

Um das Peptid nach beendeter Synthese vom festen Träger abzuspalten, wurde das zuvor mit Methanol gewaschene und im Vakuum getrocknete Harz über einen

Zeitraum von 4 h (2 h für Carboxyfluorescein-markierte Peptide) mit der Abspaltungslösung (*engl.*: cleavage cocktail), einer Mischung aus TFA (93,5%), TIS (4%) und H₂O (2,5%) versetzt, anschließend mit ca. der dreifachen Menge an Abspaltungslösung gewaschen und das Lösungsmittel im N₂-Strom vollständig entfernt. Die Ausfällung des Peptids erfolgte mit kaltem Diethylether. Der Niederschlag wurde abfiltriert und anschließend in einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser im Verhältnis 1:1 lyophilisiert.

3.2.1.7 Testabspaltung vom Harz (Testcleavage)

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion von sterisch gehinderten Aminosäuren wurde jeweils eine kleine Menge Harz entnommen, mit Methanol gewaschen, getrocknet und über einen Zeitraum von einer Stunde mit der Abspaltungslösung (siehe Kapitel 3.2.1.6) versetzt. Die Ausfällung des Peptids erfolgte ebenfalls mit kaltem Diethylether. Der abfiltrierte Niederschlag wurde jedoch nicht lyophilisiert, sondern in Methanol gelöst und mittels LC-MS charakterisiert.

3.2.1.8 Markierung mit 5,6-Carboxyfluorescein

Die Peptide wurden vor der Abspaltung vom Harz N-terminal mit Carboxyfluorescein (Abbildung 3.1) markiert. Das Kupplungsreagenz DIC, HOBt und der Fluoreszenzfarbstoff 5,6-Carboxyfluorescein, wurden im gleichen Verhältnis (1:1:1) eingewogen und in DMF gelöst, wobei ein stöchiometrisches Verhältnis zur Beladung des Harzes von 5:1 gewählt wurde. Nach einer Reaktionsdauer von 12 h wurde die Reaktionslösung abfiltriert und das Harz jeweils 5 mal in DMF, DCM, MeOH und Diethylether gewaschen. Nach Zugabe von Piperidin (20% v/v in DMF) über einen Zeitraum von 15 bis 30 min, wurde erneut jeweils 5 mal mit DMF, DCM und Methanol gewaschen, das Harz getrocknet und wie in Kapitel 3.2.1.6 beschrieben vom Harz abgespalten.

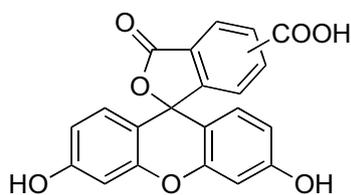


Abbildung 3.1: 5,6-Carboxyfluorescein.

3.2.2 Verwendete Elutionsmittel in der RP-HPLC

Es wurden folgende Laufmittel zur Aufreinigung der Rohpeptide mittels RP-HPLC verwendet:

Laufmittel A: 10% Acetonitril, 90% H₂O, 5 mM HCl

Laufmittel B: 90% Acetonitril, 10% H₂O, 5 mM HCl

Die eingesetzten Gradienten zur Aufreinigung der einzelnen TP10-Analoga werden im Anhang Kapitel 9.6.3 erläutert.

3.2.3. Vorbereitung der Proben für die CD-Spektroskopie

3.2.3.1 Proben in Phosphatpuffer

Die zu untersuchenden Peptide wurden eingewogen und in einer Konzentration von 0,5 mg/ml im entsprechenden Volumen Phosphatpuffer (10 mM, pH 7) gelöst. Zur Herstellung der CD-Proben wurde diese Stammlösung 1:5 mit Phosphatpuffer auf eine Endkonzentration in der Küvette von 0,1 mg/ml verdünnt.

3.2.3.2 Proben in Trifluorethanol/Phosphatpuffer (50% v/v)

Die zuvor gemessenen Proben des jeweiligen Peptids in Phosphatpuffer wurden 1:1 mit Trifluorethanol auf eine Endkonzentration des Peptids von 0,05 mg/ml verdünnt und erneut gemessen.

3.2.3.3 Proben in Vesikeln

Die Lipide DMPC und DMPG wurden im molaren Verhältnis 3:1 eingewogen, in Chloroform gelöst, gut vermischt, das Lösungsmittel vollständig im N₂-Strom entfernt und die Lipidsuspension über Nacht unter vermindertem Druck getrocknet. Anschließend wurde die Lipidmischung in 1 ml Phosphatpuffer aufgenommen. Die Herstellung der Vesikel erfolgte durch eine Behandlung der Lipidsuspension im Ultraschallbad (jeweils 3 mal über einen Zeitraum von 5 min). Dabei klarte die zuvor trübe Suspension auf. Zur Vorbereitung der Proben wurden die entsprechenden Volumina der Peptidstammlösung (c=0,5 mg/ml) in Phosphatpuffer und der Lipidstammlösung (9 mg/ml) in den entsprechenden Peptid-zu-Lipid-Verhältnissen

(P/L=1:50, 1:100, 1:200) vermischt, so dass die Endkonzentration der Lipide in der Küvette 1,5 mg/ml betrug (siehe Anhang Kapitel 9.6.4).

3.2.4 Durchführung der CD-Experimente

Die CD-Messungen erfolgten im Wellenlängenbereich von 260 bis 180 nm, mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 10 nm/min, einer Response-Zeit des Detektors von 8s und einer spektralen Bandbreite von 1 nm in einer Quarzküvette mit einer Durchgangslänge von 1 mm. Jeweils zwei Durchgänge (*engl.*: accumulations) wurden gemittelt und vom Referenzspektrum des reinen Lösungsmittels oder der Lipidvesikel ohne Peptid abgezogen. Die CD-Spektren in wässriger Lösung (Phosphatpuffer) und TFE/Phosphatpuffer (50% v/v) wurden bei 25°C und die CD-Spektren in Lipidvesikeln oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Lipide (25°C für DMPC und DMPG) bei 30°C aufgenommen. Nach der Aufnahme der CD-Spektren erfolgte eine Glättung und Basislinienkorrektur, so dass der Elliptizitätswert bei einer Wellenlänge von 260 nm jeweils den Wert 0 annimmt.

3.2.5 Vorbereitung der Proben und Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie

Die HeLa-Zellen wurden in dem Zellkulturmedium RPMI 1640 (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland), welches zusätzlich mit 10% fetalem Kälberserum (PAN Biotech) versetzt wurde, gelagert und bei einer Temperatur von 37°C in einem CO₂-Brutschrank (5%) inkubiert. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage umgesetzt. Die Bestimmung der Konzentration der Carboxyfluorescein- und CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga erfolgte durch Messung der Absorption bei 492 nm (A_{492}) in Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) unter der Annahme eines molaren Extinktionskoeffizienten von 75.000 M⁻¹cm⁻¹. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 10 000 Zellen pro well 3 Tage vor den mikroskopischen Experimenten umgeimpft und in 8-well Mikroskopkammern (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) bis zu einer Konfluenz von 75% gezüchtet. Die Inkubation der Zellen und Peptide in einer Konzentration von 2 und 10 µM erfolgte in RPMI 1640 versetzt mit 10% fetalem Kälberserum bei einer Temperatur von 37°C und über einen Zeitraum von 30 min. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen unter dem Mikroskop untersucht.

3.2.6 Antimikrobielle Untersuchungen

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von TP10 und den CF₃-Bpg markierten Analoga wurde die minimale Hemmkonzentration dieser Peptide für jeweils ein Gram-positives (*S. aureus*) und ein Gram-negatives (*E. coli*) Bakterium bestimmt. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe der Peptide in 96-Lochplatten (*engl.*: well plates) mit den entsprechenden Bakterien versetzt. Eine Trübung (zusätzlich mit Alamar-Blue bestätigt) nach der Inkubation zeigt dabei Bakterienwachstum an, wodurch die minimale Konzentration, die das Bakterienwachstum hemmt, bestimmt werden kann.

3.2.6.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zuerst erfolgte die Herstellung einer Übernachtskultur. Dazu wurden 5 bis 6 ml MH-Medium mit einer Kryokultur der entsprechenden Bakterien angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Von den Peptiden wurde eine wässrige Stammlösung der Konzentration 1,024 mg/ml hergestellt. Zur Bestimmung des OD₆₀₀-Wertes erfolgte eine 1:10-Verdünnung der Übernachtskultur. Für die Verdünnung der Übernachtskultur wurde eine Soll-Konzentration von 10⁶ cell/ml gewählt. Der CFU-Wert, der die Menge an Zellen pro ml bei einem OD₆₀₀ von 1,0 angibt, beträgt für *E. coli* 5,4*10⁸ und für *S. aureus* 7,3*10⁸. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurden zwei Verdünnungsschritte, erst eine 1:100- und danach die individuelle Verdünnung, gewählt. Anschließend wurden in die Lochplatten jeweils 50 µl der verdünnten Zellkultur vorgelegt, wobei eine Reihe als Negativkontrolle nicht mit den Bakterien, sondern nur mit MH-Medium befüllt wurde. Eine weitere Reihe diente als Positivkontrolle und wurde nur mit der Bakterienkultur und nicht mit Peptid befüllt. Die Herstellung der Verdünnungsreihe begann durch Zugabe von 50 µl Peptidstammlösung in die erste Reihe der Lochplatte. Anschließend erfolgte die Verdünnung von 50 µl dieser Mischung in die nächste Reihe usw., wodurch ein Konzentrationsgradient aufgebaut wurde. Pro Peptid wurde die Verdünnungsreihe dreimal wiederholt. Die Inkubation der Lochplatten erfolgte über Nacht bei 37°C. Die Trübung, die Bakterienwachstum anzeigt, wurde zuerst visuell bestimmt und danach durch Anfärben mit jeweils 12 µl einer Alamar-Blue-Lösung bestätigt. Als Kontrolle

wurden zusätzlich zu den Peptiden drei verschiedene Antibiotika, Ciprofloxacin, Polymyxin B und Kanamycin, getestet.

3.2.6.2 Verwendete Bakterienkulturen

Escherichia coli: DSM 1103

Staphylococcus aureus: DSM 1798

3.2.7 Vorbereitung der Proben für die OCD-Spektroskopie

Von den Peptiden wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Methanol hergestellt und anschließend mit den Lipiden DMPC/DMPG (im molaren Verhältnis 3:1), gelöst in Chloroform, im entsprechenden Peptid-zu-Lipid-Verhältnis (siehe Anhang Kapitel 9.6.5) vermischt. Jeweils 80 µl der Peptid-Lipid-Mischung wurden in 20 µl-Portionen mithilfe einer Mikroliterspritze auf die Quarzglasplättchen aufgetragen, im Vakuum ca. 3 h getrocknet und anschließend in einer Atmosphäre mit 98%iger Luftfeuchte (gesättigte K₂SO₄-Lösung) bei 40°C hydratisiert. Zur Beobachtung der Aggregation, die einer kinetischen Hemmung unterliegen kann, erfolgte die Hydratisierung der Proben über einen Zeitraum von 8 Tagen, wobei die OCD-Spektren ein und derselben Probe jeweils nach 24 h, 5 Tagen und 8 Tagen aufgenommen wurden.

3.2.8 Durchführung der OCD-Experimente

Die OCD-Spektren wurden im Wellenlängenbereich von 260 bis 180 nm, mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 20 nm/min, einer Response-Zeit der Detektors von 8 s und einer spektralen Bandbreite von 1 nm aufgenommen. Die zu messenden Proben wurden auf Quarzglasplättchen mit einem Durchmesser von 12 mm aufgetragen und jeweils bei 8 verschiedenen Winkeln, nach einer Rotation von je 45° (0°, 45°, 90°, 135°, 180°, 225°, 270°, 325°) der OCD-Zelle, bei einer Luftfeuchte von 98% (gesättigte K₂SO₄-Lösung) gemessen. Die 8 Einzelspektren wurden gemittelt, eine Basislinienkorrektur auf den Wert 0 bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt und das ebenfalls gemittelte Referenzspektrum der Lipide ohne Peptid (gemessen bei denselben Winkeln) abgezogen. Durch die Mittelung der Einzelspektren werden Artefakte, verursacht durch eventuelle Inhomogenitäten in der Oberfläche der

Lipiddoppelschicht (Lineardichroismus), reduziert. Um eventuell auftretende Unebenheiten in den orientierten Lipiddoppelschichten abschätzen zu können, wurde nach jeder Messung zusätzlich ein LD-Spektrum bei der 0°-Orientierung der OCD-Zelle aufgezeichnet. Alle Messungen erfolgten oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Lipide bei 30°C.

3.2.9 Vorbereitung der Proben und Durchführung der TEM

Von dem zu untersuchenden Peptid wurde eine wässrige Lösung mit einer Konzentration von $c=2$ mM hergestellt. Diese Lösung wurde mithilfe von Ultraschall auf ein Kupfer-Trägernetzchen (überzogen mit Kohlefilm, *engl.*: grid) aufgesprüht. Nach dem Trocknen des Peptidfilms wurden zur Negativkontrastierung (*engl.*: negative stain) ca. 2 μ l Uranylacetat (30% in Ethanol) aufgetropft und die Probe nach dem Trocknen unter dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

3.2.10 Vorbereitung der Proben für die ^{31}P - und ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Das zu untersuchende Peptid und die Lipidmischung (DMPC/DMPG im molaren Verhältnis 3:1) wurden im entsprechenden Peptid-zu-Lipid-Verhältnis ($P/L=1:50$, $1:200$, $1:400$, $1:800$) eingewogen (siehe Anhang Kapitel 9.6.6). Die Lipidmischung wurde in 140 μ l Chloroform gelöst und mit dem jeweiligen, in 70 μ l Methanol gelösten, Peptid vermischt. Anschließend wurden mithilfe einer Mikroliterspritze jeweils 12 μ l der Peptid-Lipid-Mischung auf 18 Glasplättchen ($15 \times 7.5 \times 0.08$ mm mit ca. 0,8 mg Material pro Glasplatte) aufgetragen und für mindestens 3 h oder über Nacht im Vakuum getrocknet. Nach dem Stapeln der Glasplättchen erfolgte die Hydratisierung der Proben über einen Zeitraum von 24 h bei einer Temperatur von 48°C in einer Atmosphäre mit 98%iger Luftfeuchtigkeit (gesättigte, wässrige K_2SO_4 -Lösung). Zum Schutz vor der Austrocknung der Proben wurden die Plättchen nach der Hydratisierung zuerst mit Parafilm und danach zusätzlich mit Polyethylenfolie umwickelt. Die Überprüfung der Orientierung der Membran erfolgte durch die Aufnahme von ^1H -entkoppelten ^{31}P -NMR-Spektren jeder Probe vor und nach den ^{19}F -Festkörper-NMR-Experimenten.

3.2.11 Durchführung der ^{31}P - und ^{19}F -Festkörper-NMR-Experimente

Für die Aufzeichnung der ^1H -entkoppelten ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren (202 MHz) wurde ein Tripelresonanz-Probenkopf ($^1\text{H}/\text{X}/\text{Y}$) der Firma Bruker unter Verwendung einer Hahn-Echo-Pulssequenz mit einer 90° -Pulslänge von $5\ \mu\text{s}$ verwendet. Üblicherweise wurden 128 bis 256 Scans aufgenommen. Die Messung der ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren (470 MHz) erfolgte mithilfe eines eigens konstruierten Flachspulen-Probenkopf mit jeweils einer Spule für die 0° - und die 90° -Orientierung der zu messenden Proben und unter Verwendung einer Antiringing-Pulssequenz mit einem 90° -Puls von $3,25\ \mu\text{s}$. Zur Referenzierung der ^{19}F -NMR-Spektren diente eine 10 mM wässrige Lösung von NaF, welches eine chemische Verschiebung von $-119,5\ \text{ppm}$ aufweist. Die Anzahl der aufgezeichneten Scans (2000 bis 20000) richtete sich dabei nach der Menge an ^{19}F -markiertem Peptid in der jeweiligen Probe.

3.2.12 Strukturanalyse

Die Berechnung der Helixorientierung von TP10 in einer orientierten Lipiddoppelschicht erfolgte mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Dabei wurden die experimentell ermittelten dipolaren heteronuklearen ^{19}F - ^{19}F -Kopplungen mit dem Modell einer idealen α -helikalen Struktur des Peptids verglichen. Der Neigungswinkel τ bezüglich des externen Magnetfelds, der azimuthale Rotationswinkel ρ und der Ordnungsparameter S_{mol} (Abbildung 1.12) wurden mithilfe eines „least-squares fits“ (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) unter Ermittlung des globalen Minimums für den RMSD (*engl.*: root mean-square deviation) zwischen den experimentell ermittelten und berechneten NMR-Parametern bestimmt. In einer idealen α -helix wird die Orientierung der Seitenketten einer Aminosäure durch die Winkel α und β beschrieben. Dabei ist α als der Winkel zwischen der Helixachse und dem C^α - C^β -Bindungsvektor und β als der Winkel zwischen der Projektion des Vektors der C^α - C^β -Bindung in die xy -Ebene und des Vektors der von der Helixachse zum C^α -Atom zeigt, definiert. Für CF_3 -Bpg betragen diese Winkel $\alpha=121,1^\circ$ und $\beta=53,2^\circ$. Um der Dynamik des Peptids Rechnung zu tragen, wurde zusätzlich eine Strukturberechnung, unter Annahme einer Gaussverteilung für den Neigungswinkel und azimuthalen Rotationswinkel, durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Festphasenpeptidsynthese

Alle 44 Peptide (TP10-WT, CF₃-L- und -D-Bpg markierte TP10-Analoga, CF-markierte TP10- und TP-Analoga, Tabelle 4.1 bis 4.3) konnten in genügend großen Ausbeuten im Bereich von 20 bis 30% synthetisiert und mittels RP-HPLC (Reinheit größer 95%) aufgereinigt werden (siehe Anhang Kapitel 9.6).

Tabelle 4.1: Sequenzen der CF₃-L- und -D-Bpg markierten TP10-Analoga.

Peptid	Sequenz	M [g/mol]
TP10-WT	AYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2182
TP10-G-CF ₃ -D/L-Bpg	A CF₃-Bpg YLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2316
TP10-L4-CF ₃ -D/L-Bpg	AGY CF₃-Bpg LGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2260
TP10-L5-CF ₃ -D/L-Bpg	AGYL CF₃-Bpg GKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2260
TP10-I8-CF ₃ -D/L-Bpg	AGYLLGK CF₃-Bpg NLKALAALAKKIL-NH ₂	2260
TP10-L10-CF ₃ -D/L-Bpg	AGYLLGKIN CF₃-Bpg KALAALAKKIL-NH ₂	2260
TP10-L13-CF ₃ -D/L-Bpg	AGYLLGKINLKA CF₃-Bpg AALAKKIL-NH ₂	2260
TP10-L16-CF ₃ -D/L-Bpg	AGYLLGKINLKALAA CF₃-Bpg AKKIL-NH ₂	2260
TP10-I20-CF ₃ -D/L-Bpg	AGYLLGKINLKALAALAKK CF₃-Bpg L-NH ₂	2260
TP10-L21-CF ₃ -D/L-Bpg	AGYLLGKINLKALAALAKKI CF₃-Bpg -NH ₂	2260

Tabelle 4.2: Sequenzen der Carboxyfluorescein- und CF₃-D/L-Bpg markierten TP10-Analoga.

Peptid	Sequenz	M [g/mol]
TP10-WT-CF	CF -AYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2540
TP10-G2-CF ₃ -D/L-Bpg-CF	CF -A CF₃-Bpg YLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2674
TP10-L4-CF ₃ -D/L-Bpg-CF	CF -AGY CF₃-Bpg LGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2618
TP10-L5-CF ₃ -D/L-Bpg-CF	CF -AGYL CF₃-Bpg GKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2618
TP10-I8-CF ₃ -D/L-Bpg-CF	CF -AGYLLGK CF₃-Bpg NLKALAALAKKIL-NH ₂	2618
TP10-L10-CF ₃ -D/L-Bpg-CF	CF -AGYLLGKIN CF₃-Bpg KALAALAKKIL-NH ₂	2618
TP10-L13-CF ₃ -D/L-Bpg-CF	CF -AGYLLGKINLKA CF₃-Bpg AALAKKIL-NH ₂	2618
TP10-L16-CF ₃ -D/L-Bpg-CF	CF -AGYLLGKINLKALAA CF₃-Bpg AKKIL-NH ₂	2618
TP10-I20-CF ₃ -D/L-Bpg-CF	CF -AGYLLGKINLKALAALAKK CF₃-Bpg L-NH ₂	2618
TP10-L21-CF ₃ -D/L-Bpg-CF	CF -AGYLLGKINLKALAALAKKI CF₃-Bpg -NH ₂	2618

Tabelle 4.3: Sequenzen der Carboxyfluorescein-markierten TP-Analoga.

Peptid	Sequenz	M [g/mol]
TP-CF	CF -GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	3200
CF-TP-Lys28-CF	CF -GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKILK(CF)-NH ₂	3687
CF-TP-Lys13-CF	CF -GWTLNSAGYLLGK(CF)INLKALAALAKKIL-NH ₂	3558
TP-Lys28-CF	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKILK(CF)-NH ₂	3326
TP-Lys13-CF	GWTLNSAGYLLGK(CF)INLKALAALAKKIL-NH ₂	3200

4.2 CD-Spektroskopie

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Einführung der ^{19}F -markierten Aminosäure und die Carboxyfluorescein-Markierung auf die Sekundärstruktur von TP10 und TP ausüben, wurden verschiedene CD-Experimente durchgeführt. Da TP10 kein Trp enthält und der Extinktionskoeffizient von Tyr für eine verlässliche Bestimmung der Konzentration zu klein ist, sind die nachfolgenden Spektren nicht in MRE-Werten (*engl.*: mean residue ellipticity) dargestellt. Um die Linienform der CD-Spektren des Wildtyps und der markierten Analoga besser vergleichen zu können, sind diese jeweils auf die Elliptizität des Wildtyps bei der angegebenen Wellenlänge normiert. Die CD-Spektren der Peptide wurden in folgenden Medien aufgenommen:

1. wässrige Lösung (Phosphatpuffer oder H_2O)
2. TFE/Phosphatpuffer (50% v/v)
3. Lipidvesikel aus DMPC und DMPG in einem molaren Verhältnis von 3:1

4.2.1 CD-Messungen in wässriger Lösung

4.2.1.1 CF_3 -Bpg markierte TP10-Analoga

Der Wildtyp und der Großteil der *L*- und *D*-Epimere (Abbildung 4.1) liegen vorwiegend unstrukturiert in wässriger Lösung vor. Dabei ist bei einigen Epimeren (Position 4, 8, 20 und 21 substituiert durch CF_3 -*L*-Bpg und Position 2, 4, 8, 20 und 21 substituiert durch CF_3 -*D*-Bpg), erkennbar an der positiven Bande um 190 nm und der negativen Bande um 220 nm, ein geringer Anteil α -helikaler Strukturelemente vorhanden. Die Tendenz der TP10-Analoga mit einer Substitution durch CF_3 -Bpg in Position 10, 13 und 16 zur Ausbildung α -helikaler Anteile ist scheinbar geringer.

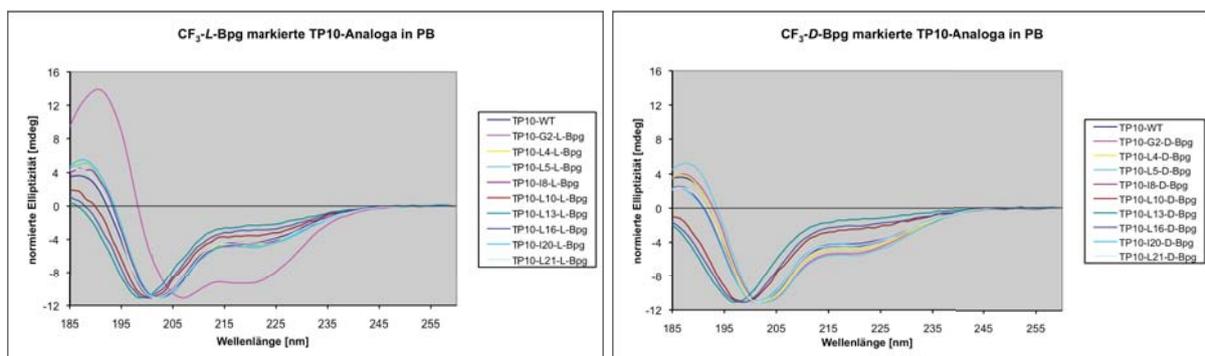


Abbildung 4.1: Normierte CD-Spektren der *L*- (links) und *D*-Epimere (rechts) in Phosphatpuffer (10 mM). Die Spektren sind jeweils auf die Elliptizität des Wildtyps bei 200 nm normiert.

Eine große Ausnahme bildet das TP10-Analogon TP10-G2-CF₃-L-Bpg, welches bereits in wässriger Pufferlösung deutliche α -helikale Strukturanteile aufweist (Spektrum in der Abbildung 4.1 links, magentafarbene Kurve).

4.2.1.2 CF- und CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga

Der CF-markierte Wildtyp und die meisten der CF-markierten *L*- und *D*-Epimere liegen ebenfalls weitestgehend unstrukturiert in wässriger Lösung vor (Abbildung 4.2). Dennoch ist bei einigen Epimeren (Position 2, 4, 8, 20 und 21 substituiert durch CF₃-L-Bpg und CF₃-D-Bpg), erkennbar an der positiven Bande um 190 nm und der negativen Bande um 220 nm, ein deutlicher Anteil α -helikaler Strukturelemente vorhanden.

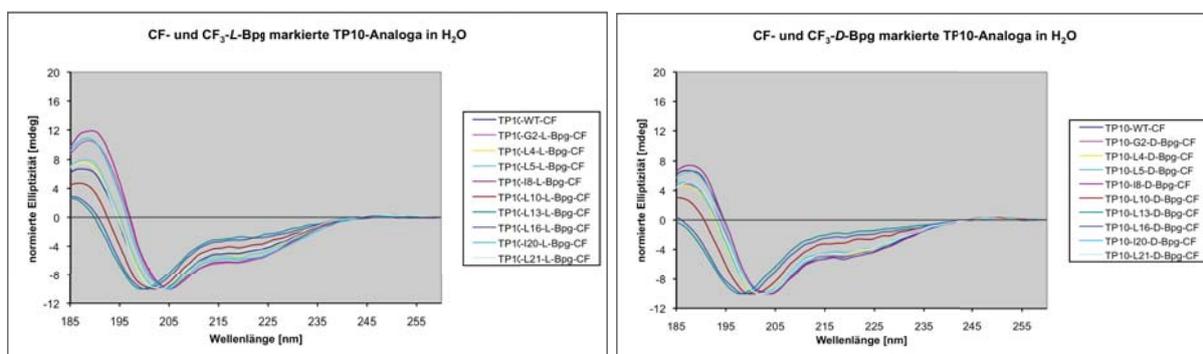


Abbildung 4.2: Normierte CD-Spektren der CF-markierten *L*- (links) und *D*-Epimere (rechts) in wässriger Lösung. Die Spektren sind jeweils auf die Elliptizität des Wildtyps bei 203 nm normiert.

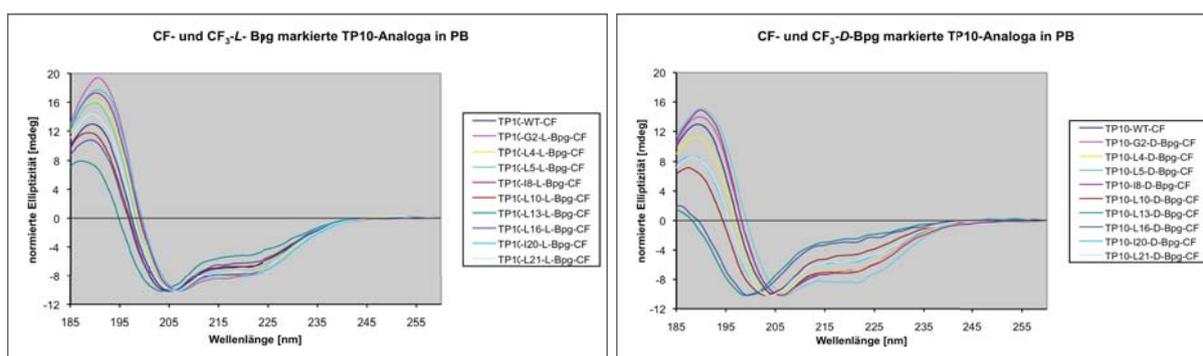


Abbildung 4.3: Normierte CD-Spektren der CF-markierten *L*- (links) und *D*-Epimere (rechts) in Phosphatpuffer (10 mM). Die Spektren sind jeweils auf die Elliptizität des Wildtyps bei 206 nm normiert.

Wiederum ist die Tendenz der CF-markierten TP10-Analoga mit einer Substitution durch CF₃-Bpg in Position 10, 13 und 16 zur Ausbildung α -helikaler Strukturelemente geringer. In den CD-Spektren, die in Phosphatpuffer aufgenommen wurden

(Abbildung 4.3), sind die α -helikalen Strukturanteile noch deutlicher zu erkennen, da die positive Bande um 190 nm und die negative Bande um 220 nm stärker ausgeprägt sind. Der gegenüber den Messungen in reiner wässriger Lösung neutrale pH-Wert um 7,0 und die sterisch anspruchsvolle CF-Markierung erhöhen somit im Fall von TP10 die Tendenz zur Ausbildung einer α -Helix.

4.2.1.3 CF- markierte TP-Analoga

Um den Einfluss des Verknüpfungspunktes der Cargo und einer doppelten Fluoreszenzmarkierung an verschiedenen Positionen der Sequenz zu untersuchen, wurde TP am N-, am C-Terminus, an Lys13 und an C- und N-Terminus und N-Terminus und Lys13 gleichzeitig mit Carboxyfluorescein markiert. Die TP-Analoga liegen in wässriger Lösung größtenteils unstrukturiert mit einem geringen α -helikalen Anteil vor (Abbildung 4.4). Nur das TP-Analogon CF-TP-Lys13-CF zeigt eine größere Tendenz zur Ausbildung einer α -Helix. Die CD-Spektren in Phosphatpuffer zeigen eine ausgeprägtere positive Bande um 190 nm und damit mehr α -helikale Strukturanteile.

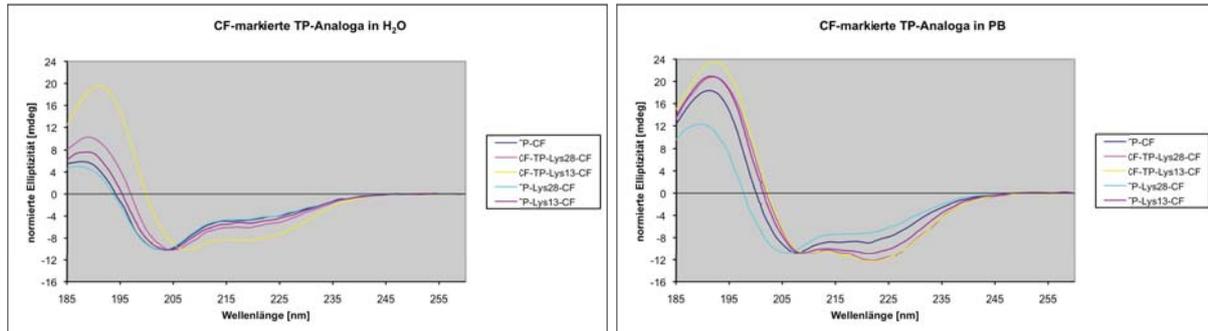


Abbildung 4.4: Normierte CD-Spektren der CF-markierten TP-Analoga in wässriger Lösung (links) und Phosphatpuffer 10 mM (rechts). Die Spektren sind jeweils auf die Elliptizität des Wildtyps bei 203 nm und 208 nm normiert.

4.2.2 CD-Messungen in TFE/Phosphatpuffer

TFE unterstützt die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen durch Abschirmung der Wechselwirkungen mit den H₂O-Molekülen, wirkt somit als membranimitierende Umgebung und fördert daher die Ausbildung der Sekundärstruktur membranaktiver Peptide.

4.2.2.1 CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga

Sowohl die *L*- als auch die *D*-Epimere (Abbildung 4.5) zeigen, ähnlich wie der Wildtyp, in TFE/PB eine vorwiegend α -helikale Sekundärstruktur. Die für α -Helices typische positive Bande um 190 nm und die negativen Banden um 208 und 220 nm sind deutlich erkennbar. Jedoch ist die negative Bande um 220 nm weniger stark ausgeprägt, was auf einen nicht zu vernachlässigen Anteil an ungeordneten Struktursegmenten hinweist. Darüber hinaus zeigen einige *D*-Epimere (TP10-L16-CF₃-*D*-Bpg und TP10-L10-CF₃-*D*-Bpg) im Vergleich zum Wildtyp eine höchstwahrscheinlich durch Löslichkeitsunterschiede bedingte größere Abweichung bezüglich der Intensität des CD-Signals (siehe Anhang Kapitel 9.5).

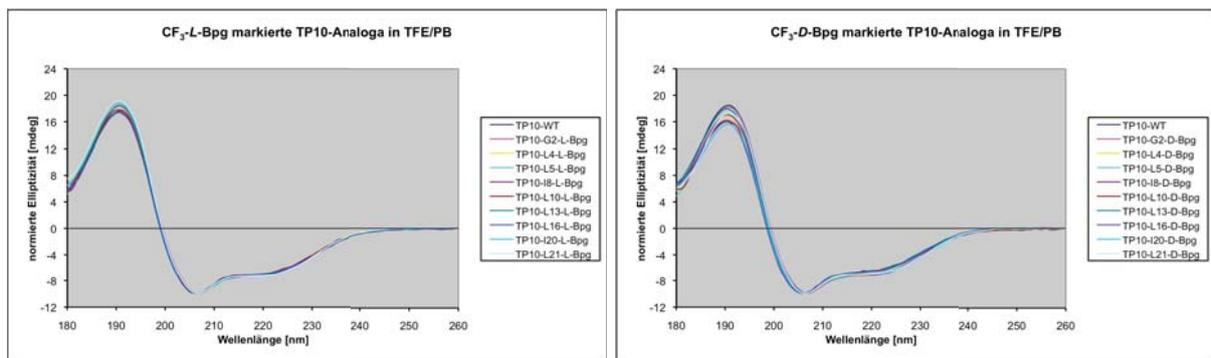


Abbildung 4.5: Normierte CD-Spektren der *L*- (links) und *D*-Epimere (rechts) in TFE/Phosphatpuffer (50% v/v). Die Spektren sind jeweils auf die Elliptizität des Wildtyps bei 207 nm normiert.

4.2.2.2 CF- und CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga

Alle CF-markierten Epimere (Abbildung 4.6) zeigen, ähnlich wie der Wildtyp, in TFE/PB eine vorwiegend α -helikale Struktur.

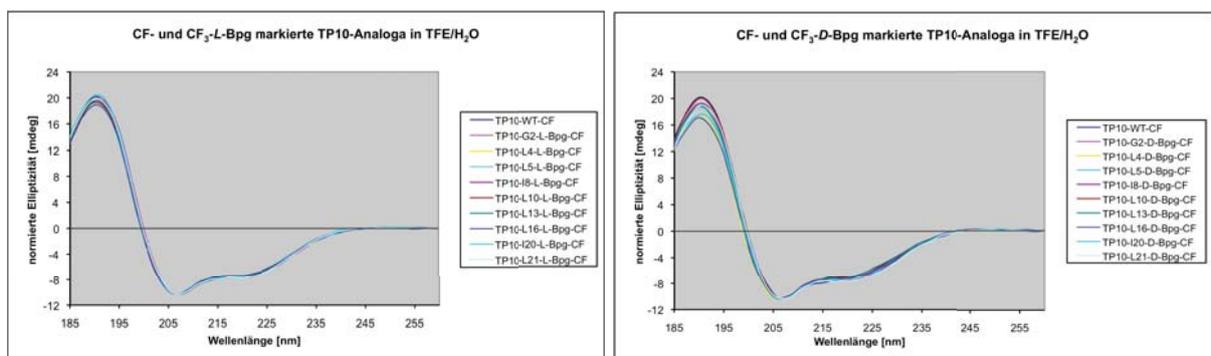
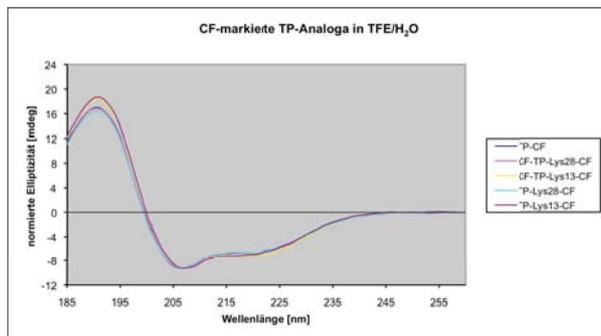


Abbildung 4.6: Normierte CD-Spektren der CF-markierten *L*- (links) und *D*-Epimere (rechts) in TFE/H₂O (50% v/v). Die Spektren sind jeweils auf die Elliptizität des Wildtyps bei 207 nm normiert.

Die für α -Helices typische positive Bande um 190 nm und die negativen Banden um 208 und 220 nm sind deutlich erkennbar. Jedoch ist die negative Bande um 220 nm weniger stark ausgeprägt, was auf einen nicht zu vernachlässigen Anteil an ungeordneten Strukturen hinweist.

4.2.2.3 CF-markierte TP-Analoga

Die CF-markierten TP-Analoga (Abbildung 4.7) weisen in TFE/H₂O eine vorwiegend α -helikale Struktur auf. Wieder sind die für α -Helices typische positive Bande um 190 nm und die negativen Banden um 208 und 220 nm deutlich erkennbar. Die negative Bande um 220 nm ist ebenfalls weniger stark ausgeprägt und deutet damit auf



ungeordnete Strukturanteile hin.

Abbildung 4.7: Normierte CD-Spektren der CF-markierten TP-Analoga in TFE/H₂O (50% v/v). Die Spektren sind jeweils auf die Elliptizität des Wildtyps bei 206 nm normiert.

4.2.3 CD-Messungen in Lipidvesikeln

In Analogie zu den OCD- und NMR-Experimenten, die in Modellmembranen aus DMPC/DMPG (3:1) erfolgten, wurden die TP10- und TP-Analoga ebenfalls in Vesikeln dieser Lipidmischung mittels CD-Spektroskopie in Lösung untersucht.

4.2.3.1 CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga

Sowohl die *L*- als auch die *D*-Epimere (Abbildung 4.8) weisen in drei verschiedenen Peptid-zu-Lipid-Verhältnissen (P/L=1:50, 1:100, 1:200), ähnlich dem Wildtyp, eine helikale Struktur mit ungeordneten Strukturanteilen auf. Auch bei den co-solubilisierten Proben, bei denen Peptid und Lipid in organischen Lösungsmitteln (MeOH und CHCl₃) vermischt werden, stimmt die Form des Signals des Wildtyps und der Epimere überein.

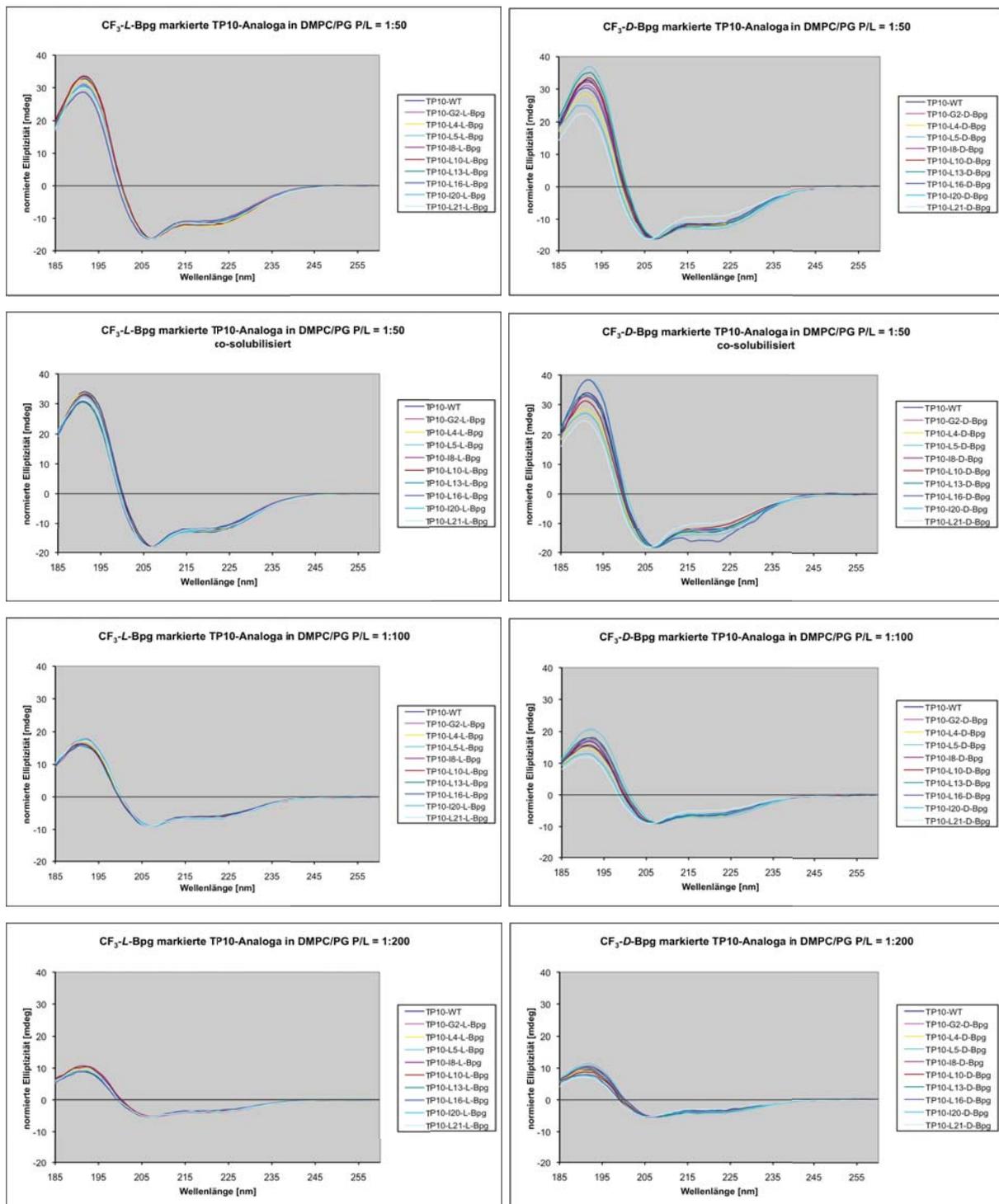


Abbildung 4.8: Normierte CD-Spektren der L- (linke Spalte) und D-Epimere (rechte Spalte) in DMPC/DMPG (3:1)-Vesikeln mit P/L=1:50, P/L=1:50 co-solubilisiert, P/L=1:100 und P/L=1:200. Die Spektren sind jeweils auf die Elliptizität des Wildtyps bei 208 nm normiert.

Ein Vergleich der CD-Spektren des Wildtyps zeigt (Abbildung 4.9), dass sich die Linienform mit steigendem P/L nicht verändert. Auch die Art der Probenvorbereitung

(aus wässriger Lösung oder co-solubilisiert), zeigt keinen Einfluss auf die Ausbildung der Sekundärstruktur.

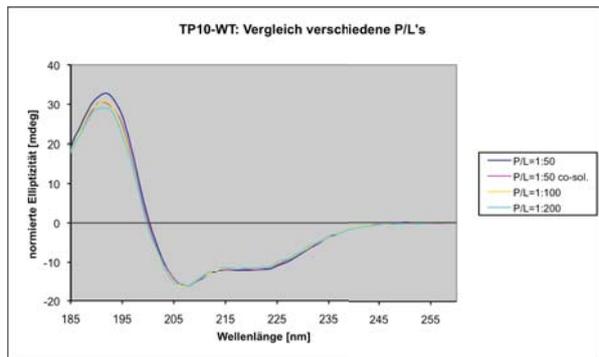


Abbildung 4.9: Vergleich der CD-Spektren des Wildtyps bei verschiedenen P/L's (P/L=1:50, 1:100, 1:200) und den zwei verschiedenen Probenvorbereitungsarten (aus wässriger Lösung oder co-solubilisiert) bei P/L=1:50. Die Spektren sind auf die Elliptizität des Wildtyps in einem P/L von 1:50 bei 207 m normiert.

4.2.3.2 CF- und CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga

Auch die CF-markierten TP10-Analoga weisen in einem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis von 1:50, ähnlich dem CF-markierten Wildtyp, eine helikale Struktur mit ungeordneten Strukturanteilen auf (Abbildung 4.10). Die Form der CD-Spektren lässt darauf schließen, dass durch die CF-Markierung mehr Helix induziert wird, da die negative Bande um 220 nm stärker ausgeprägt ist als bei den TP10-Analoga ohne CF-Markierung.

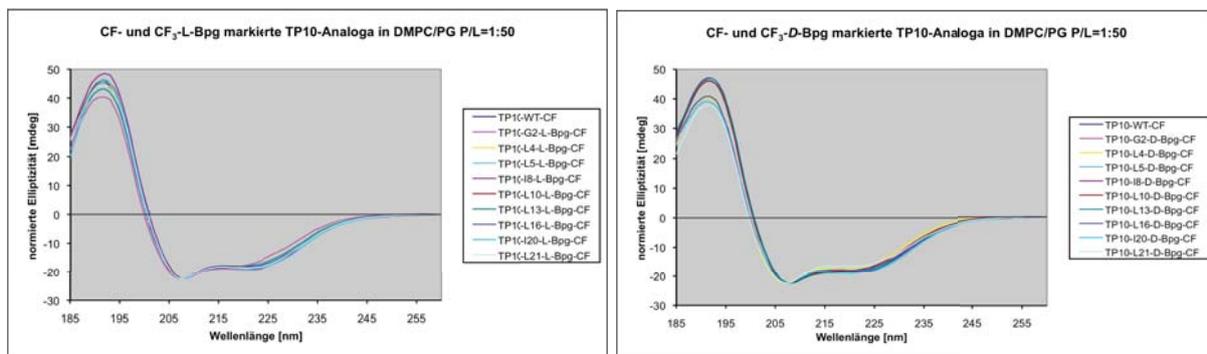


Abbildung 4.10: Normierte CD-Spektren der CF-markierten L- (links) und D-Epimere (rechts) in DMPC/DMPG (3:1)-Vesikeln mit P/L=1:50. Die Spektren sind jeweils auf die Elliptizität des Wildtyps bei 208 nm normiert.

4.2.3.3 CF-markierte TP-Analoga

Bei allen CF-markierten TP-Analoga konnte eine helikale Struktur identifiziert werden (Abbildung 4.11). Die negative Bande um 220 nm ist deutlich ausgeprägt, weshalb angenommen werden kann, dass die TP-Analoga im Vergleich zu den TP10-Analoga einen höheren Anteil an helikalen Strukturen aufweisen.

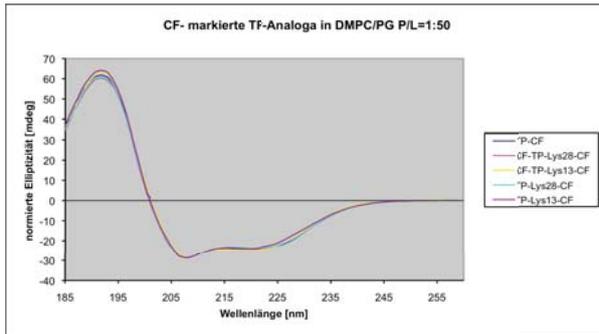


Abbildung 4.11: Normierte CD-Spektren der CF-markierten TP-Analoga in DMPC/DMPG (3:1)-Vesikeln mit P/L=1:50. Die Spektren sind jeweils auf die Elliptizität des Wildtyps bei 208 nm normiert.

4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren der TP10- (sowohl mit als auch ohne CF-Markierung) und der CF-markierten TP-Analoga in wässriger Lösung, in TFE und in Lipidvesikeln zeigen keine wesentlichen Abweichungen im Vergleich zum CD-Spektrum des Wildtyps. Somit hat die Einführung der ^{19}F -markierten Aminosäure und der Fluoreszenzmarkierung nur geringen Einfluss auf die Ausbildung der Sekundärstruktur und alle Analoga können folglich für die OCD- und NMR-Experimente eingesetzt werden.

4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der Zellaufnahme-Experimente wurden die zellpenetrierenden Eigenschaften der CF_3 -L-Bpg markierten TP10-Analoga in HeLa-Zellen überprüft. Die Fluoreszenzmikroskopie diente somit der Untersuchung des Einflusses der ^{19}F -markierten Aminosäure auf die biologische Aktivität von TP10.

Die Experimente wurden bei zwei verschiedenen Konzentrationen der Peptide, 2 μM (Spalte links in Abbildung 4.12) und 10 μM (Spalte rechts in Abbildung 4.12), durchgeführt. Alle TP10-Analoga, sowie die Wildtyp, wurden in die HeLa-Zellen aufgenommen. TP10-G2- und -L4- CF_3 -L-Bpg zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine gesteigerte Aktivität in beiden untersuchten Konzentrationen.

Somit zeigen alle Analoga eine dem Wildtyp ähnliche zellpenetrierende Aktivität und können folglich für die NMR-Strukturanalyse verwendet werden.

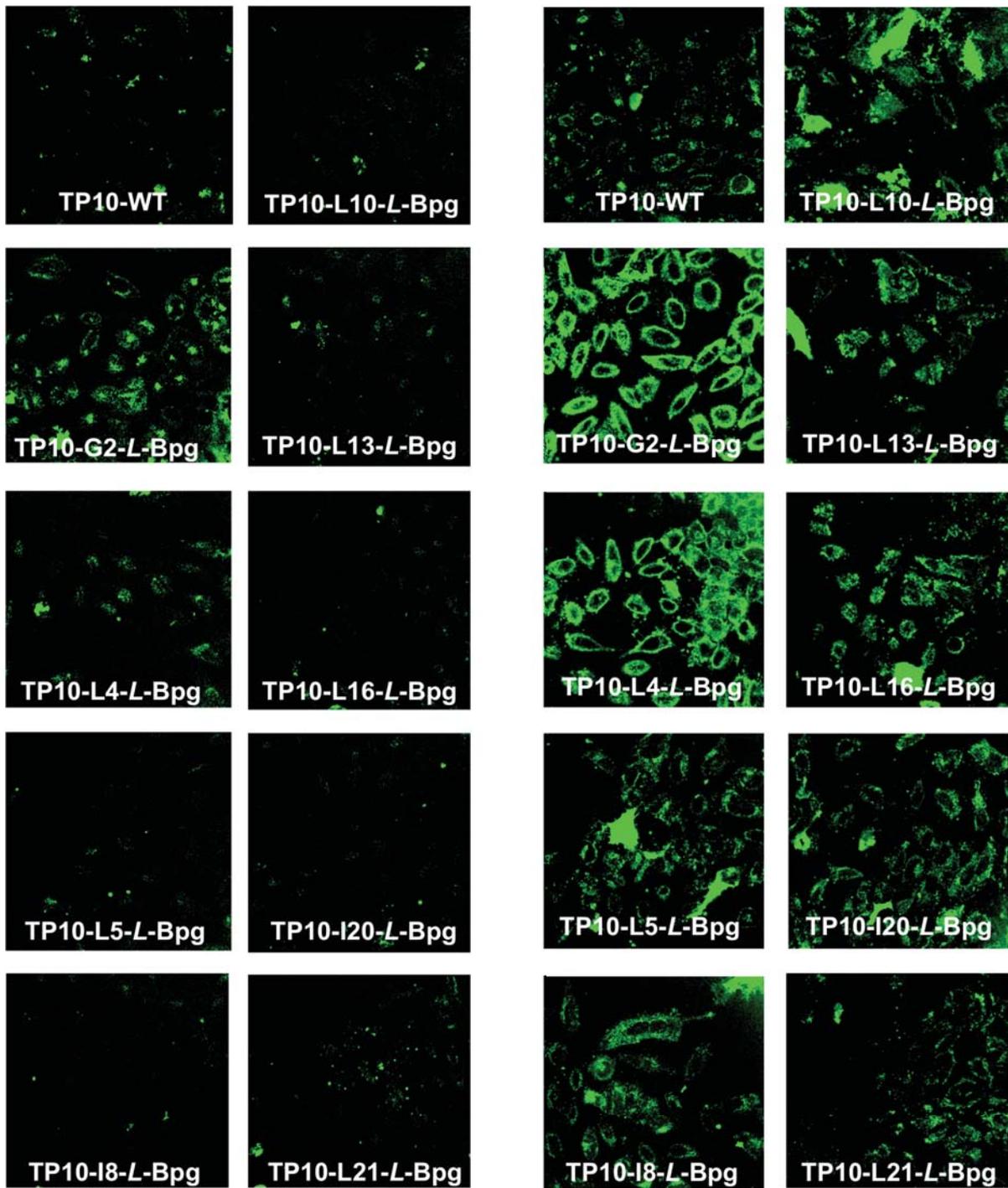


Abbildung 4.12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Internalisierung der CF- und CF₃-L-Bpg markierten TP10-Analoga in HeLa-Zellen nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C. Die Konzentration der CF-markierten Peptide beträgt 2 μM (linke Spalte) und 10 μM (rechte Spalte).

4.4 Minimale Hemmkonzentration

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Eigenschaften des zellpenetrierenden Peptids TP10 und der CF₃-Bpg markierten Analoga wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) der Peptide gegenüber zwei verschiedenen Bakterienstämmen, *Staphylococcus aureus* als Gram-positives und *Escherichia coli* als Gram-negatives Bakterium, getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

Tabelle 4.4: Minimale Hemmkonzentration (MHK) in µg/ml des Wildtyps und der CF₃-L- und D-Bpg markierten TP10-Analoga gegen *E. coli* (Gram-negativ) und *S. aureus* (Gram-positiv).

Peptid	L-Epimere		D-Epimere	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]
TP10-WT	64	128	64	128
TP10-G2-CF ₃ -Bpg	256	256	64	128
TP10-L4-CF ₃ -Bpg	128	256	64	64
TP10-L5-CF ₃ -Bpg	128	128	128	128
TP10-I8-CF ₃ -Bpg	128	128	128	128
TP10-L10-CF ₃ -Bpg	64	64	64	64
TP10-L13-CF ₃ -Bpg	64	128	64	128
TP10-L16-CF ₃ -Bpg	128	64	64	128
TP10-I20-CF ₃ -Bpg	128	64	32	64
TP10-L21-CF ₃ -Bpg	64	64	32	32

Die L-Epimere zeigen dem Wildtyp ähnliche MHK's gegenüber dem Gram-negativen Bakterium *E. coli*, die sich nur innerhalb eines Verdünnungsschrittes unterscheiden. Nur das Analogon TP10-G2-CF₃-L-Bpg weist eine etwas höhere MHK als alle anderen TP10-Analoga auf. Die Unterschiede der MHK's gegenüber *S. aureus* liegen ebenfalls im Bereich eines Verdünnungsschrittes. Die höchsten MHK's zeigen TP10-G2- und -L4-CF₃-L-Bpg. Auch bei den D-Epimeren liegen die Unterschiede der MHK's im Vergleich zum Wildtyp innerhalb eines Verdünnungsschrittes. Im Vergleich zu den L-Epimeren weisen die D-Epimere allerdings etwas kleinere MHK's gegen *E. coli*, aber teilweise auch gegen *S. aureus* auf und sind damit etwas aktiver. Allgemein ist eine Tendenz zu größerer Aktivität bei den TP10-Analoga, die eine Markierung, egal welcher Konfiguration, im C-terminalen Teil tragen, erkennbar.

4.5 OCD-Spektroskopie

Das Ursprungspeptid Transportan zeigt eine gewisse Tendenz zur Aggregation (vergleiche Pujals et al.³¹). Deshalb wurde, neben der Orientierung, das Aggregationsverhalten des Wildtyps und der TP10- und TP-Analoga mithilfe der OCD-Spektroskopie in orientierten Phospholipiddoppelschichten aus DMPC/DMPG (3:1) untersucht. Es sollte geprüft werden, welchen Einfluss die Position der ¹⁹F-markierten Aminosäure in der Sequenz von TP10 und das P/L auf die Aggregationstendenz ausüben. Da Aggregation einer kinetischen Hemmung unterliegen kann, wurde jede einzelne OCD-Probe jeweils nach einem Zeitraum von 1 Tag und nach 5 und 8 Tagen Hydratation vermessen. Ein Intensitätsverlust des OCD-Signals oder eine klare Änderung der Linienform (von vorwiegend α -helikaler Struktur zu einem β -Faltblatt) der Spektren in Kombination mit den entsprechenden NMR-Spektren (Pulverspektren, siehe Kapitel 4.7.2) sind ein Zeichen für Aggregation.

4.5.1 OCD-Spektren der CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga

Der Wildtyp und die CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga wurden in orientierten DMPC/DMPG-Doppelschichten in drei verschiedenen Peptid-zu-Lipid-Verhältnissen vermessen: P/L=1:50, P/L=1:100 und P/L=1:200

4.5.1.1 OCD-Spektren der CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga mit P/L=1:50

Das OCD-Spektrum des Wildtyps (Abbildung 4.13) zeigt über den Zeitraum von 8 Tagen einen deutlichen Intensitätsverlust des OCD-Signals.

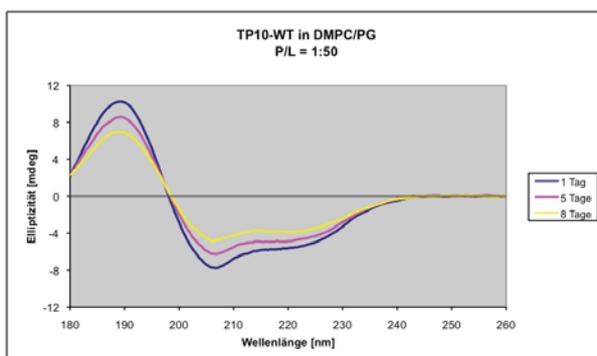


Abbildung 4.13: OCD-Spektrum von TP10-WT in DMPC/PG (3:1) mit P/L=1:50 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

Eine Ursache hierfür kann eine Agglomeration von α -Helices oder die partielle Umwandlung α -helikaler Strukturanteile in β -Faltblätter sein.

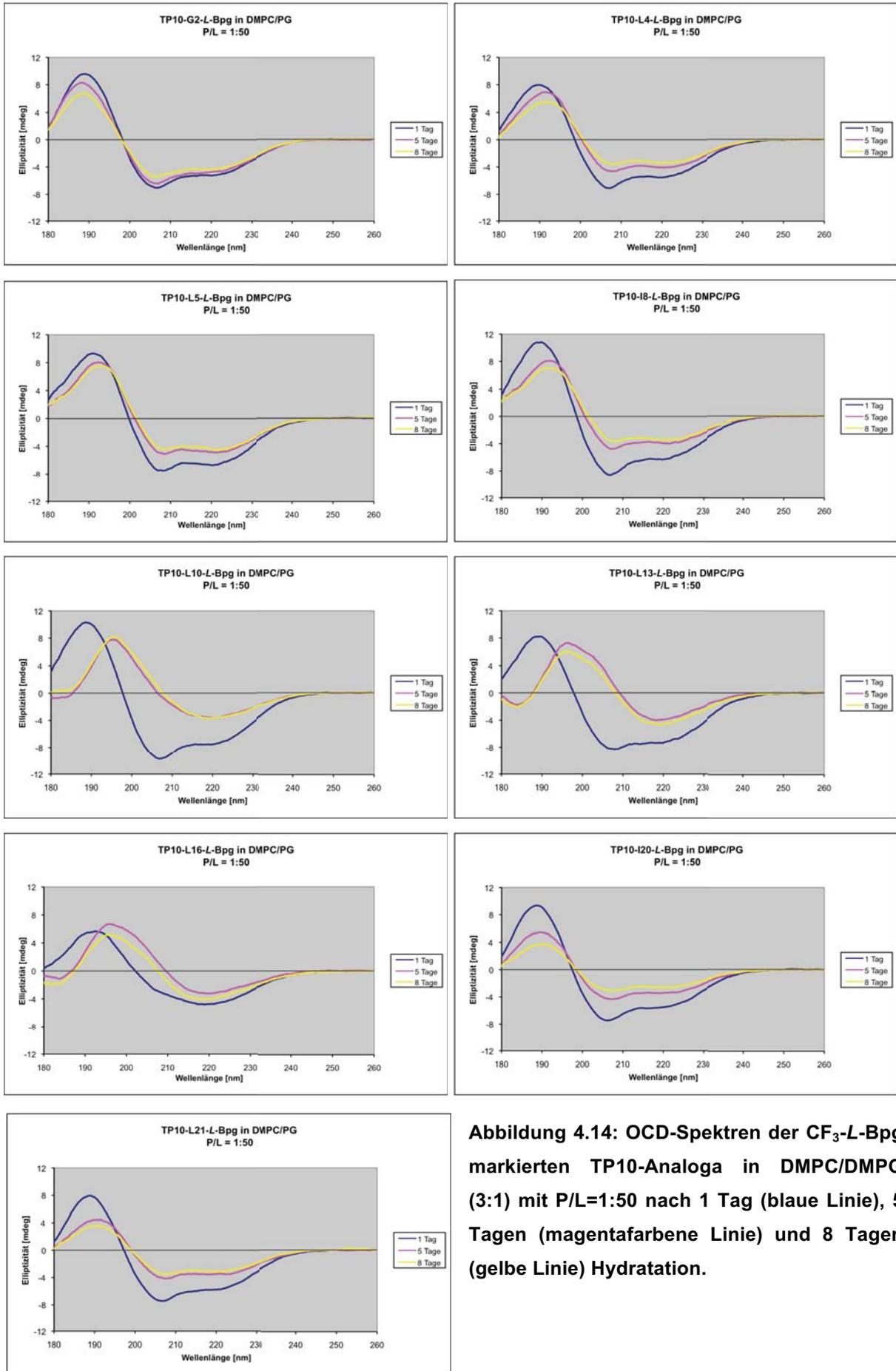


Abbildung 4.14: OCD-Spektren der CF_3 -L-Bpg markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:50 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

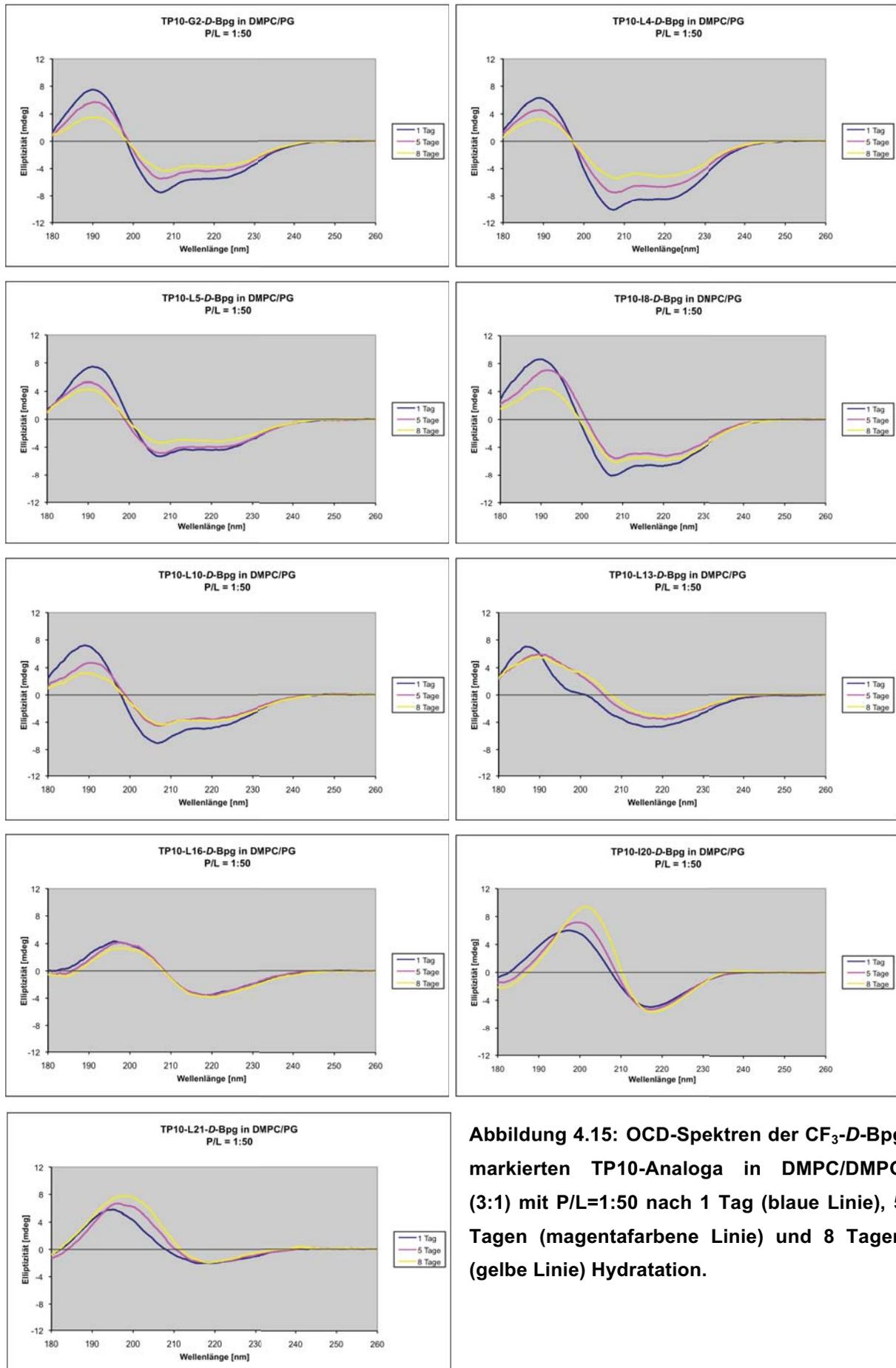


Abbildung 4.15: OCD-Spektren der CF_3 -D-Bpg markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:50 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

In den Spektren der TP10-Analoga, mit einer Substitution in Position 2, 4, 5, 8, 20 und 21 durch CF₃-L-Bpg (Abbildung 4.14) und Position 2, 4, 5, 8 und 10 durch CF₃-D-Bpg (Abbildung 4.15), ist ein ähnliches Verhalten erkennbar. Die Intensität des OCD-Signals nimmt hier ähnlich dem Wildtyp ebenfalls über den Messzeitraum deutlich ab. Darüber hinaus ist bei TP10-L4-, -L5-, -I8-, -I20-, -L21-CF₃-L-Bpg und TP10-I8-, -L10-CF₃-D-Bpg eine leichte Verschiebung der Banden um 190 und 208 nm zu größeren Wellenlängen ersichtlich, was ebenfalls ein Hinweis auf die Umwandlung α -helikaler Anteile in β -Faltblätter ist. Im Gegensatz dazu konnte bei zwei L-Epimeren (TP10-L10- und -L13-CF₃-L-Bpg) zwischen der Messung nach 1 Tag und 5 Tagen wesentlich eindeutiger ein Wechsel von einer vorwiegend α -helikalen Struktur in ein β -Faltblatt beobachtet werden. Bei TP10-L16-CF₃-L-Bpg unterscheidet sich das Spektrum nach 1 Tag ebenfalls deutlich, wenn auch die helikale Form nicht im gleichen Maß ausgeprägt ist, von dem Spektrum nach 5 bzw. 8 Tagen und könnte demnach ebenfalls als eine solche Umwandlung betrachtet werden.

Tabelle 4.5: Aggregationsverhalten der L- und D-Epimere nach 1 Tag und 5 Tagen mit P/L=1:50. Die deutlich als β -Faltblatt aggregierenden Analoga sind jeweils farblich hervorgehoben.

	1 Tag		5 Tage	
Wildtyp	helikal		helikal	
Markierte Position	CF ₃ -L-Bpg	CF ₃ -D-Bpg	CF ₃ -L-Bpg	CF ₃ -D-Bpg
Gly 2	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 4	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 5	helikal	helikal	helikal	helikal
Ile 8	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 10	helikal	helikal	β -Faltblatt	helikal
Leu 13	helikal	β -Faltblatt	β -Faltblatt	β -Faltblatt
Leu 16	helikal/ β -Faltblatt	β -Faltblatt	β -Faltblatt	β -Faltblatt
Ile 20	helikal	β -Faltblatt	helikal	β -Faltblatt
Leu 21	helikal	β -Faltblatt	helikal	β -Faltblatt

Im Gegensatz zu diesen aggregierenden *L*-Epimeren zeigten die *D*-Epimere TP10-L13-, -L16-, -I20- und -L21-CF₃-*D*-Bpg bereits nach 1 Tag ein für β -Faltblätter typisches Spektrum. Das Signal nimmt bei diesen Analoga nach 5 bzw. 8 Tagen sogar zu. In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse der Messungen nach 1 Tag und 5 Tagen zusammengefasst, da nach 8 Tagen keine maßgeblichen Veränderungen mehr auftreten.

Die TP10-Analoga zeigen ein spezielles Aggregationsmuster. Dabei zeigen ausnahmslos die TP10-Analoga mit einer Markierung im C-terminalen, also dem Mastoparanteil, eine deutliche Aggregation als β -Faltblatt. Bei den helikalen Spektren weist die Bande um 208 nm auf einen S-state, also oberflächengebundenen Zustand des Peptids, hin.

4.5.1.2 OCD-Spektren der CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga mit P/L=1:100

Im OCD-Spektrum des Wildtyps (Abbildung 4.16), gemessen bei P/L=1:100, kann ebenfalls ein Intensitätsverlust, ähnlich dem Spektrum bei P/L=1:50, beobachtet werden.

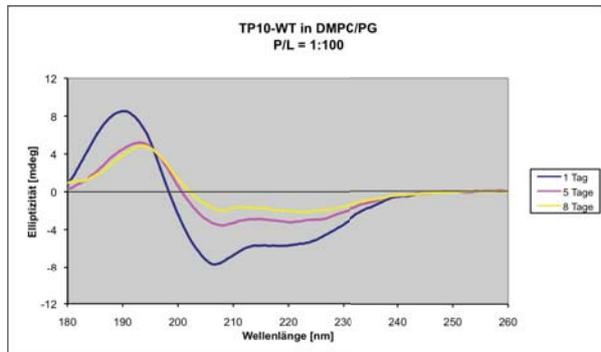


Abbildung 4.16: OCD-Spektrum von TP10-WT in DMPC/PG (3:1) mit P/L=1:100 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

Das OCD-Signal nimmt über den Messzeitraum von 8 Tagen schrittweise ab und darüber hinaus findet eine Verschiebung der Banden um 190 und 208 nm hin zu größeren Wellenlängen statt. Im Gegensatz zu den Spektren, die bei einem P/L von 1:50 aufgenommen wurden, deutet die Form des Spektrums nach 5 bzw. 8 Tagen darauf hin, dass das Peptid in einem geneigten helikalen Zustand bezüglich der Membrannormalen vorliegt. Die entsprechenden OCD-Spektren der Analoga TP10-G2-, -L4-, -L5-, -I8-, -I20- und -L21-CF₃-*L*-Bpg und TP10-G2-, -L4-, -L5-, -I8- und -L10-CF₃-*D*-Bpg (Abbildung 4.17 und 4.18) bei P/L=1:100 zeigen ein ähnliches Verhalten.

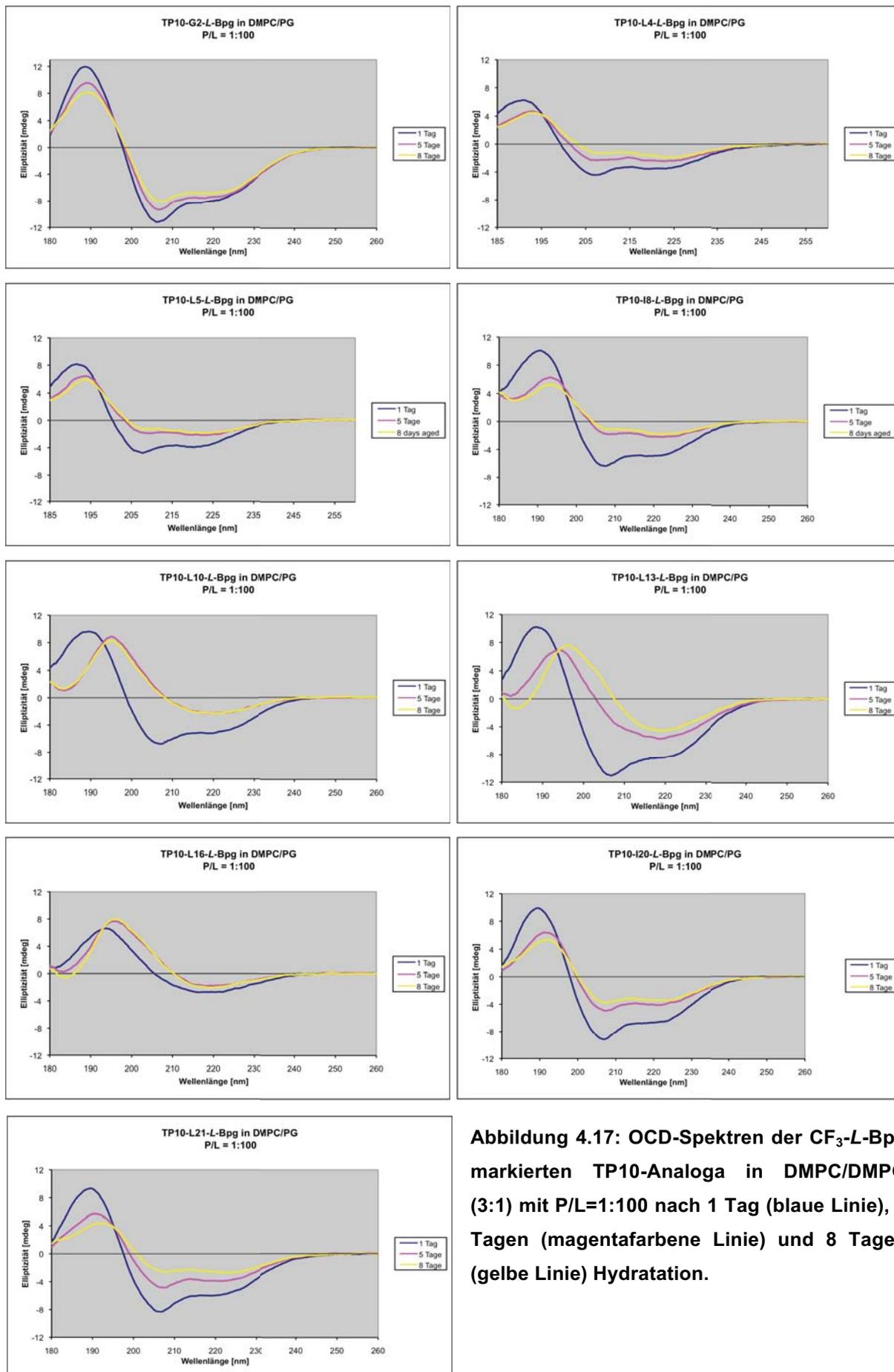


Abbildung 4.17: OCD-Spektren der CF_3 -L-Bpg markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:100 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

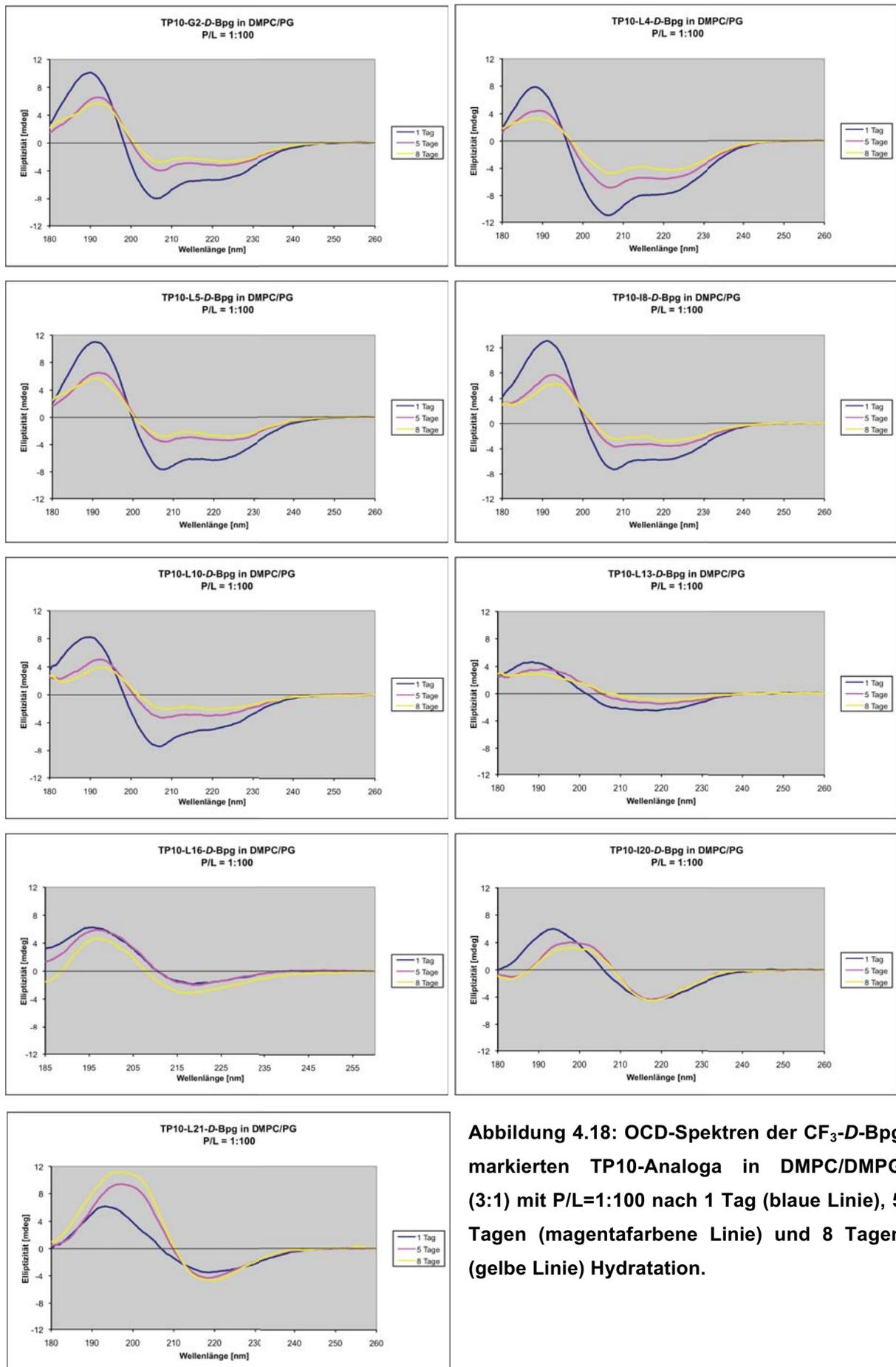


Abbildung 4.18: OCD-Spektren der CF_3 -D-Bpg markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:100 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

Bei TP10-L10-, -L13- und -L16-CF₃-L-Bpg ist eine Umwandlung von einer helikalen Struktur zu einem β -Faltblatt ersichtlich, wobei diese Umwandlung bei Letzterem nicht so deutlich ausgeprägt ist, da dieses Epimer schon nach 1 Tag hohe Anteile an β -Faltblatt-Strukturen aufweist. Die *D*-Epimere TP10-L13-, -L16-, -L20- und -L21-CF₃-*D*-Bpg zeigen von Beginn an ein für β -Faltblätter typisches Spektrum, wobei sich das Spektrum von TP10-L13-CF₃-*D*-Bpg leicht von den anderen genannten *D*-Epimeren unterscheidet. Eine Übersicht des Aggregationsverhalten bei P/L=1:100 zeigt Tabelle 4.6.

Tabelle 4.6: Aggregationsverhalten der *L*- und *D*-Epimere nach 1 Tag und 5 Tagen mit P/L=1:100. Die deutlich als β -Faltblatt aggregierenden Analoga sind jeweils farblich hervorgehoben.

	1 Tag		5 Tage	
Wildtyp	helikal		helikal	
Markierte Position	CF₃-L-Bpg	CF₃-D-Bpg	CF₃-L-Bpg	CF₃-D-Bpg
Gly 2	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 4	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 5	helikal	helikal	helikal	helikal
Ile 8	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 10	helikal	helikal	β -Faltblatt	helikal
Leu 13	helikal	helikal/ β -Faltblatt	β -Faltblatt	β -Faltblatt
Leu 16	β -Faltblatt	β -Faltblatt	β -Faltblatt	β -Faltblatt
Ile 20	helikal	β -Faltblatt	helikal	β -Faltblatt
Leu 21	helikal	β -Faltblatt	helikal	β -Faltblatt

Der Wildtyp und alle TP10-Analoga zeigen bei einem P/L von 1:100 ein ähnliches Aggregationsverhalten wie bei P/L=1:50. Nur wenn die ¹⁹F-markierte Aminosäure in den C-terminalen Mastoparanteil des Peptids inkorporiert ist, tritt Aggregation in Form von β -Faltblättern auf. In den Spektren, die eine helikale Struktur aufweisen, ist nach 5 Tagen ein Übergang in einen geneigten helikalen Zustand erkennbar.

4.5.1.3 OCD-Spektren der CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga mit P/L=1:200

Im OCD-Spektrum des Wildtyps (Abbildung 4.19) ist bei P/L=1:200, ähnlich wie bei den anderen gemessenen P/L's beobachtet, ebenfalls ein deutlicher Intensitätsverlust und eine Verschiebung der Banden als Zeichen der Aggregation erkennbar. Im Vergleich zu den Spektren, die bei einem P/L von 1:100 aufgenommen wurden, deutet die Form des Spektrums nach 5 bzw. 8 Tagen noch deutlicher darauf hin, dass das Peptid einen geneigten helikalen Zustand bezüglich der Membrannormalen annimmt. Die negative Bande um 208 nm ist weniger ausgeprägt als die negative Bande um 220 nm. In den Spektren der TP10-Analoga, in denen Position 2, 4, 5, 8, 10, 13, 20 und 21 durch CF₃-L-Bpg (Abbildung 4.20) und Position 2, 4, 5, 8, und 10 durch CF₃-D-Bpg (Abbildung 4.21) substituiert ist, ist ein ähnliches Verhalten erkennbar.

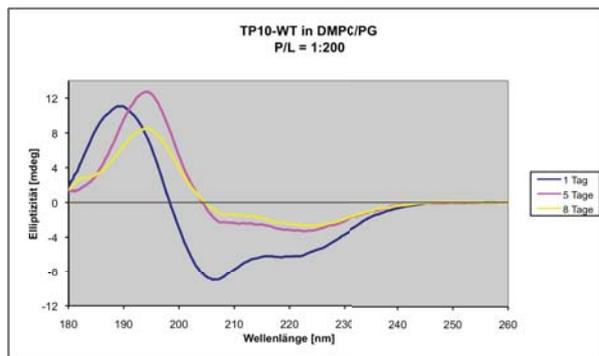


Abbildung 4.19: OCD-Spektrum von TP10-WT in DMPC/PG (3:1) mit P/L=1:200 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

TP10-L16-CF₃-L-Bpg und TP10-L13-, -I20- und -L21-CF₃-D-Bpg liegen nach 1 Tag noch helikal vor, jedoch findet nach 5 Tagen Aggregation zu einem β -Faltblatt statt. TP10-L16-CF₃-D-Bpg ist bereits nach 1 Tag aggregiert und kann somit als das am stärksten aggregierende TP10-Analogon betrachtet werden. Die Unebenheiten in den Spektren zwischen 180 und 190 nm werden durch Streueffekte des Lipidfilms verursacht, der im Vergleich zu P/L=1:50 und P/L=1:100 eine deutlich größere Schichtdicke aufweist, da die vierfache bzw. doppelte Menge an Lipid verwendet wurde. In Tabelle 4.7 sind die Ergebnisse der OCD-Messungen bei P/L=1:200 zusammengefasst. Wieder ist ein spezielles C-terminales Aggregationsmuster erkennbar, jedoch aggregieren bei P/L=1:200 deutlich weniger L-Epimere, nur TP10-L16-CF₃-L-Bpg, als β -Faltblatt. Bei den D-Epimeren zeigt nach 1 Tag ebenfalls nur TP10-L16-CF₃-D-Bpg Aggregation als β -Faltblatt. In den Spektren, in denen die Linienform auf eine helikale Struktur hinweist, ist nach 5 Tagen, ähnlich wie bei P/L=1:100, ein Übergang in einen geneigten helikalen Zustand erkennbar.

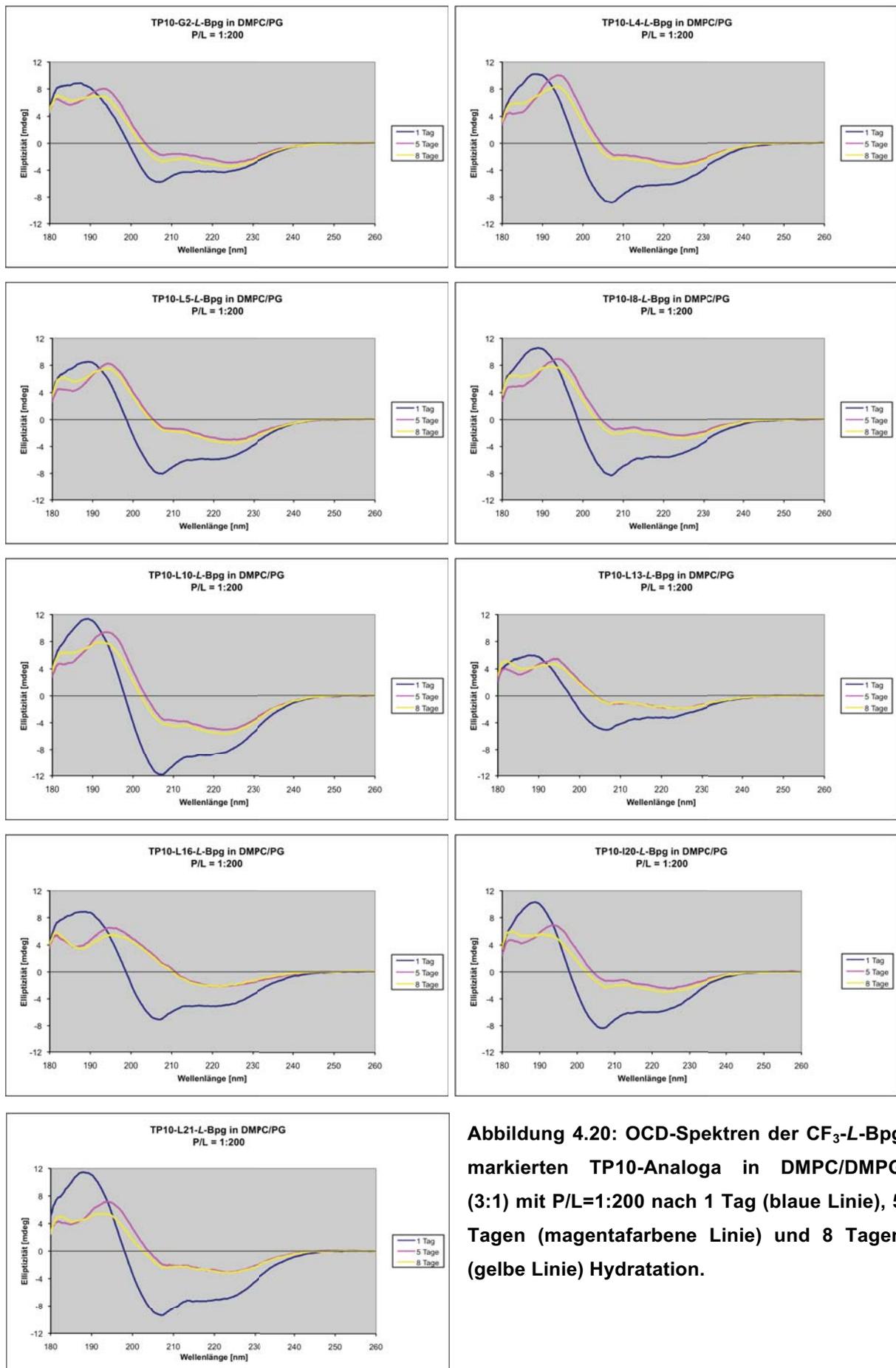


Abbildung 4.20: OCD-Spektren der CF_3 -L-Bpg markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:200 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

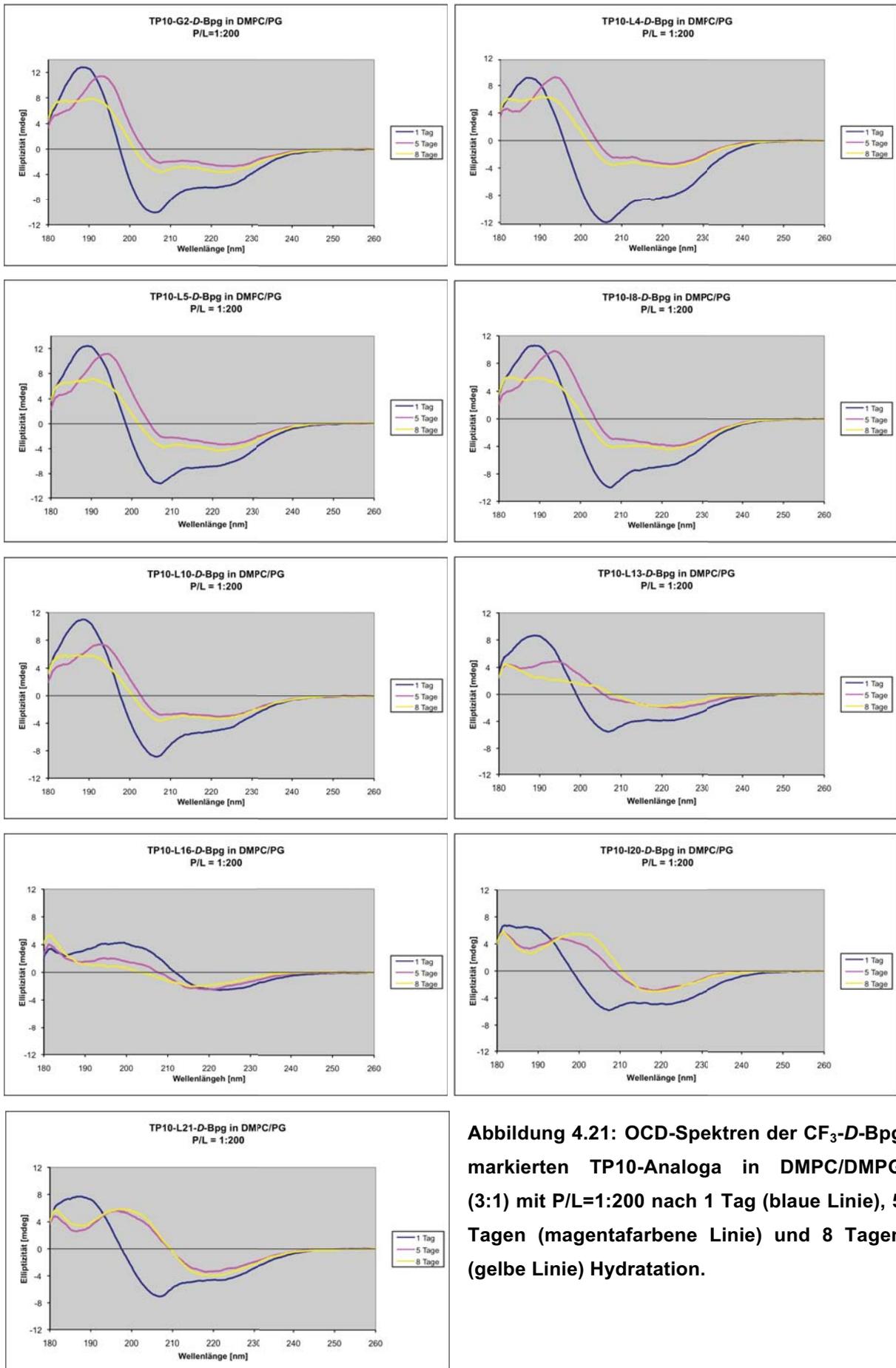


Abbildung 4.21: OCD-Spektren der CF_3 -D-Bpg markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:200 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

Tabelle 4.7: Aggregationsverhalten der L- und D-Epimere nach 1 Tag und 5 Tagen mit P/L=1:200. Die deutlich als β -Faltblatt aggregierenden Analoga sind jeweils farblich hervorgehoben.

	1 Tag		5 Tage	
Wildtyp	helikal		helikal	
Markierte Position	CF ₃ -L-Bpg	CF ₃ -D-Bpg	CF ₃ -L-Bpg	CF ₃ -D-Bpg
Gly 2	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 4	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 5	helikal	helikal	helikal	helikal
Ile 8	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 10	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 13	helikal	helikal	helikal	β -Faltblatt
Leu 16	helikal	β -Faltblatt	β -Faltblatt	β -Faltblatt
Ile 20	helikal	helikal	helikal	β -Faltblatt
Leu 21	helikal	helikal	helikal	β -Faltblatt

4.5.2 OCD-Spektren der CF- und CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga

Der CF-markierte Wildtyp (Abbildung 4.22) zeigt ein ähnliches Verhalten wie der unmarkierte Wildtyp. Der Intensitätsverlust des OCD-Signals kann durch Zusammenlagerung von helikalen Strukturen oder die partielle Umwandlung α -helikaler Strukturanteilen in β -Faltblätter erklärt werden. Auch bei den CF-markierten L-Epimeren (Abbildung 4.23) tritt ein Intensitätsverlust auf, aber im Gegensatz zu den nicht CF-markierten L-Epimeren zeigt keines der Analoga eine vollständige Umwandlung in ein β -Faltblatt.

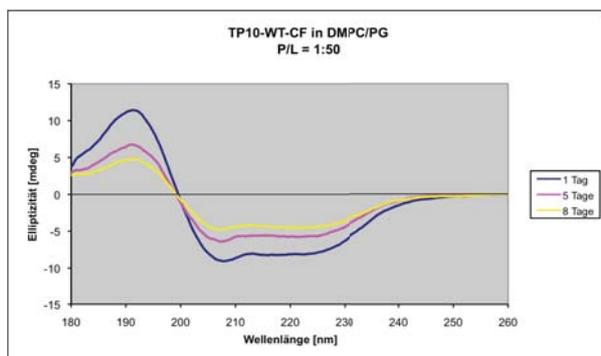


Abbildung 4.22: OCD-Spektrum von TP10-WT-CF in DMPC/PG (3:1) mit P/L=1:200 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

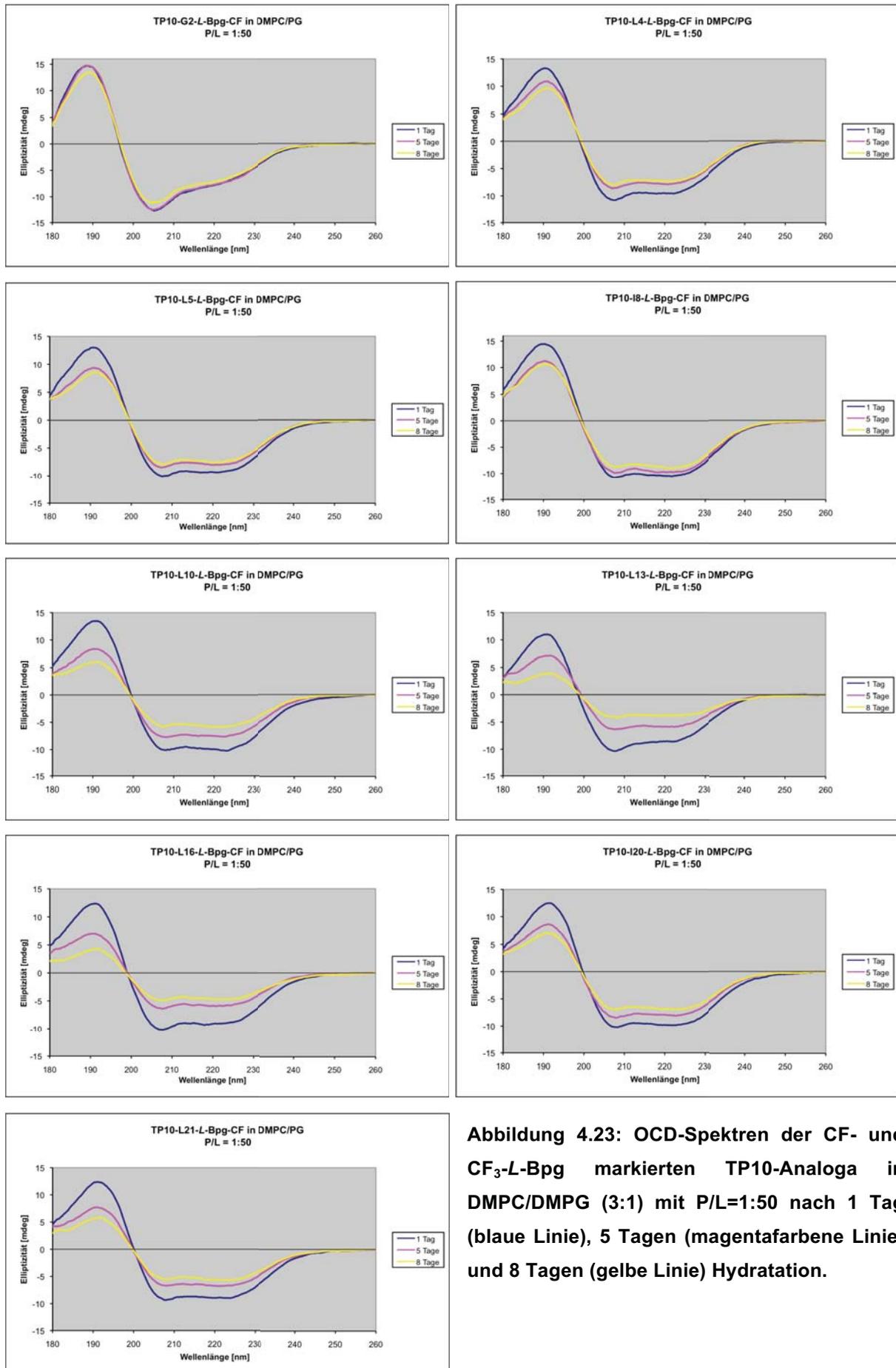


Abbildung 4.23: OCD-Spektren der CF- und CF₃-L-Bpg markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:50 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

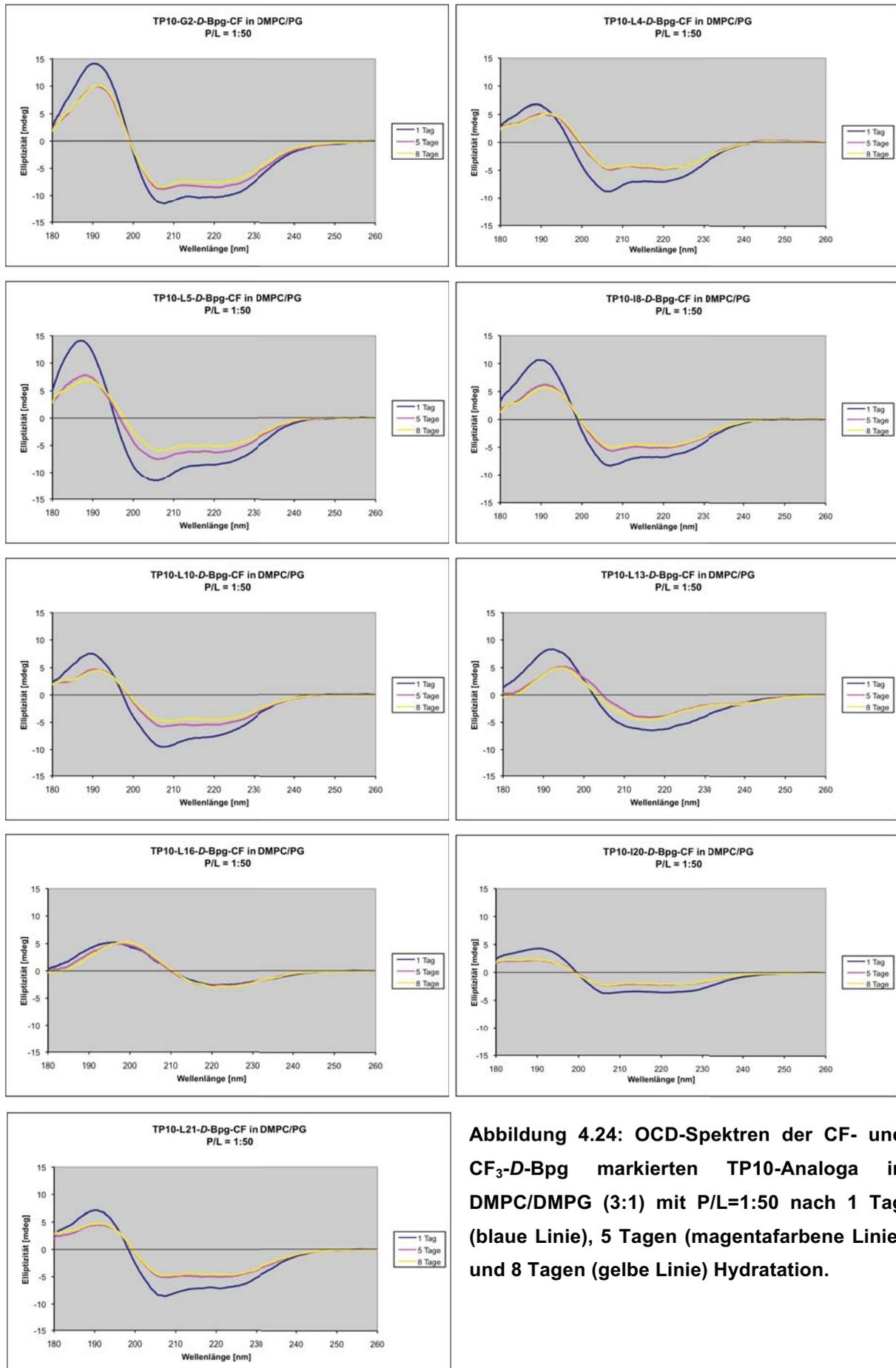


Abbildung 4.24: OCD-Spektren der CF- und CF₃-D-Bpg markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:50 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

Nur bei dem CF-markierten *D*-Epimer TP10-L13- (Abbildung 4.24) kann dieser Wechsel beobachtet werden. Das Analogon TP10-L16-CF₃-*D*-Bpg liegt bereits am 1.Tag als β -Faltblatt vor. Eine Verschiebung der Banden ist nur in den Spektren der *D*-Epimere TP10-G2-, -L4-, -L5-, -I8-, -L10-, -L13- und -L21-CF₃-*D*-Bpg ersichtlich. Eine Ausnahme unter allen Epimeren stellt das OCD-Spektrum von TP10-G2-CF₃-*L*-Bpg dar, dessen Form maßgeblich von den anderen Spektren abweicht und deutliche Anteile ungeordneter Strukturanteile (Minimum bei 208 nm kurzwellig verschoben) zeigt. Darüber hinaus ist bei diesem Analogon kaum ein Intensitätsverlust des OCD-Signals erkennbar. Tabelle 4.8 zeigt eine Übersicht des Aggregationsverhaltens.

Tabelle 4.8: Aggregationsverhalten der CF-markierten *L*- und *D*-Epimere nach 1 Tag und 5 Tagen mit P/L=1:50. Die deutlich als β -Faltblatt aggregierenden Analoga sind jeweils farblich hervorgehoben.

	1 Tag		5 Tage	
Wildtyp	helikal		helikal	
Markierte Position	CF ₃ - <i>L</i> -Bpg	CF ₃ - <i>D</i> -Bpg	CF ₃ - <i>L</i> -Bpg	CF ₃ - <i>D</i> -Bpg
Gly 2	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 4	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 5	helikal	helikal	helikal	helikal
Ile 8	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 10	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 13	helikal	helikal/ β -Faltblatt	helikal	β -Faltblatt
Leu 16	helikal	β -Faltblatt	helikal	β -Faltblatt
Ile 20	helikal	helikal	helikal	helikal
Leu 21	helikal	helikal	helikal	helikal

Bei den CF-markierten TP10-Analoga tritt deutlich weniger Aggregation, und in Form von β -Faltblättern nur bei den *D*-Epimeren, als bei den Analoga ohne Fluoreszenzmarkierung auf.

4.5.3 OCD-Spektren der CF- markierten TP-Analoga

In allen OCD-Spektren des Wildtyps und der CF-markierten TP-Analoga (Abbildung 4.25) ist ein Intensitätsverlust des Signals ersichtlich, entweder durch die Zusammenlagerung von helikalen Strukturen oder Aggregation durch teilweise Umwandlung helikaler Strukturanteile in β -Faltblätter verursacht. In Tabelle 4.9 sind die Ergebnisse der OCD-Spektren der TP-Analoga zusammengefasst.

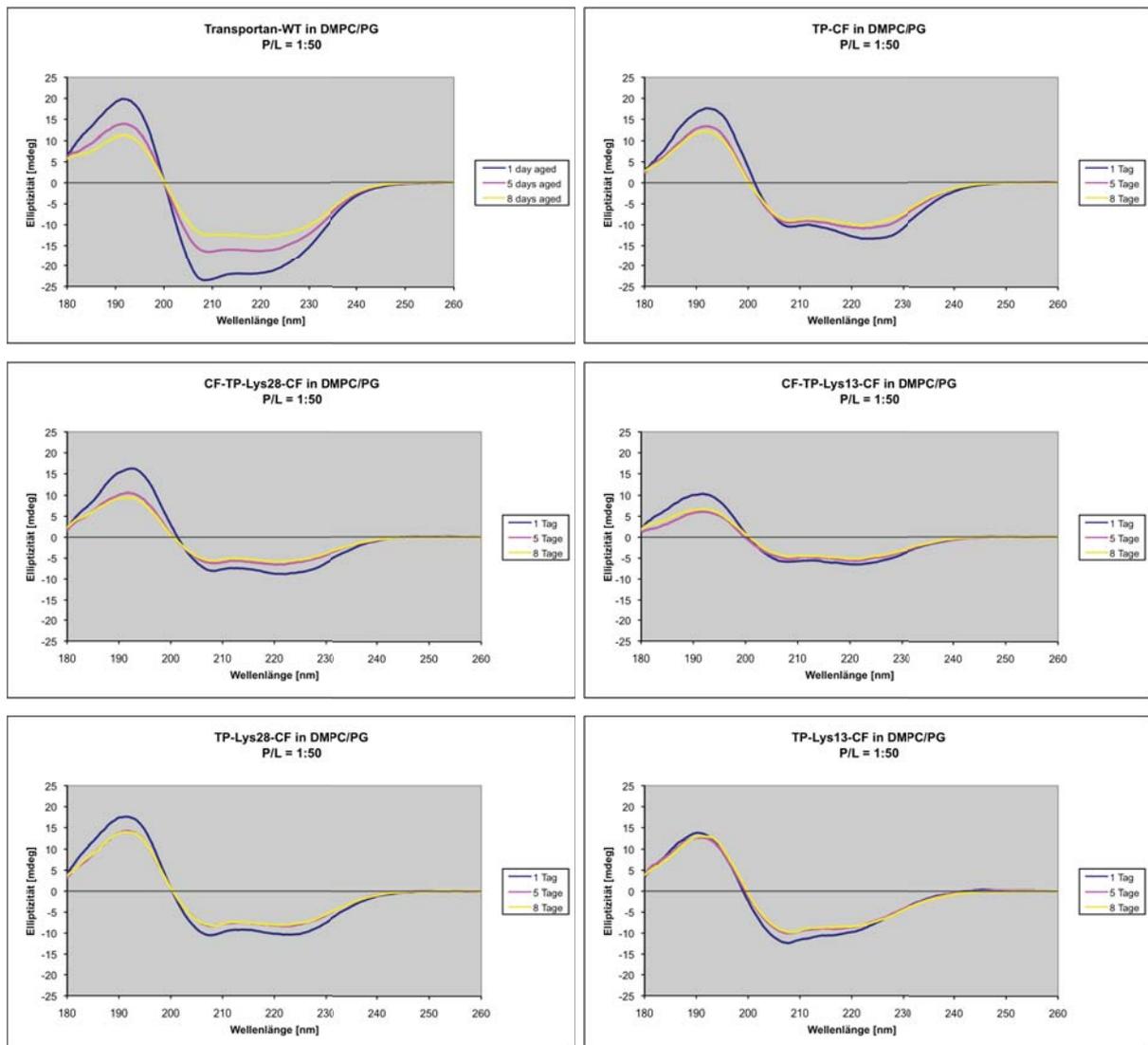


Abbildung 4.25: OCD-Spektren der CF-markierten TP-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:50 nach 1 Tag (blaue Linie), 5 Tagen (magentafarbene Linie) und 8 Tagen (gelbe Linie) Hydratation.

Tabelle 4.9: Aggregationsverhalten von TP-WT und den CF-markierten TP-Analoga nach 1 Tag und 5 Tagen mit P/L=1:50.

	1 Tag	5 Tage
TP-CF	helikal	helikal
CF-TP-Lys28-CF	helikal	helikal
CF-TP-Lys13-CF	helikal	helikal
TP-Lys28-CF	helikal	helikal
TP-Lys13-CF	helikal	helikal

4.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der OCD-Spektroskopie

Sowohl der Wildtyp als auch alle untersuchten TP10- (mit und ohne CF-Markierung) und TP-Analoga zeigen einen Intensitätsverlust des OCD-Signals, der durch die Zusammenlagerung helikaler Strukturen oder durch eine partielle Umwandlung helikaler Sekundärstrukturanteile in β -Faltblätter, dessen Signalintensität deutlich geringer als die einer α -Helix ist, erklärt werden kann. Darüber hinaus ist eine langwellige Verschiebung der positiven Bande um 190 nm und der negativen Bande um 208 nm ein Hinweis auf einen teilweisen Übergang helikaler in β -Faltblatt-Strukturen. In einigen Spektren konnte ein Wechsel eines vorwiegend helikalen Spektrums in ein für β -Faltblätter typisches Spektrum beobachtet werden. Dabei trat starke Aggregation hauptsächlich bei den Analoga auf, die die Markierung im C-terminalen Mastoparanteil tragen. Die Linienform der vorwiegend α -helikalen Spektren nach 1 Tag weist auf einen S-state, also oberflächengebundenen Zustand, des Peptids hin.

4.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Morphologie der Aggregate von TP10-WT, jeweils eines, wie mittels OCD festgestellt, aggregierenden *L*- und *D*-Epimers (TP10-L16-CF₃-*L*-Bpg und TP10-L16-CF₃-*D*-Bpg) und eines CF-markierten TP10-Analogons (TP10-L4-CF₃-*L*-Bpg-CF) wurde mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (negative Kontrastierung) untersucht. Dabei wurden die Peptide aus wässriger Lösung ohne Lipide direkt auf

die Trägernetzchen aufgetragen. Bei TP10-WT (Abbildung 4.26 A) und TP10-L4-CF₃-L-Bpg-CF (Abbildung 4.26 D) sind globuläre Agglomerate, bei TP10-L16-CF₃-L-Bpg (Abbildung 4.26 B) und TP10-L16-CF₃-D-Bpg (Abbildung 4.26 C) dagegen netzartige Strukturen, in der Form ähnlich wie amyloide Fibrillen, erkennbar. Die Aggregation findet scheinbar bei diesen Peptiden bereits in Lösung, auch ohne Bindung an Lipide, statt.

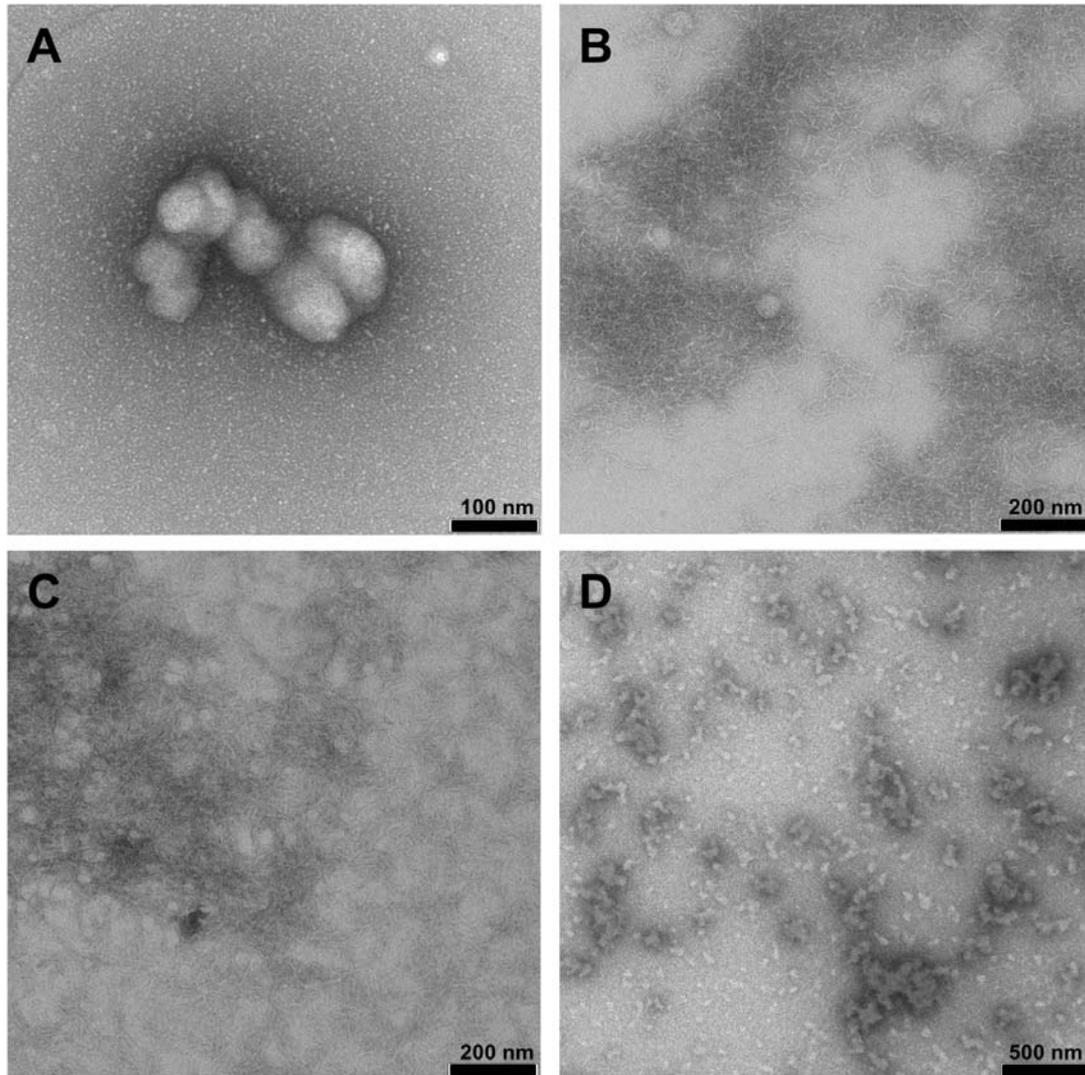


Abbildung 4.26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) TP10-WT, (B) TP10-L16-CF₃-L-Bpg, (C) TP10-L16-CF₃-D-Bpg und (D) TP10-L4-CF₃-L-Bpg-CF. Die Konzentration der Peptide beträgt 2 mM und die Proben wurden mittels Uranylacetat negativ kontrastiert.

4.7 Festkörper-NMR-Spektroskopie

4.7.1 ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Mithilfe der ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektroskopie lässt sich die Orientierung und Phase von Phospholipiden untersuchen (siehe Kapitel 1.7.4). In dieser Arbeit wurde mittels ^{31}P -NMR die Orientierung der Lipide überprüft. Durch Vergleich der Spektren der reinen Lipidmischung aus DMPC/DMPG (3:1), des Wildtyps in DMPC/DMPG und der TP10-Analoga in DMPC/DMPG, konnte ein störender Einfluss der ^{19}F -markierten TP10-Analoga auf die Orientierung der Phospholipiddoppelschichten ausgeschlossen werden, da alle Experimente ein nahezu identisches Signal lieferten (Abbildung 4.27). Die Integration der Spektren ergab bei allen gemessenen Proben einen Orientierungsgrad von mindestens 80%.

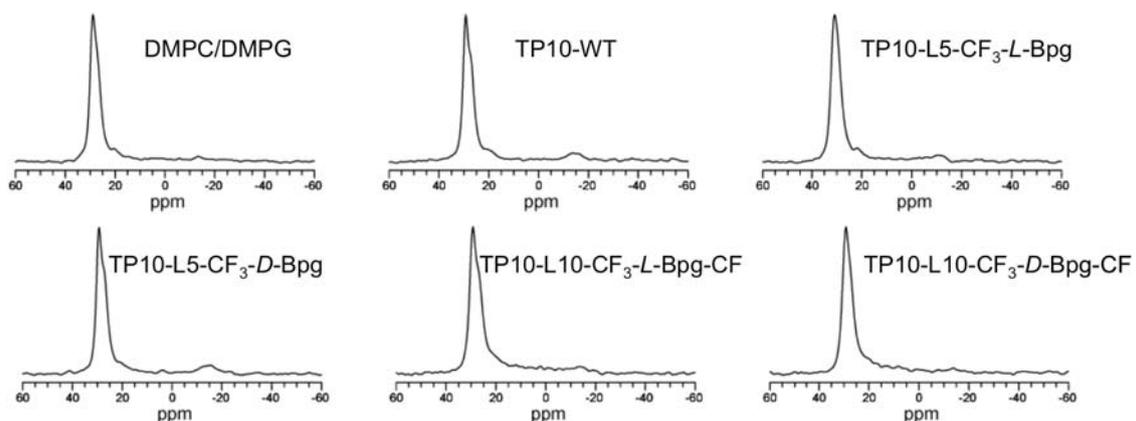


Abbildung 4.27: ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren der reinen Lipidmischung aus DMPC/DMPG (3:1), des Wildtyps, jeweils eines *L*- und *D*-Epimers und jeweils eines CF-markierten CF_3 -*L*- und *-D*-Bpg markierten TP10-Analogons in DMPC/PG (3:1) mit P/L=1:200. Die Spektren wurden bei 313 K (40°C) aufgenommen.

Jeweils vor und nach jedem ^{19}F -Festkörper-NMR-Experiment wurde ein ^{31}P -NMR-Spektrum in der 0° -Orientierung aufgenommen um die Integrität der Proben nachzuweisen, die eine Verwendung der ermittelten Daten für die Strukturanalyse ermöglicht. Alle gemessenen ^{31}P -NMR-Festkörper-NMR-Spektren zeigten einen hohen Orientierungsgrad, weshalb auf deren Darstellung im Folgenden verzichtet wird.

4.7.2 ¹⁹F-Festkörper-NMR-Spektroskopie

4.7.2.1 ¹⁹F-Festkörper-NMR-Spektren der CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga

In den Abbildungen 4.28 bis 4.33 sind die ¹⁹F-Festkörper-NMR-Spektren der *L*- und *D*-Epimere in orientierten DMPC/DMPG-Lipiddoppelschichten bei jeweils drei verschiedenen P/L's (P/L=1:50, 1:200 und 1:400) gezeigt. Ähnlich den Beobachtungen in den OCD-Spektren tritt ein spezielles Aggregationsmuster, vor allem bei den Spektren mit P/L=1:50, auf. Dabei resultiert vorwiegend bei Epimeren, die die Markierung im C-terminalen Teil des Peptids tragen, ein Pulverspektrum.

Bei P/L=1:50 zeigen die *L*-Epimere TP10-G2-, -L13- und -L16-CF₃-*L*-Bpg ein Pulverspektrum (Abbildung 4.28). Im Spektrum von TP10-L10-CF₃-*L*-Bpg ist auch ein geringer Pulveranteil erkennbar. Bereits bei P/L=1:200 ist bei allen *L*-Epimeren, mit Ausnahme von TP10-G2-CF₃-*L*-Bpg, das Triplet deutlich ausgeprägt und damit die dipolare Kopplung eindeutig bestimmbar (Abbildung 4.29). Bei einem P/L von 1:400 zeigt keines der *L*-Epimere ein Pulverspektrum (Abbildung 4.30).

Die *D*-Epimere TP10-L13-, -L16-, -L20- und -L21-CF₃-*D*-Bpg weisen bei P/L=1:50 ein Pulverspektrum auf, während in den Spektren von TP10-G2-, -L4-, -L5-, -L8- und -L10-CF₃-*D*-Bpg die Triplets zu erkennen sind (Abbildung 4.31). Bei einem P/L von 1:200 zeigen nur noch TP10-L16- und -L21-CF₃-*D*-Bpg (Abbildung 4.32) und bei P/L=1:400 nur noch TP10-L16-CF₃-*D*-Bpg ein Pulverspektrum (Abbildung 4.33).

Bei einem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis von 1:400 sind damit bei allen Epimeren, bis auf das Analogon TP10-L16-CF₃-*D*-Bpg, die erwarteten Triplets deutlich zu erkennen und die dipolaren Kopplungen bestimmbar (Tabelle 4.10 und 4.11). Für TP10-L16-CF₃-*D*-Bpg konnte die dipolare Kopplung bei P/L=1:800 (Abbildung 4.34) eindeutig bestimmt werden. Die Halbierung der dipolaren Kopplung bei der 90°-Orientierung der Probe, die durch die schnelle Rotation der Peptide um die Membrannormale zustande kommt, dient dabei als Beweis, dass die Peptide nicht aggregiert/immobilisiert vorliegen. Auffällig ist, dass sich die dipolaren Kopplungen bei verschiedenen P/L's nicht verändern (Tabelle 4.10 und 4.11) und sich somit auch die Orientierung des gesamten Peptids mit sinkender Konzentration nicht wesentlich verändern kann.

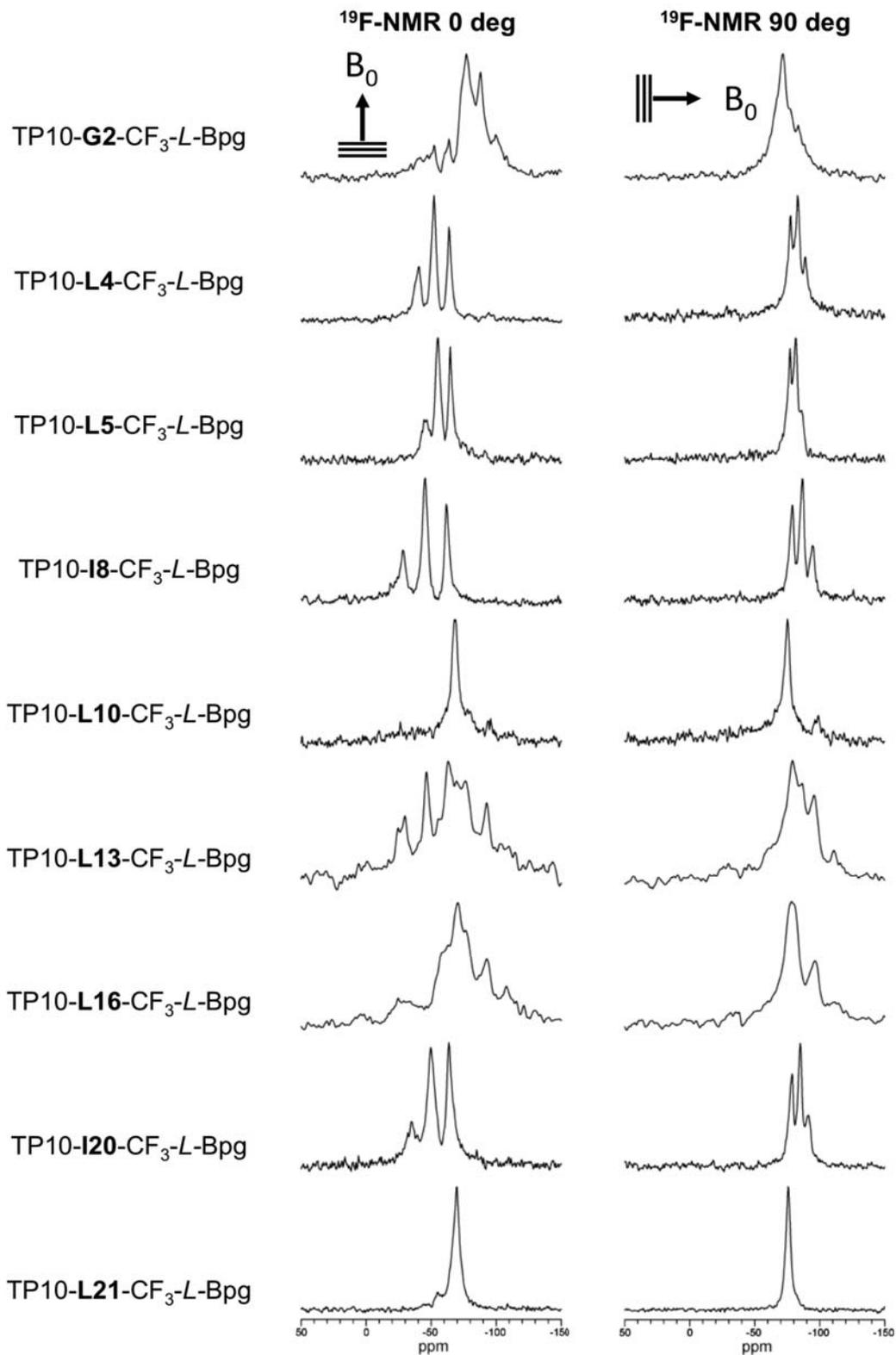


Abbildung 4.28: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der *L*-Epimere in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:50. Für jedes TP10-Analogon ist jeweils das Spektrum bei 0°- und 90°-Orientierung der Probe (Membrannormale) relativ zum externen Magnetfeld B_0 gezeigt. Die Spektren wurden bei 313 K (40°C) aufgenommen.

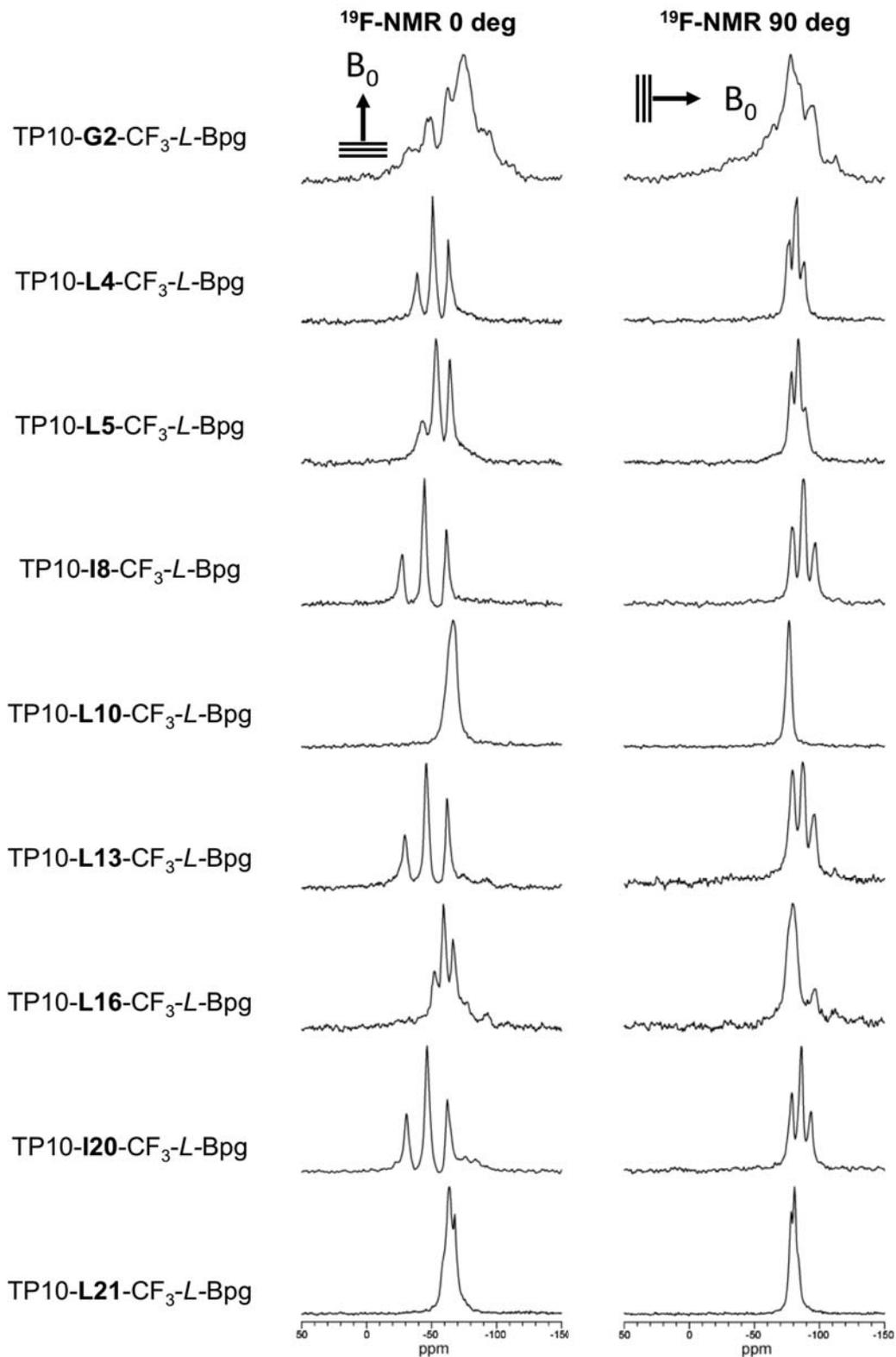


Abbildung 4.29: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der *L*-Epimere in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:200. Für jedes TP10-Analogon ist jeweils das Spektrum bei 0° - und 90° -Orientierung der Probe (Membrannormale) relativ zum externen Magnetfeld B_0 gezeigt. Die Spektren wurden bei 313 K (40°C) aufgenommen.

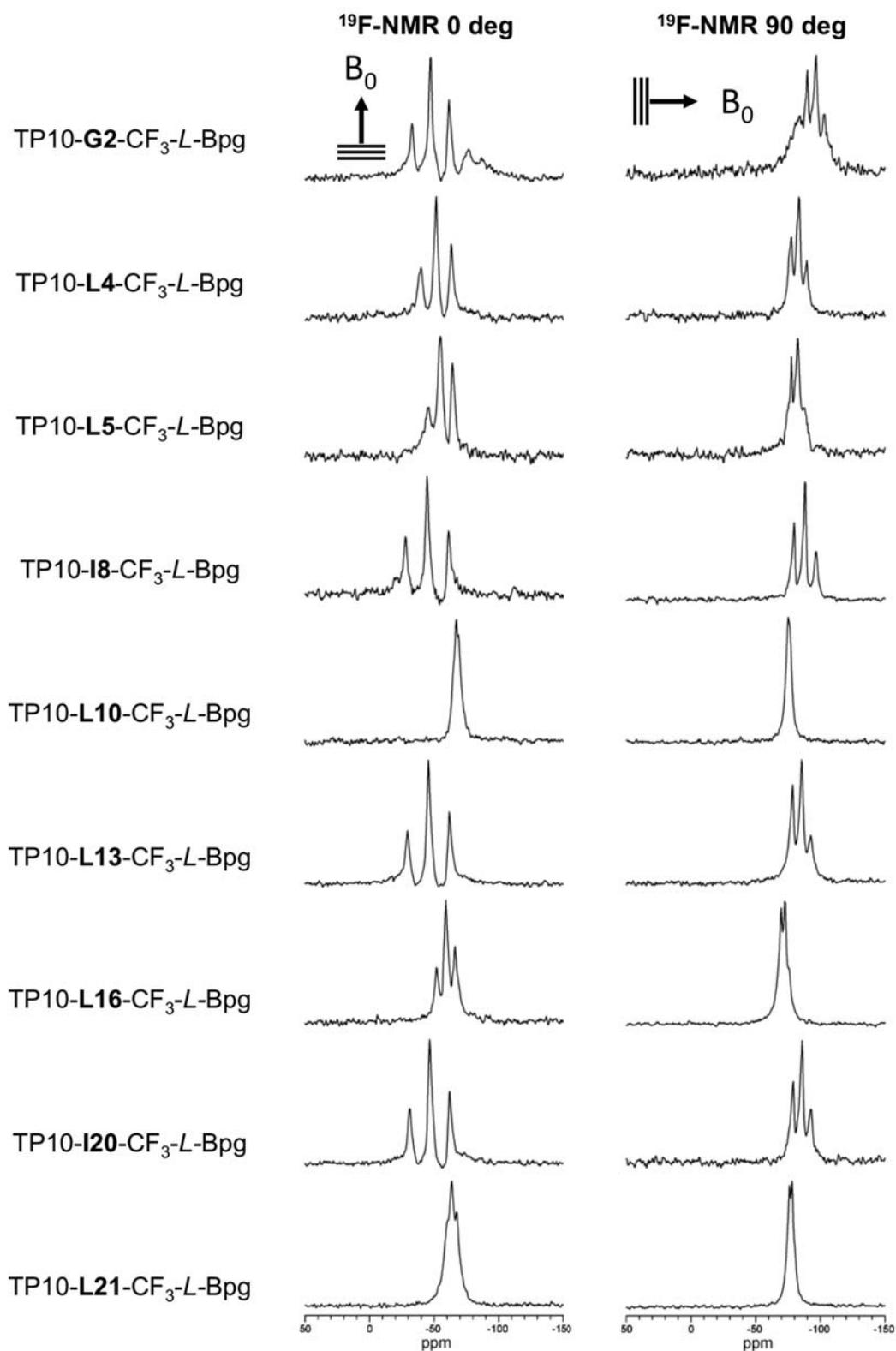


Abbildung 4.30: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der *L*-Epimere in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:400. Für jedes TP10-Analogon ist jeweils das Spektrum bei 0°- und 90°-Orientierung der Probe (Membrannormale) relativ zum externen Magnetfeld B_0 gezeigt. Die Spektren wurden bei 313 K (40°C) aufgenommen.

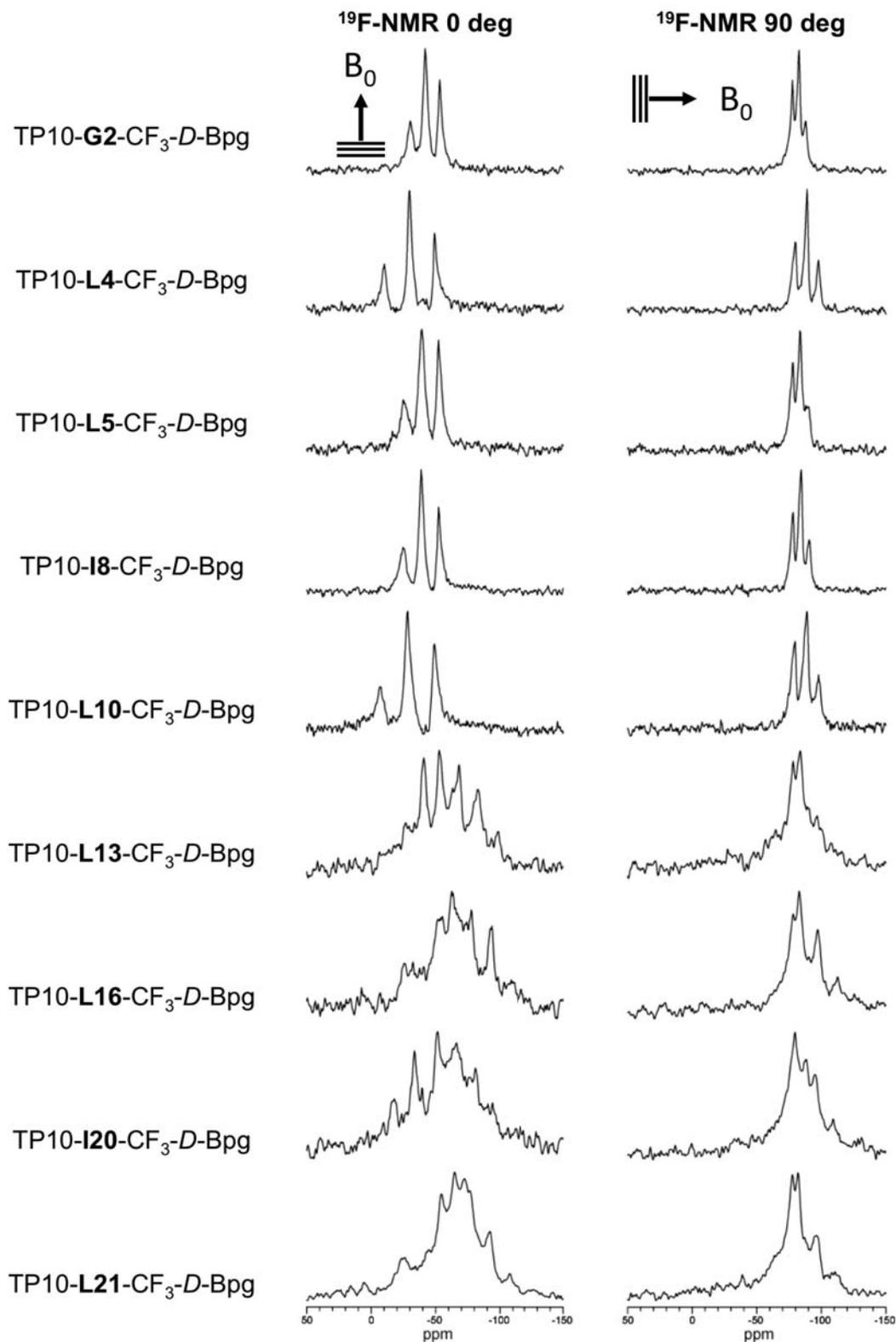


Abbildung 4.31: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der *D*-Epimere in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:50. Für jedes TP10-Analogon ist jeweils das Spektrum bei 0°- und 90°-Orientierung der Probe (Membrannormale) relativ zum externen Magnetfeld B_0 gezeigt. Die Spektren wurden bei 313 K (40°C) aufgenommen.

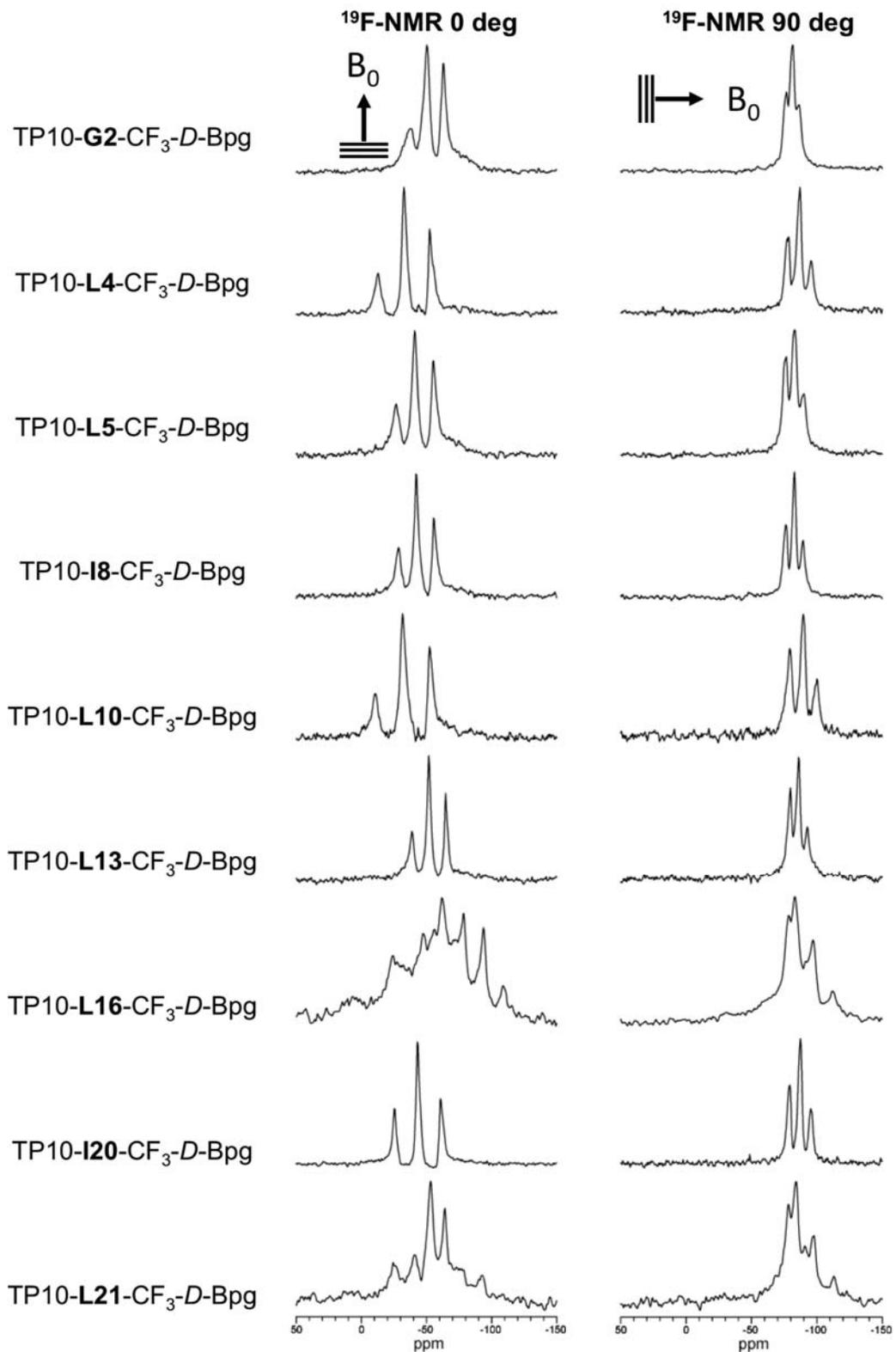


Abbildung 4.32: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der *D*-Epimere in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:200. Für jedes TP10-Analogon ist jeweils das Spektrum bei 0°- und 90°-Orientierung der Probe (Membrannormale) relativ zum externen Magnetfeld B_0 gezeigt. Die Spektren wurden bei 313 K (40°C) aufgenommen.

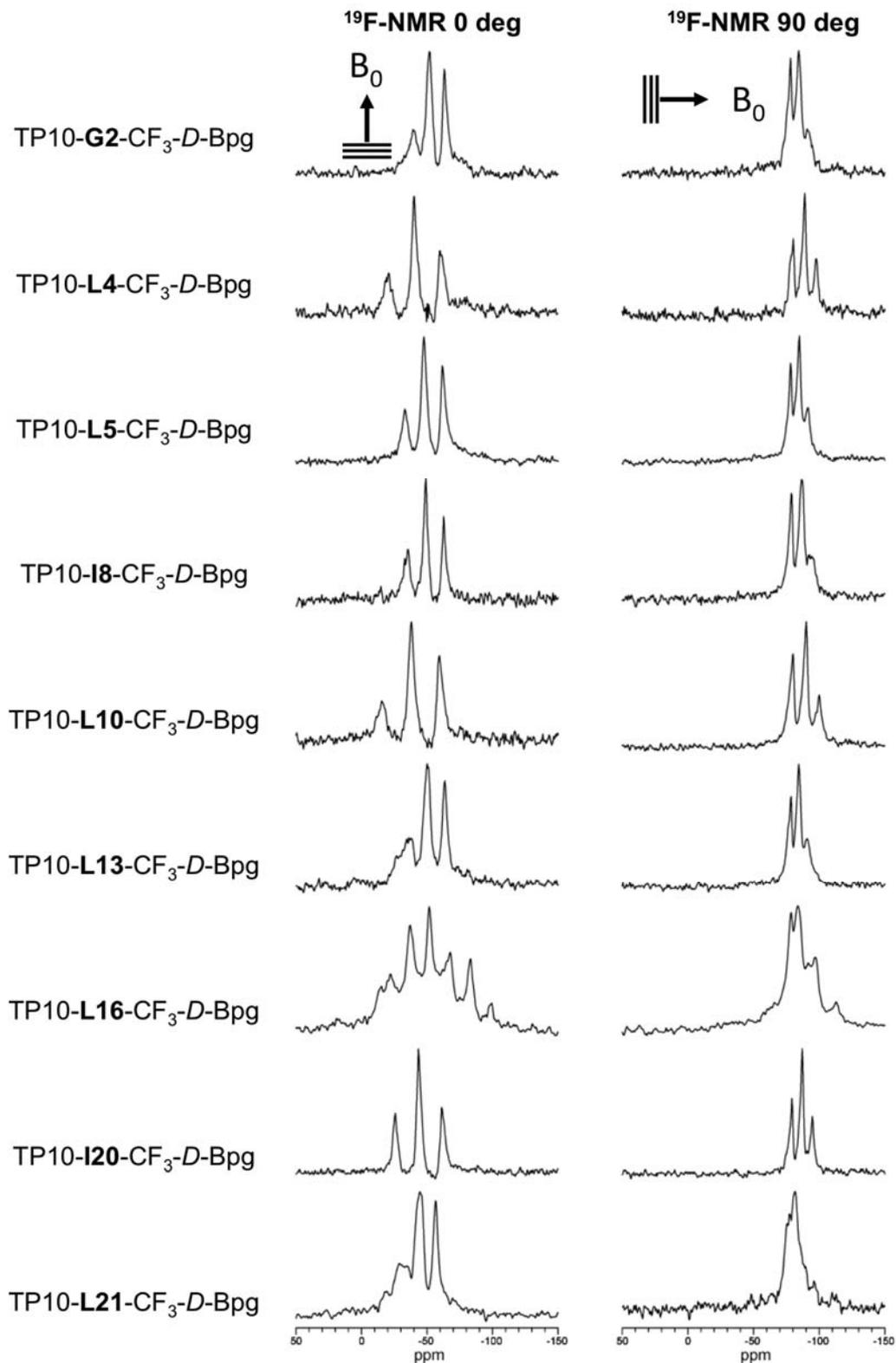


Abbildung 4.33: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der *D*-Epimere in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:400. Für jedes TP10-Analogon ist jeweils das Spektrum bei 0°- und 90°-Orientierung der Probe (Membrannormale) relativ zum externen Magnetfeld B_0 gezeigt. Die Spektren wurden bei 313 K (40°C) aufgenommen.

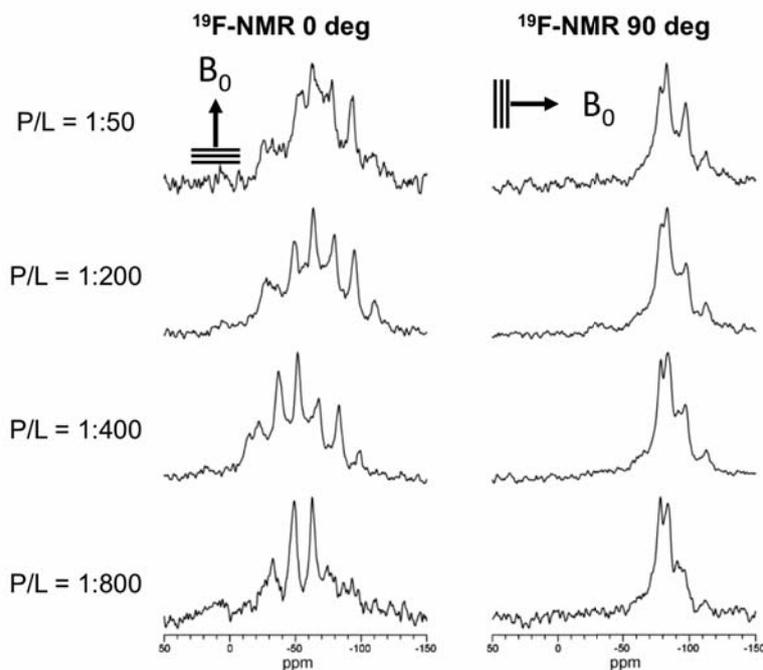


Abbildung 4.34: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren von TP10-L16- CF_3 -D-Bpg bei P/L=1:50, 1:200, 1:400 und 1:800. Nur bei P/L=1:800 ist eine eindeutige Bestimmung der dipolaren Kopplung möglich.

Tabelle 4.10: Dipolare Kopplungen bei 0° - und 90° -Orientierung der Probe bezüglich des externen Magnetfelds der L-Epimere bei P/L=1:50, 1:200 und 1:400. Die Pulverspektren weisen bei 0° - und 90° -Orientierung eine dipolare Kopplung von 7,5 kHz auf und sind farblich hervorgehoben.

Peptid	Dipolare Kopplung					
	P/L=1:50		P/L=1:200		P/L=1:400	
	0° [kHz]	90° [kHz]	0° [kHz]	90° [kHz]	0° [kHz]	90° [kHz]
TP10-G2- CF_3 -L-Bpg	7.5	7.5	7.5	7.5	6.7	-3.1
TP10-L4- CF_3 -L-Bpg	5.5	-2.7	5.6	-2.6	5.5	-2.8
TP10-L5- CF_3 -L-Bpg	4.5	-2.1	4.9	-2.4	4.4	-2.3
TP10-I8- CF_3 -L-Bpg	7.8	-3.7	7.9	-4.1	7.8	-4.0
TP10-L10- CF_3 -L-Bpg	0.6	-0.2	0.9	-0.4	0.9	-0.4
TP10-L13- CF_3 -L-Bpg	7.5	7.5	7.6	-3.6	7.6	-3.3
TP10-L16- CF_3 -L-Bpg	7.5	7.5	3.3	-1.6	3.4	-1.4
TP10-I20- CF_3 -L-Bpg	6.7	-2.9	7.3	-3.4	7.2	-3.2
TP10-L21- CF_3 -L-Bpg	1.9	-1.0	2.0	-1.1	1.8	-0.9

Tabelle 4.11: Dipolare Kopplungen bei 0°- und 90°-Orientierung der Probe bezüglich des externen Magnetfelds der *D*-Epimere bei P/L=1:50, 1:200 und 1:400. Die Pulverspektren weisen bei 0°- und 90°-Orientierung eine dipolare Kopplung von 7,5 kHz auf und sind farblich hervorgehoben.

Peptid	Dipolare Kopplung					
	P/L=1:50		P/L=1:200		P/L=1:400	
	0° [kHz]	90° [kHz]	0° [kHz]	90° [kHz]	0° [kHz]	90° [kHz]
TP10-G2-CF ₃ - <i>D</i> -Bpg	5.3	-2.4	6.0	-2.3	5.4	-2.9
TP10-L4-CF ₃ - <i>D</i> -Bpg	9.2	-4.1	9.3	-4.0	9.4	-4.1
TP10-L5-CF ₃ - <i>D</i> -Bpg	6.1	-2.7	6.7	-3.2	6.7	-3.1
TP10-I8-CF ₃ - <i>D</i> -Bpg	6.4	-3.0	6.4	-3.1	6.5	-3.7
TP10-L10-CF ₃ - <i>D</i> -Bpg	9.8	-4.3	9.8	-4.9	10.0	-4.7
TP10-L13-CF ₃ - <i>D</i> -Bpg	7.5	7.5	6.0	-3.0	6.1	-2.8
TP10-L16-CF ₃ - <i>D</i> -Bpg	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
TP10-I20-CF ₃ - <i>D</i> -Bpg	7.5	7.5	8.3	-3.9	8.3	3.7
TP10-L21-CF ₃ - <i>D</i> -Bpg	7.5	7.5	5.1	-2.7	5.6	-2.5

4.7.2.2 Strukturanalyse der CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga

Die Strukturanalyse der nicht aggregierenden *L*-Epimere (Daten der NMR-Experimente bei P/L=1:200 und 1:400) wurde, wie in Kapitel 3.2.12 beschrieben, durch Anpassen an eine starre Helix über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt (statisches Modell). Obwohl TP10-G2-CF₃-*L*-Bpg ein atypisches Verhalten, sowohl in den CD- als auch in den NMR-Experimenten zeigte, wurden die Daten dieses Analogons in die Strukturanalyse einbezogen, da in den Experimenten bezüglich der Zellaufnahme und in den MHK-Tests dessen biologische Aktivität eindeutig nachgewiesen werden konnte. Dabei resultierte die Kalkulation unter Einbeziehen der experimentell bestimmten dipolaren Kopplungen aller neun CF₃-*L*-Bpg markierten TP10-Analoga, und damit der Versuch das gesamte Peptid an eine starre Helix anzupassen, in einem großen Fehler (RMSD=4,6 kHz) (Abbildung 4.35). Das Peptid kann somit keine langgestreckte durchgängige helikale Struktur besitzen, sondern die Helix muss in irgendeiner Form unterbrochen sein und das Peptid folglich verschiedene Teilstücke aufweisen.

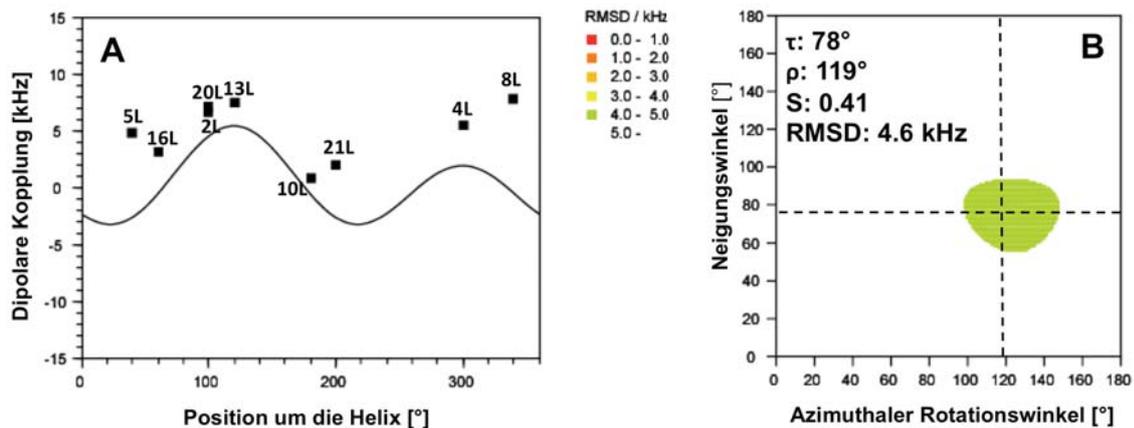
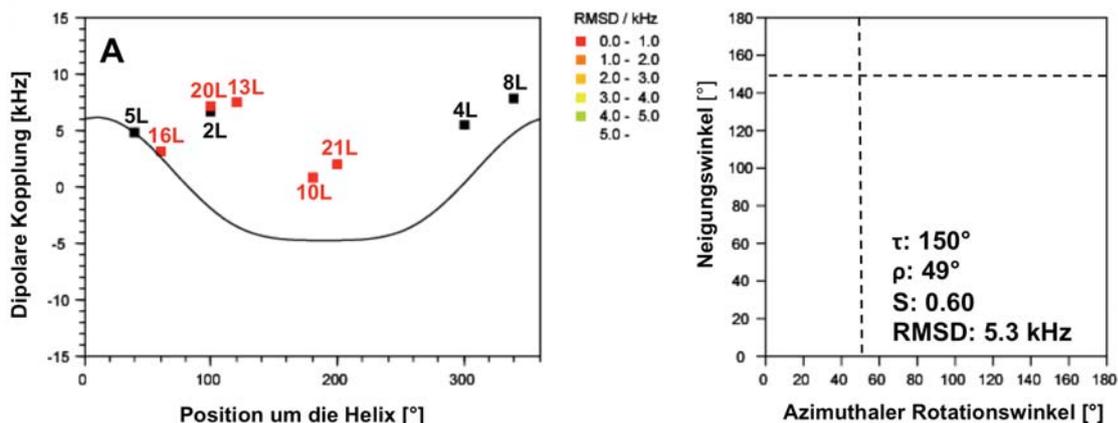
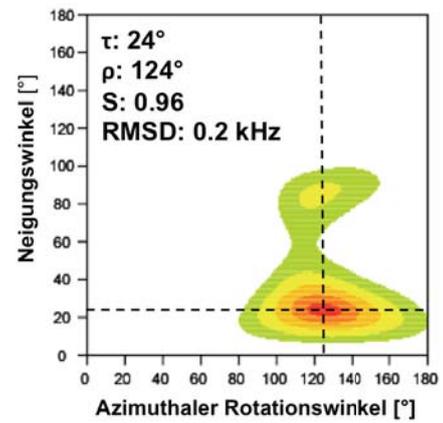
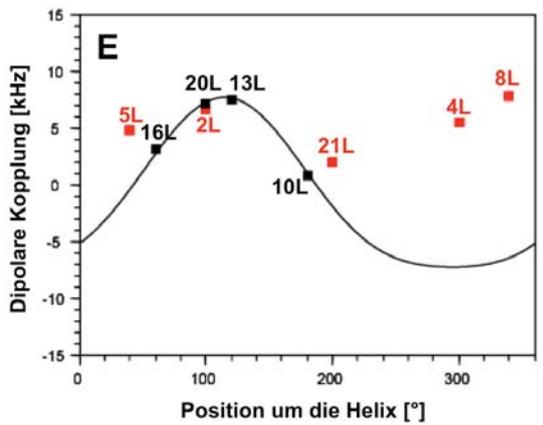
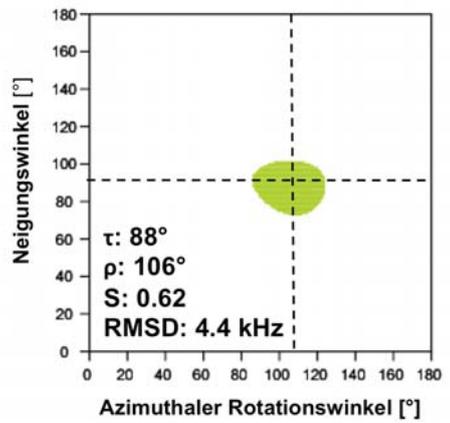
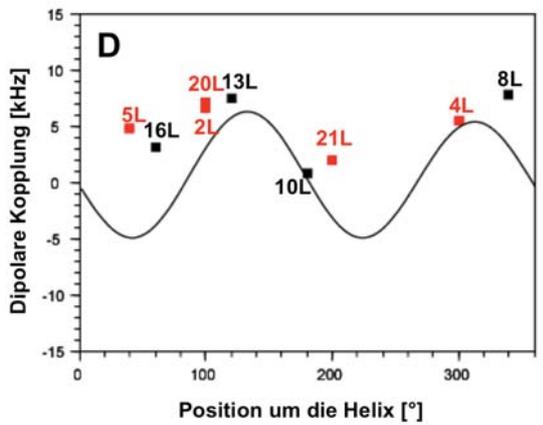
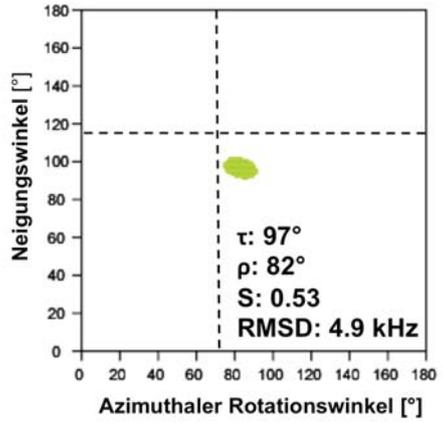
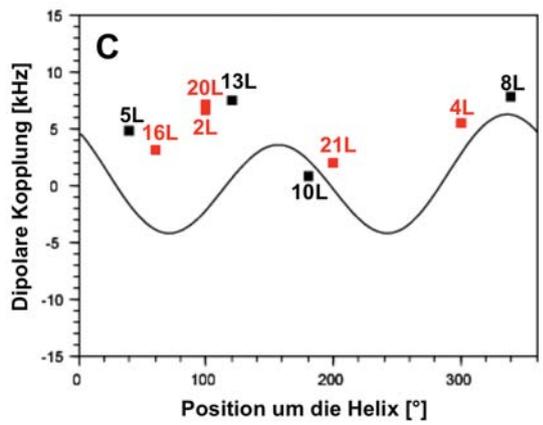
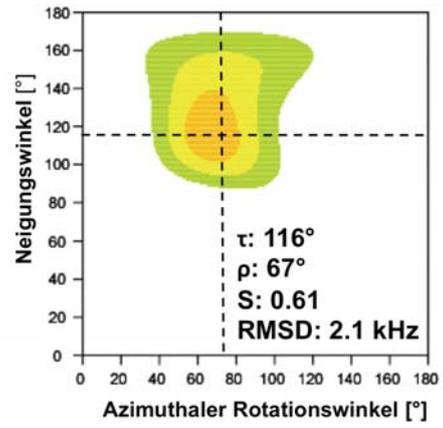
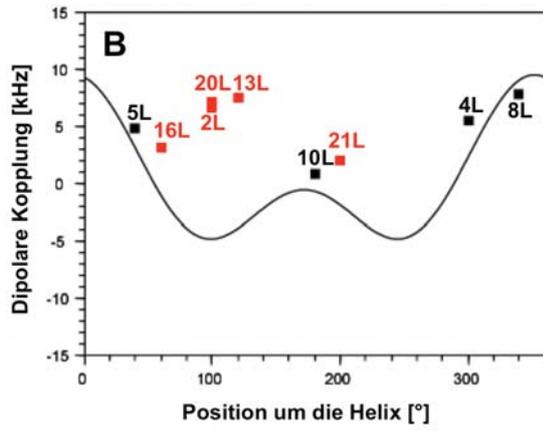


Abbildung 4.35: Strukturanalyse des gesamten Peptids aus den experimentell ermittelten dipolaren Kopplungen aller neun TP10-Analoga. (A) ‚Helical-Wave‘-Funktion und (B) τ/ρ -Diagramm nach dem statischen Modell für P/L=1:200.

Unter der Annahme, dass die Struktur von TP10 einer gekrümmten oder gewinkelten Helix entspricht, wurde eine statische Strukturanalyse der experimentell bestimmten Daten von TP10-Analoga, die an jeweils vier aufeinanderfolgenden Positionen mit CF_3 -Bpg markiert sind (2-4-5-8, 4-5-8-10, 5-8-10-13, 8-10-13-16, 10-13-16-20, 13-16-20-21), durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Berechnungen zeigen die Abbildungen 4.36 A bis F. Die Strukturanalyse nach dem statischen Modell ergab dabei für den N-terminalen und mittleren Teil des Peptids sehr große RMSD-Werte. Beispielsweise resultierte die Kalkulation der TP10-Analoga mit einer Markierung an Position 2-4-5-8 in einem RMSD von 5,3 kHz (Abbildung 4.36 A), die der Position 5-8-10-13 bei 4,9 kHz (Abbildung 4.36 C) und die der Position 8-10-13-16 bei 4,4 kHz (Abbildung 4.36 D). Lediglich die Strukturberechnung der Analoga mit der NMR-Sonde an Position 4-5-8-10 lieferte einen RMSD von 2,1 kHz (Abbildung 4.36 B), welcher für ein verlässliches Ergebnis aber dennoch zu groß ist.





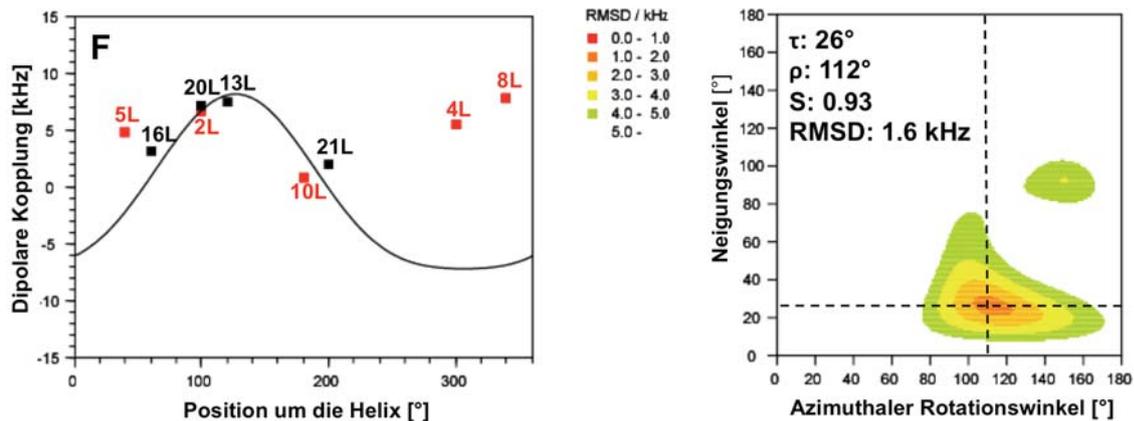


Abbildung 4.36: Strukturanalyse nach dem statischen Modell aus den Daten von jeweils vier TP10-Analoga mit einer Markierung an aufeinanderfolgenden Positionen. ‚Helical-Wave‘-Funktion und τ/ρ -Diagramm der Analoga mit einer CF₃-Bpg-Markierung an (A) Position 2-4-5-8, (B) 4-5-8-10, (C) 5-8-10-13, (D) 8-10-13-16, (E) 10-13-16-20 und (F) 13-16-20-21 für P/L=1:200. Die TP10-Analoga, die nicht in die Strukturrechnung einbezogen wurden, sind farblich hervorgehoben.

Die Orientierungsparameter können folglich für diese Teilstücke des Peptids nicht eindeutig bestimmt werden. Für den C-terminalen Teil ergab die statische Analyse deutlich kleinere RMSD-Werte. Werden die Analoga mit einer Markierung an Position 10-13-16-20 (Abbildung 4.36 E) in die Kalkulation einbezogen, ergibt sich für den Neigungswinkel $\tau=24^\circ$ und den azimuthalen Rotationswinkel $\rho=124^\circ$ mit einem RMSD von 0,1 kHz und für Position 13-16-20-21 (Abbildung 4.36 F) $\tau=26^\circ$ und $\rho=112^\circ$ mit einem RMSD-Wert von 1,6 kHz. Die Orientierungsparameter können somit für den C-terminalen Teil eindeutig bestimmt werden.

Die Struktur des Ursprungspeptids TP in SDS-Mizellen²⁹ und Phospholipidbizellen³⁰ wurde mittels NMR-Spektroskopie in Lösung bestimmt. Dabei zeigte sich ebenfalls eine gewinkelte Struktur, wobei die Grenze zwischen beiden Teilstücken Asn15 (Asn9 in TP10) darstellt. Laut Bárány-Wallje et al.³⁰ weist TP in Bizellen eine parallele Ausrichtung zur Membranoberfläche auf.

Die Ergebnisse der statischen Strukturberechnung von TP10 stehen in Analogie zu diesen Ergebnissen. Während der N-terminale Teil des Peptids (2-4-5-8 und 4-5-8-10) eine flexible Struktur aufweist, dessen Orientierungsparameter nicht bestimmt werden können, bildet der C-terminale Teil (10-13-16-20 und 13-16-20-21) eine helikale Struktur aus, dessen Parameter berechnet werden können. Darüber hinaus resultierte die Kalkulation für die mittleren Teilstücke (5-8-10-13 und 8-10-13-16) in

einem großen Fehler, da innerhalb dieses Abschnitts der Knick lokalisiert ist. Damit befindet sich auch in TP10 die Grenze beider Teilstücke bei Asn9, da die Analysen ab Leu10 Ergebnisse mit kleinen RMSD-Werten lieferten. Lediglich der nach dem statischen Modell berechnete Neigungswinkel im Bereich von 25° , welcher einen stark geneigten Zustand des Peptids repräsentiert, weicht deutlich von dem bislang angenommenen Strukturmodell des Ursprungspeptids TP ab. Desweiteren würde bei dem dazugehörigen Rotationswinkel im Bereich von 120° ein geladener Lys-Rest innerhalb der hydrophoben Membran zum liegen kommen, was nicht den biophysikalischen Erwartungen entspricht.

Kleine Peptide sind durch eine gewisse Mobilität gekennzeichnet. Folglich können die Orientierungsparameter mit dem stark vereinfachten statischen Modell nicht ausreichend beschrieben werden. Um der Dynamik des gesamten Systems Rechnung zu tragen, wurden die Strukturberechnungen zusätzlich auf Grundlage einer Gaussverteilung für den Neigungswinkel τ und den azimuthalen Rotationswinkel ρ durchgeführt (dynamisches Modell). Die Analyse der dipolaren Kopplungen der Analoga mit einer Markierung im C-terminalen Teil nach Asn9, d.h. von TP10-L10-, -L13-, -L16-, -L20- und -L21-CF₃-L-Bpg, ergab einen Neigungswinkel $\tau=58^\circ$ und einen azimuthalen Rotationswinkel $\rho=119^\circ$ mit einem RMSD=1,2 kHz (Abbildung 4.37). Dies entspricht einem oberflächengebundenem Zustand des Peptids, bei dem die geladenen Reste zur wässrigen Phase orientiert sind, während die hydrophoben Reste ins Innere der Membran weisen.

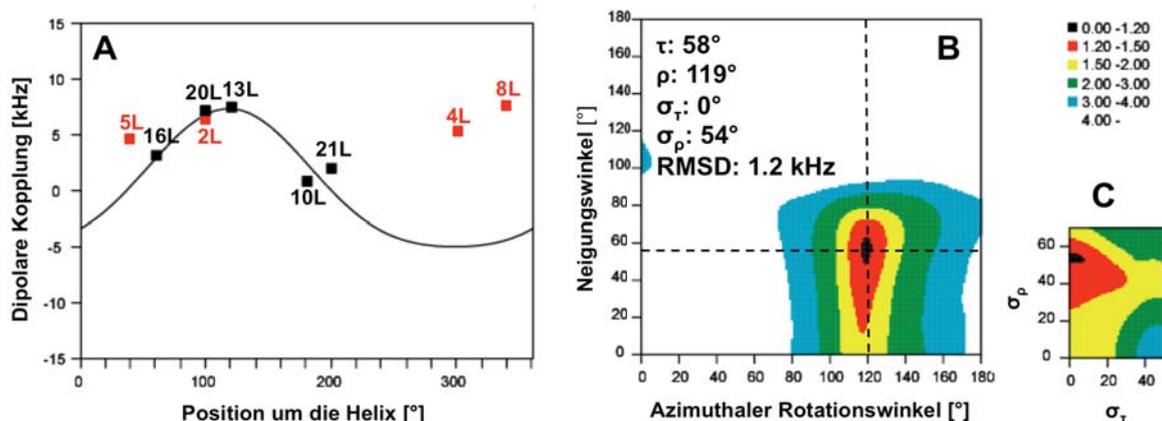


Abbildung 4.37: Strukturanalyse basierend auf dem dynamischen Modell des C-terminalen Teils aus den Daten von fünf TP10-Analoga mit einer Markierung an Position 10-13-16-20-21. (A) ‚Helical-Wave‘-Funktion, (B) τ/ρ -Diagramm und (C) σ_τ/σ_ρ -Diagramm für P/L=1:200. Die TP10-Analoga, die nicht in die Strukturrechnung einbezogen wurden, sind farblich hervorgehoben.

Eine Strukturanalyse von vier C-terminal markierten TP10-Analoga nach dem dynamischen Modell lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Beispielsweise ergab die Analyse von TP10-L10-, -L13-, -L16-, und -L20-CF₃-L-Bpg einen großen Bereich und damit viele mögliche Werte für den Neigungswinkel τ mit einem RMSD kleiner als 0,1 kHz. In Abbildung 4.38 A1 und A2 sind zwei ‚Helical-Wave‘-Funktionen für zwei mögliche Orientierungen mit einem Neigungswinkel $\tau=69^\circ$ (Abbildung 4.38 A1) und $\tau=13^\circ$ (Abbildung 4.38 A2) gezeigt, die einen ähnlich kleinen RMSD besitzen. Der azimuthale Rotationswinkel ist dagegen eindeutig definiert und liegt, ähnlich dem Ergebnis der Strukturberechnung basierend auf dem statischen Modell, bei 125° . Um ein verlässlicheres Ergebnis erhalten zu können, wäre die Berücksichtigung weiterer dipolarer Kopplungen notwendig, da die Analyse vier Parameter (τ , ρ , σ_τ , σ_ρ) berechnet und damit mindestens fünf Datenpunkte benötigt, um ein statistisch gesichertes Ergebnis zu erhalten.

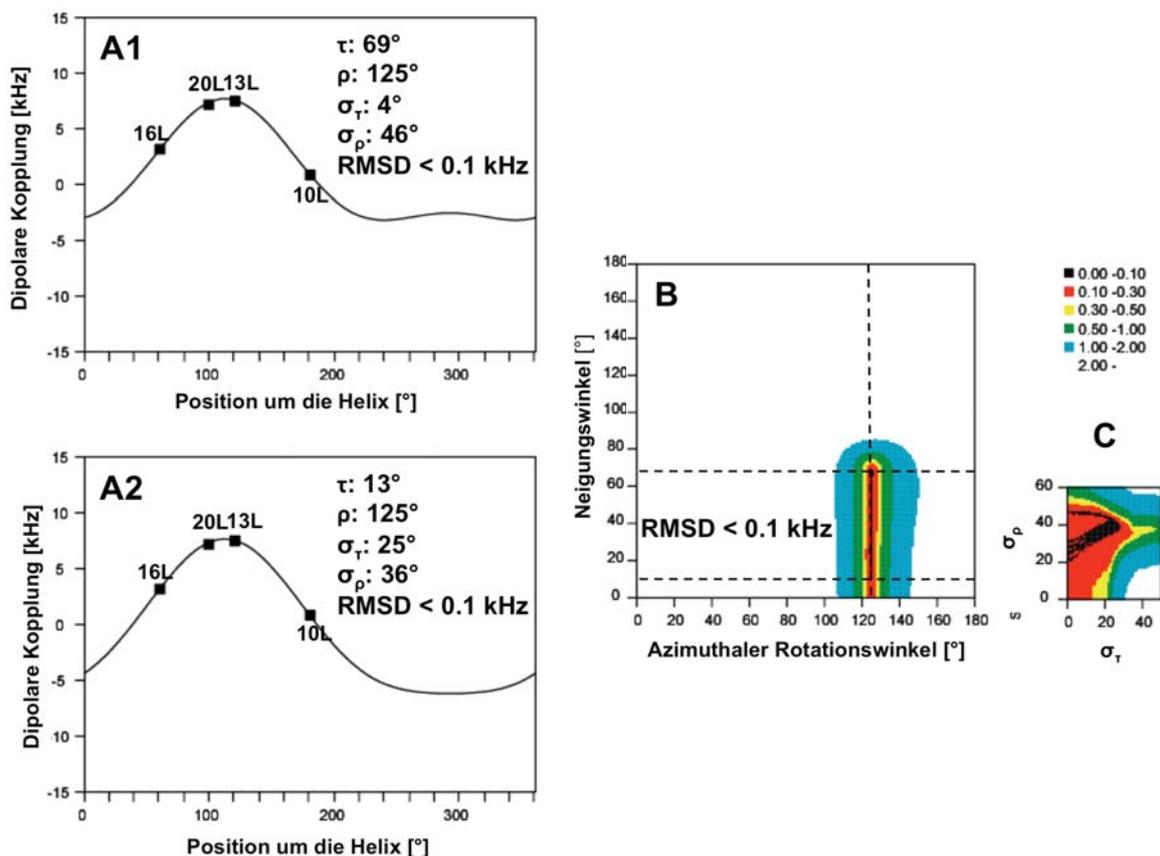


Abbildung 4.38: Dynamische Strukturanalyse aus den Daten von vier L-Epimeren, die die Markierung an Position 10-13-16-20 tragen. (A1 und A2) ‚Helical-Wave‘-Funktionen mit einem RMSD kleiner als 0,1 kHz, (B) τ/ρ -Diagramm und (C) σ_τ/σ_ρ -Diagramm für P/L=1:200.

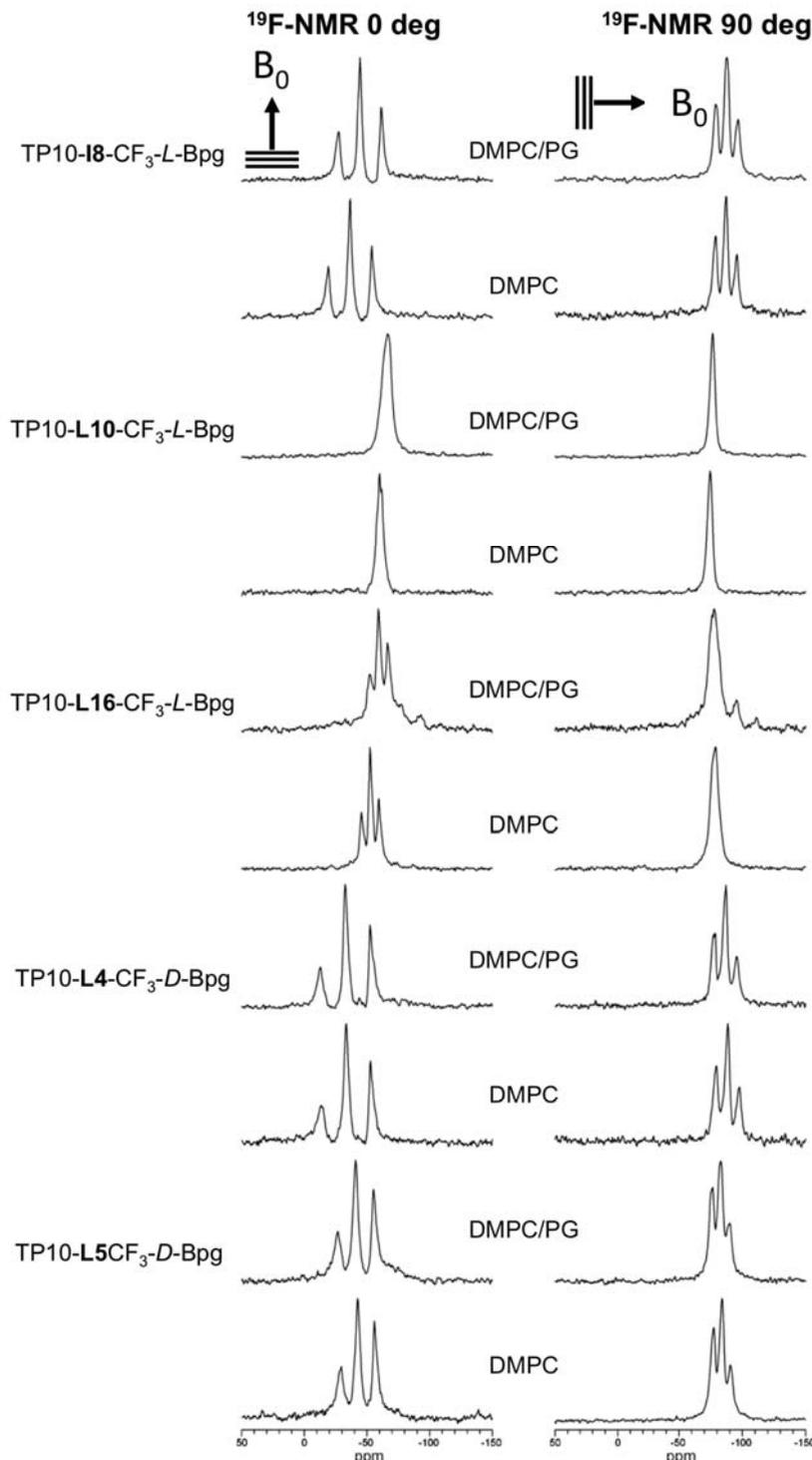
Die Ergebnisse für den Neigungs- und Rotationswinkel, welche mithilfe der beiden Modelle (statisch und dynamisch) und unter Einbeziehen der verschiedenen TP10-Analoga berechnet wurden, sind in Tabelle 4.12 zusammengefasst. Der C-terminale Mastoparanteil bildet eine helikale Struktur aus, dessen Orientierungsparameter mithilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate basierend auf dem Modell einer starren Helix, bestimmt werden können, während der N-terminale Galaninteil strukturell flexibler und eine eindeutige Bestimmung der Orientierungsparameter damit nicht möglich ist. Die Kalkulationen, die nur Daten der Analoga mit einer Markierung im C-terminalen Teil umfassten, ergaben sowohl basierend auf dem statischen, als auch dem dynamischen Modell, durchgängig kleinere RMSD-Werte als eine Analyse des N-terminalen Teils. Die Analyse des 4-Positionen-Fensters bestätigte dabei, dass sich der Knick an Position Ans9 befinden muss. Allerdings weichen die Ergebnisse beider Modelle für den Neigungswinkel deutlich voneinander ab. Während die Berechnung auf Grundlage des statischen Modells in einem stark geneigten Zustand des Mastoparanteils resultiert, repräsentiert der Neigungswinkel nach dem dynamischen Modell eher einen oberflächengebundenen Zustand. Der nach beiden Methoden berechnete Rotationswinkel liegt jedoch im selben Wertebereich.

Tabelle 4.12: Übersicht der Orientierungsparameter τ und ρ mit dem entsprechenden RMSD nach dem statischen und dynamischen Modell. Die dipolaren Aufspaltungen, die in die Berechnung einbezogen wurden, sind jeweils durch die Position der Markierung gekennzeichnet.

TP10-Analoga	Modell	τ [°]	ρ [°]	RMSD [kHz]
2-4-5-8-10-13-16-20-21	statisch	78	119	4,6
2-4-5-8	statisch	150	49	5,3
4-5-8-10	statisch	116	67	2,1
5-8-10-13	statisch	97	82	4,9
8-10-13-16	statisch	88	106	4,4
10-13-16-20	statisch	24	124	0,2
13-16-20-21	statisch	26	112	1,6
10-13-16-20-21	dynamisch	58	119	1,2

4.7.2.3 Einfluss der Lipidkomposition

Um den Einfluss der Lipide und vor allem deren Ladung auf die Orientierung von TP10 zu untersuchen, wurden von einigen *L*- und *D*-Epimeren Festkörper-NMR-Spektren jeweils in reinem DMPC (zwitterionisch) und in der DMPC/DMPG-Mischung (DMPG: negative Ladung) aufgenommen. In Abbildung 4.39 sind die ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der *L*-Epimere TP10-I8-, -L10- und -L16- CF_3 -*L*-Bpg und der *D*-



Epimere TP10-L4- und -L5- CF_3 -*D*-Bpg jeweils in der DMPC/DMPG-Mischung und in reinem DMPC mit P/L=1:200 gezeigt. Dabei ist kein Unterschied in der Größe der dipolaren Aufspaltung erkennbar. Die unterschiedliche Lipidkomposition hat somit keinen Einfluss auf die Orientierung von TP10.

Abbildung 4.39: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren von jeweils fünf CF_3 -Bpg markierten TP10-Analoga in der Lipidmischung aus DMPC/DMPG (3:1) (obere Zeile) und in reinem DMPC (untere Zeile) bei P/L=1:200. Die Spektren wurden bei 313 K (40°C) aufgenommen.

4.7.2.4 ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der CF- und CF_3 -Bpg markierten TP10-Analoga

Der Einfluss der Carboxyfluorescein-Markierung auf die Orientierung von TP10 wurde mittels NMR-Experimenten der CF-markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG untersucht, die unter den gleichen Bedingungen wie die Experimente der TP10-Analoga ohne CF-Markierung durchgeführt wurden. In den Abbildungen 4.40 und 4.41 sind die ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der CF-markierten und CF_3 -Bpg markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG bei P/L=1:200 gezeigt. Hierbei fällt auf, dass vorwiegend die Epimere, die die ^{19}F -markierte Aminosäure im N-terminalen Teil tragen, schlecht aufgelöste Spektren aufweisen. Dabei handelt es sich nicht um reine Pulverspektren. Wahrscheinlich liegt das Peptid in zwei oder mehreren definierten Orientierungen vor, die aber von denen der TP10-Analoga ohne CF-Markierung abweichen.

Beispielsweise weichen die Spektren der CF-markierten *L*-Epimere TP10-G2-, -L4- und -L5- CF_3 -*L*-Bpg deutlich von denen ohne CF-Markierung ab. Darüber hinaus lässt sich aus diesen Spektren die dipolare Kopplung nicht eindeutig ableiten. Auch die dipolaren Kopplungen von TP10-I8- CF_3 -*L*-Bpg-CF und dem Analogon ohne CF-Markierung weichen etwas voneinander ab (Abbildung 4.40 und Tabelle 4.13). Die restlichen Analoga weisen dagegen große Übereinstimmungen der Spektren und damit der dipolaren Kopplungen auf.

Auch die Spektren der CF-markierten *D*-Epimere, die die ^{19}F -markierte Aminosäure im N-terminalen Teil tragen, weichen von denen der *D*-Epimere ohne CF-Markierung ab, wobei hier nur die Spektren von TP10-G2- CF_3 -*D*-Bpg mit und ohne CF-Markierung gravierende Unterschiede zeigen. Bei allen anderen *D*-Epimeren stimmen die dipolaren Kopplungen überein (Abbildung 4.41 und Tabelle 4.14). Desweiteren zeigt das Spektrum von TP10-L16- CF_3 -*D*-Bpg-CF keine Pulveranteile im Gegensatz zu dem Analogon ohne CF-Markierung. Die CF-Markierung, die N-terminal gebunden ist, scheint somit einer Immobilisierung entgegen zu wirken, beeinflusst aber im Gegenzug die N-terminal gelegenen Aminosäuren, da hier keine gut aufgelösten Spektren erhalten werden konnten.

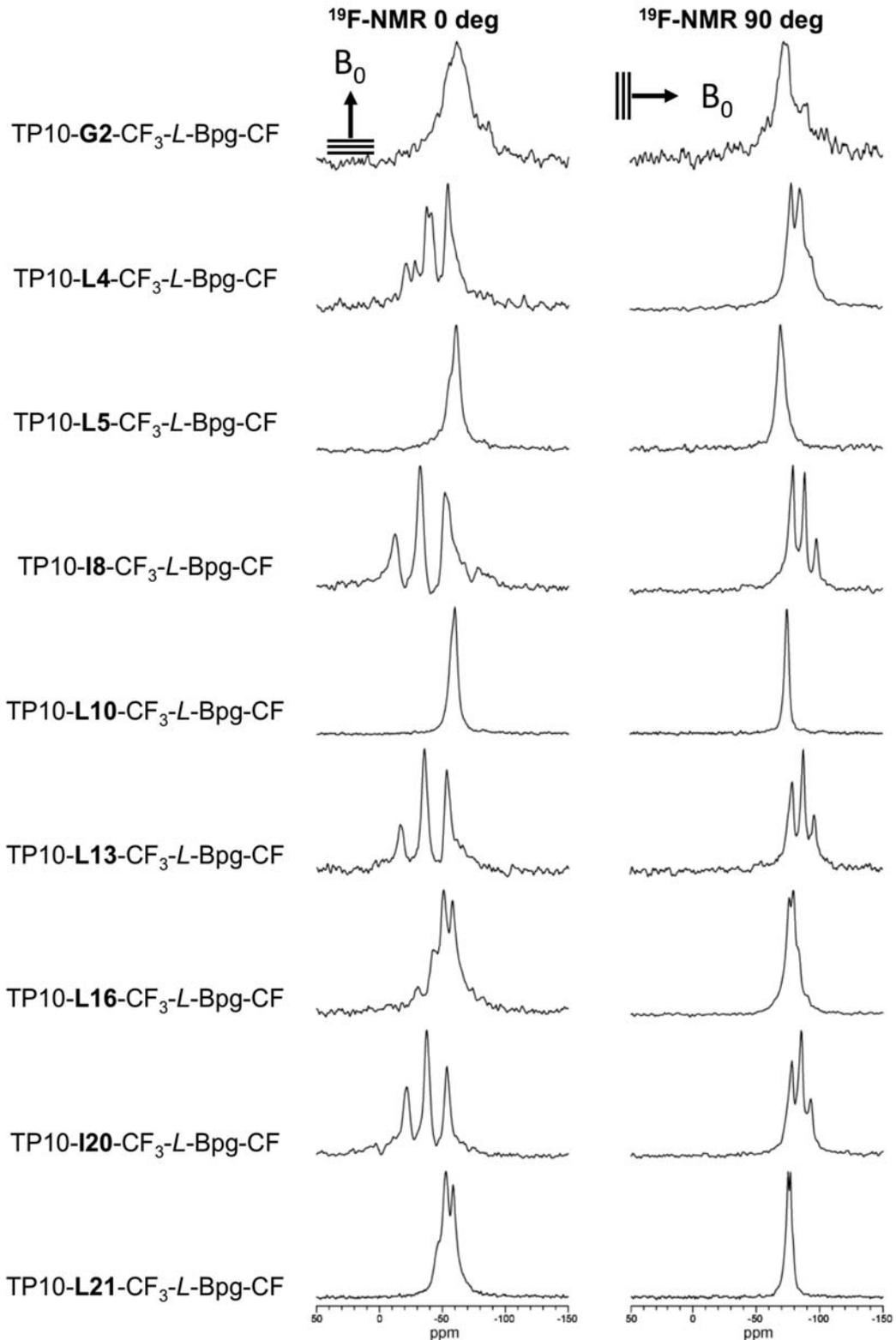


Abbildung 4.40: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der CF-markierten *L*-Epimere in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:200. Für jedes CF-markierte TP10-Analogon ist jeweils das Spektrum bei 0°- und 90°-Orientierung der Probe (Membrannormale) relativ zum externen Magnetfeld B_0 gezeigt. Die Spektren wurden bei 313 K (40°C) aufgenommen.

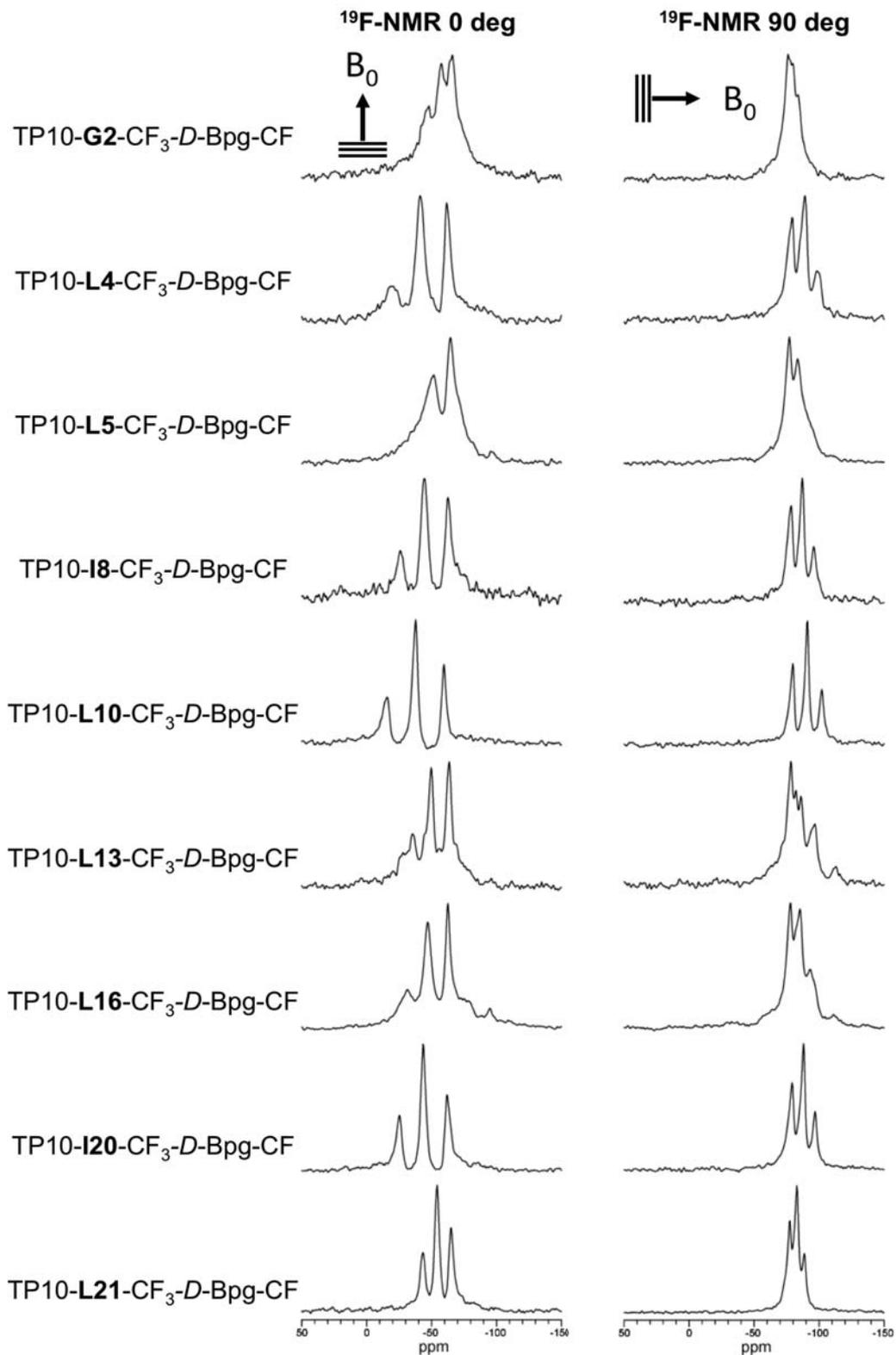


Abbildung 4.41: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der CF-markierten *D*-Epimere in DMPC/DMPG (3:1) mit P/L=1:200. Für jedes CF-markierte TP10-Analogon ist jeweils das Spektrum bei 0° - und 90° -Orientierung der Probe (Membrannormale) relativ zum externen Magnetfeld B_0 gezeigt. Die Spektren wurden bei 313 K (40°C) aufgenommen.

Tabelle 4.13: L-Epimere: Vergleich der dipolaren Kopplungen der CF-markierten TP10-Analoga und derjenigen ohne CF-Markierung bei P/L=1:200.

Peptid	Dipolare Kopplung			
	Ohne CF-Markierung		CF-Markierung	
	0° [kHz]	0° [kHz]	0° [kHz]	90° [kHz]
TP10-G2-CF ₃ -L-Bpg	7.5	7.5	-	-
TP10-L4-CF ₃ -L-Bpg	5.6	-2.6	-	-
TP10-L5-CF ₃ -L-Bpg	4.9	-2.4	1.1	0.7
TP10-I8-CF ₃ -L-Bpg	7.9	-4.1	9.3	-4.3
TP10-L10-CF ₃ -L-Bpg	0.9	-0.4	0.9	-0.4
TP10-L13-CF ₃ -L-Bpg	7.6	-3.6	8.3	-4.0
TP10-L16-CF ₃ -L-Bpg	3.3	-1.6	3.3	-1.6
TP10-I20-CF ₃ -L-Bpg	7.3	-3.4	7.6	-3.5
TP10-L21-CF ₃ -L-Bpg	2.0	-1.1	2.7	-0.9

Tabelle 4.14: D-Epimere: Vergleich der dipolaren Kopplungen der CF-markierten TP10-Analoga und derjenigen ohne CF-Markierung bei P/L=1:200.

Peptid	Dipolare Kopplung			
	Ohne CF-Markierung		CF-Markierung	
	0° [kHz]	0° [kHz]	0° [kHz]	90° [kHz]
TP10-G2-CF ₃ -D-Bpg	6.0	-2.3	-	-
TP10-L4-CF ₃ -D-Bpg	9.3	-4.0	9.6	-4.6
TP10-L5-CF ₃ -D-Bpg	6.7	-3.2	6.2	-3.0
TP10-I8-CF ₃ -D-Bpg	6.4	-3.1	8.5	-4.1
TP10-L10-CF ₃ -D-Bpg	9.8	-4.9	10.2	-5.2
TP10-L13-CF ₃ -D-Bpg	6.0	-3.0	6.5	-3.4
TP10-L16-CF ₃ -D-Bpg	7.5	7.5	7.4	-3.5
TP10-I20-CF ₃ -D-Bpg	8.3	-3.9	8.6	-4.2
TP10-L21-CF ₃ -D-Bpg	5.1	-2.7	5.1	-2.6

5. Diskussion

5.1 Synthese der ¹⁹F-markierten TP10-Analoga

Die für die ¹⁹F-Festkörper-NMR-Spektroskopie notwendige Sonde CF₃-Bpg konnte erfolgreich und enantiomerenrein mittels Peptidsynthese an der festen Phase in die Sequenz von TP10 inkorporiert werden. Eine unter Umständen aufwendige Trennung der Epimere entfiel. Die erzielten Ausbeuten lagen bei 20 bis 30% (siehe Anhang Kapitel 9.6) und damit in einem für markierte Peptide akzeptablen Bereich. Die *D*-Epimere wiesen tendenziell kleinere Retentionszeiten als die entsprechenden *L*-Epimere auf, eine Tatsache, die bei der Aufreinigung von racemischen Mischungen einen ersten Hinweis für die Identifikation der einzelnen Epimere geben könnte. Eine Ausnahme stellt TP10-L4-CF₃-*L*-Bpg dar, dessen Retentionszeit kleiner als die des entsprechenden *D*-Epimers ist.

Auch die Darstellung der N-terminal Carboxyfluorescein-markierten TP10- und TP-Analoga erfolgte mittels Standardmethoden und in akzeptablen Ausbeuten. Somit wurden insgesamt über 40 Peptide erfolgreich synthetisiert und aufgereinigt.

5.2 Einfluss der ¹⁹F-markierten Aminosäure auf Aktivität und Struktur

Um mithilfe der ¹⁹F-Festkörper-NMR-basierten Strukturanalyse aussagekräftige Ergebnisse über die Orientierung und Struktur des zu untersuchenden Peptids in Membranen erhalten zu können, muss gewährleistet sein, dass dessen biologische und strukturelle Eigenschaften durch die NMR-Sonde nicht grundlegend verändert werden.

In Zellaufnahme-Experimenten der CF-markierten *L*-Epimere konnte nachgewiesen werden, dass die zellpenetrierenden Eigenschaften der markierten Peptide erhalten bleiben (siehe Kapitel 4.3). Zwei TP10-Analoga, TP10-G2- und -L4-CF₃-*L*-Bpg zeigten sogar eine gesteigerte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Hier scheint die ¹⁹F-markierte Aminosäure folglich die Aufnahme der Peptide in die Zelle zu begünstigen.

Die CD-Spektren zeigen eindeutig, dass die NMR-Sonde die Sekundärstruktur des nativen Peptids nicht grundlegend verändert (siehe Kapitel 4.2). Die Analoga mit und

ohne CF-Markierung wurden unter den gleichen Bedingungen wie der Wildtyp vermessen und wiesen keine wesentlichen Unterschiede in der Lage der Banden und deren Intensität auf. Die Änderung der Sekundärstruktur von einer weitestgehend ungeordneten Struktur (Zufallsknäuel) in wässriger Lösung in eine vorwiegend α -helikale Struktur in Lipidvesikeln bestätigt, dass eine Bindung des Peptids an die Lipide stattfindet. Nur das Analogon TP10-G2-CF₃-L-Bpg zeigte, zumindest in wässriger Lösung, ein vom Wildtyp abweichendes Verhalten (siehe Kapitel 4.2.1.1). Eine Ursache hierfür ist höchstwahrscheinlich die Substitution einer kleinen Aminosäure, wie Gly, durch die sterisch anspruchsvolle ¹⁹F-markierte Aminosäure CF₃-Bpg, die die strukturellen Eigenschaften leicht verändert. Darüber hinaus muss auch die Konfiguration der Aminosäure einen gewissen Einfluss ausüben, da das entsprechende *D*-Epimer kein atypisches Verhalten zeigt.

Wie die Zellaufnahme-Experimente eindeutig beweisen, hat die Substitution von Gly in TP10-G2-CF₃-L-Bpg keine wesentlichen Auswirkungen auf die zellpenetrierenden Eigenschaften. Die biologische Aktivität wird durch CF₃-Bpg sogar gesteigert. Eine Ursache hierfür könnte wiederum die im Vergleich zu Gly deutlich größere Hydrophobizität der ¹⁹F-markierten Aminosäure sein.

Desweiteren wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) des Wildtyps und der CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga gegen Gram-positive (*S. aureus*) und Gram-negative (*E. coli*) Bakterienkulturen bestimmt. Die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität zeigte keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des Wildtyps und der TP10-Analoga, da alle experimentell bestimmten MHK's, sowohl bei den Gram-positiven als auch den Gram-negativen Bakterien, im Bereich eines Verdünnungsschrittes lagen (siehe Kapitel 4.4). Die antimikrobielle Aktivität ist eher gering einzustufen, da die MHK's im Bereich von 32 bis 256 $\mu\text{g/ml}$ liegen. Im Vergleich zu den verwendeten Peptidkonzentrationen der Zellaufnahmetests liegen die MHK's in einem ähnlichen Bereich, zumindest bei 10 μM (entspricht 26 $\mu\text{g/ml}$). Die zusätzlich in den Fluoreszenzexperimenten getestete Peptidkonzentration von 2 μM (entspricht 5 $\mu\text{g/ml}$), liegt jedoch deutlich unter den MHK's. Dieses Ergebnis, welches im Einklang mit literaturbekannten Daten (vergleiche Nekhotiaeva et al.³⁸ und Saar et al.³⁹) steht, ist dennoch erstaunlich, da zellpenetrierende Peptide eukaryotische Zellmembranen überqueren können, ohne deren Integrität zu beeinflussen, im Gegenzug aber Auswirkungen auf prokaryotische Zellmembranen zeigen, auch wenn diese in den getesteten Bakterien gering erscheinen.

Bei der Untersuchung der Sekundärstruktur und den funktionellen Tests konnten damit keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem nativen Peptid und den CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga festgestellt werden. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die mögliche Verwendung der experimentell bestimmten NMR-Daten der TP10-Analoga für die Strukturanalyse.

5.3 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Struktur von TP10 wurden Festkörper-NMR-Spektren in orientierten Phospholipiddoppelschichten aufgenommen. Mittels ³¹P-Festkörper-NMR-Spektroskopie wurde die Orientierung der Lipiddoppelschichten überprüft, welche bei jeder Probe in ausreichendem Maß vorhanden war (siehe Kapitel 4.7.1). Folglich üben der Wildtyp und die TP10-Analoga in den gemessenen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Ausrichtung der Lipide aus. Anschließend konnten die dipolaren Kopplungen der Trifluormethylgruppe aller TP10-Analoga, zumindest in geringen Peptidkonzentrationen und dementsprechenden P/L's (P/L=1:400) bei denen keine Immobilisierung auftrat, mittels ¹⁹F-Festkörper-NMR-Spektroskopie ermittelt werden. Eine Halbierung der dipolaren Kopplung bei der 90°-Messung beweist dabei die Rotation des jeweiligen Peptids um die Membrannormale. Abbildung 5.1 zeigt die entsprechenden NMR-Spektren der *L*- und *D*-Epimere bei den gemessenen P/L's. Bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L=1:50) trat Immobilisierung (in der Abbildung 5.1 farblich hervorgehoben), vor allem bei den Analoga mit einer Markierung im C-terminalen Teil des Peptids auf (vergleiche Kapitel 5.5). Eine Sonderstellung nimmt hierbei das Analogon TP10-L16-CF₃-*D*-Bpg ein, dessen Spektrum sogar bei P/L=1:400 Pulveranteile aufweist und damit als das am stärksten aggregierende Analogon eingestuft werden kann. Eine weitere Ausnahme stellt TP10-G2-CF₃-*L*-Bpg dar. Während beim entsprechenden *D*-Epimer bereits bei P/L=1:50 ein gut aufgelöstes Triplett resultiert, zeigt das *L*-Epimer ein Pulverspektrum. Daher kann die Substitution von Gly durch das sterisch anspruchsvolle CF₃-Bpg nicht die einzige Ursache des atypischen Verhaltens sein, das sich bereits in der CD-Spektroskopie und in den Zellaufnahme-Experimenten zeigte. Möglicherweise spielen Hydrophobizität und Konfiguration ebenfalls eine Rolle. Darüber hinaus scheint die beobachtete Aggregation die zellpenetrierenden Eigenschaften positiv zu beeinflussen. Die gut aufgelösten Signale, die zumindest in

geringen Peptidkonzentrationen bei nahezu allen TP10-Analoga resultierten, bestätigen eine einheitliche und homogene Verteilung des Peptids in der Lipiddoppelschicht.

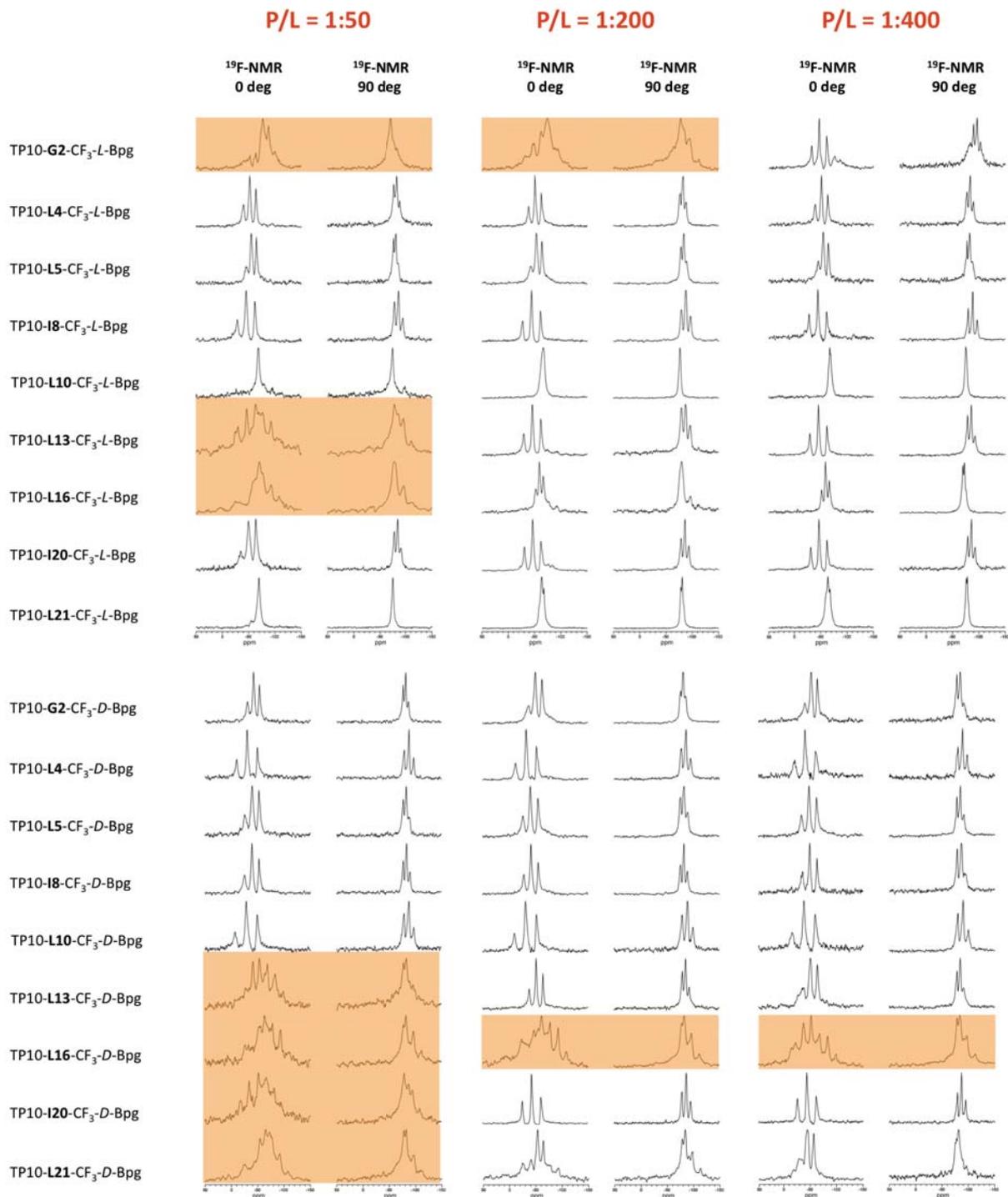


Abbildung 5.1: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der *L*- und *D*-Epimere in DMPC/DMPG (3:1) bei $\text{P/L}=1:50$ (linke Spalte), $\text{P/L}=1:200$ (mittlere Spalte) und $\text{P/L}=1:400$ (rechte Spalte). Für jedes TP10-Analoga ist jeweils das Spektrum bei 0° - und 90° -Orientierung der Probe (Membrannormale) relativ zum externen Magnetfeld B_0 gezeigt. Die Pulverspektren sind farblich hervorgehoben. Die Spektren wurden bei 313 K (40°C) aufgenommen.

Die Orientierung von TP10 ist, zumindest in den drei verschiedenen gemessenen P/L's (P/L=1:50, 1:200 und 1:400), nicht konzentrationsabhängig, da alle neun *L*- und *D*-Epimere jeweils ähnliche dipolare Kopplung ergaben (siehe Tabelle 4.10 und 4.11). Eine konzentrationsabhängige Umorientierung, wie beispielsweise bei PGLa⁶⁵ oder MSI-103⁶⁶ beobachtet, findet im Fall von TP10 damit nicht statt.

Weiterhin übt die Ladung der Lipidmischung keinen wesentlichen Einfluss auf die Orientierung aus, da kein Unterschied in den dipolaren Kopplungen der TP10-Analoga in reinem DMPC (zwitterionisch) im Vergleich zur DMPC/DMPG-Mischung (DMPG: negativ geladen) ermittelt werden konnte (siehe Kapitel 4.7.2.3). TP10 bindet damit sowohl an zwitterionische, als auch negativ geladene Lipide.

Der Einfluss der Fluoreszenzmarkierung, die auch als Cargo betrachtet werden kann, auf die Orientierung von TP10 in Biomembranen wurde ebenfalls durch Vermessen der CF-markierten TP10-Analoga, unter den gleichen Bedingungen wie die Analoga ohne Fluoreszenzmarkierung, untersucht (siehe Kapitel 4.7.2.4). Die Markierung übt zwar einen gewissen Einfluss auf die in der Nähe der Fluoreszenzmarkierung, also N-terminal befindlichen Aminosäuren aus, aber die dipolaren Kopplungen der Analoga mit einer ¹⁹F-Markierung im C-terminalen Teil des Peptids blieben weitestgehend unverändert. Durch die Fluoreszenzmarkierung wird die Orientierung von TP10 damit nicht wesentlich beeinflusst. Damit konnte erstmalig für TP10 gezeigt werden, dass die Cargo die Membranwechselwirkungen nicht beeinträchtigt oder grundlegend verändert. Darüber hinaus zeigt die Fluoreszenzmarkierung einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der TP10-Analoga. Die CF-markierten Peptide zeigten eine deutlich geringere Aggregationstendenz als die nicht fluoreszenzmarkierten TP10-Analoga (siehe Kapitel 4.5.2).

5.4 Strukturanalyse

Die Strukturanalyse wurde nur auf Grundlage der experimentell ermittelten NMR-Daten (dipolare Kopplungen) der *L*-Epimere durchgeführt, da die *L*-Form einer Aminosäure die physiologisch relevante Konfiguration darstellt.

Eine Strukturkalkulation nach dem statischen Modell basierend auf den dipolaren Kopplungen aller neun TP10-Analoga, in einer Konzentration bei der keine Aggregation auftrat (P/L=1:200 oder 1:400), und damit der Versuch das gesamte Peptid an eine durchgängige starre Helix anzupassen, lieferte große RMSD-Werte

und somit keine eindeutigen Ergebnisse. Das Peptid kann demnach keine durchgängige helikale Struktur aufweisen, sondern muss einen Knick innerhalb der Sequenz besitzen, der TP10 in verschiedene Teilstücke unterteilt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden, jeweils auf Grundlage des statischen Modells, die Daten der Analoga mit einer Markierung an jeweils vier aufeinanderfolgenden Positionen analysiert. Dieses ‚4-Positionen-Fenster‘ wurde vom N- zum C-Terminus verschoben. D.h. die erste Strukturberechnung umfasste die experimentellen Daten der Analoga mit einer Markierung an Position 2-4-5-8, die zweite Kalkulation 4-5-8-10, die dritte 5-8-10-13, die vierte 8-10-13-16, die fünfte 10-13-16-20 und die sechste 13-16-20-21. Nur bei Analysen des C-terminalen Mastoparanteilstücks konnten geringe RMSD-Werte erzielt werden, wobei die Strukturberechnung auf Grundlage der dipolaren Kopplungen von TP10-L10-, -L13-, -L16- und -I20-CF₃-L-Bpg den kleinsten RMSD (0,2 kHz) ergab. Der Neigungswinkel lag demnach bei 24° und der entsprechende azimuthale Rotationswinkel bei 124°. Dieser Neigungswinkel repräsentiert einen stark geneigten Zustands des Peptids, bei dem auch geladene Lys-Reste ins Innere der Membran weisen.

Laut der Struktur des Ursprungspeptids Transportan in Bizellen (vergleiche Bárány-Wallje et al.³⁰), die mittels NMR-Spektroskopie in Lösung ermittelt wurde, bildet der C-terminale Teil von TP eine wohldefinierte amphiphile Helix aus, wobei die hydrophoben Reste ins Innere der Membran weisen, während der N-terminale Teil eine größere strukturelle Flexibilität aufweist. Die Grenze beider Teilstücke stellt der Aminosäurerest Asn15 (Asn9 in TP10) dar.

Tabelle 5.1: Sequenzen von TP und TP10.

Peptid	Sequenz					
TP	1	5	10	15	20	25
	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂					
TP10		1	5	10	15	20
	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂					

Bei TP10 wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Die beiden Teilstücke aus denen das chimärische Peptid generiert wurde, weisen eine unterschiedlich stark ausgeprägte strukturelle Flexibilität auf. Während der N-terminale Galaninteil (Tabelle 5.1, rot gekennzeichnet) weniger strukturiert vorliegt und eine Strukturanalyse dieses Teilstücks keine akzeptablen Ergebnisse lieferte, bildet der C-terminale

Mastoparanteil (Tabelle 5.1, blau markiert) eine definierte α -helikale Struktur aus, deren Orientierungsparameter durch Anpassen an eine starre Helix über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate nach dem statischen und dynamischen Modell ermittelt werden konnten.

Für den N-terminalen Galaninteil (2-4-5-8 und 4-5-8-10) konnten keine eindeutige Orientierungsparameter bestimmt werden. Dieser Teil des Peptids weist, charakterisiert durch die großen RMSD-Werte, eine hohe Flexibilität auf (siehe Kapitel 4.7.2.2). Höchstwahrscheinlich wirkt die hydrophobe ^{19}F -markierte Aminosäure CF_3 -Bpg in diesem Teil des Peptids als eine Art Anker, d.h. die ^{19}F -markierte hydrophobe Aminosäure orientiert sich immer zur Membran hin (Abbildung 5.2), erkennbar an den dipolaren Kopplungen, die durchgängig im Bereich von 6 bis 7 kHz liegen (vergleiche KIGAKI⁶⁷ und Maximin 4⁶⁸).

Für den mittleren Abschnitt (5-8-10-13 und 8-10-13-16) konnten ebenfalls keine eindeutigen Orientierungsparameter bestimmt werden. Folglich muss sich innerhalb dieses Segments der Knick befinden. Damit wurde die Annahme bestätigt, dass sich in TP10, ähnlich wie in TP, der Knick an Position Asn9 befindet, denn die Strukturanalyse des C-terminalen Mastoparanteils (10-13-16-20 und 13-16-20-21) nach dem statischen Modell, basierend auf den experimentellen Daten der *L*-Epimere mit einer Markierung nach Asn9, d.h. unter Einbeziehen der dipolaren Kopplungen von TP10-L10-, -L13-, -L16- und -I20- CF_3 -*L*-Bpg, ergab einen relativ kleinen RMSD. Der berechnete Neigungswinkel weicht allerdings von dem bislang postulierten Strukturmodell, welches auf einer parallelen Ausrichtung des Ursprungspeptids basiert³⁰, ab, da das Peptid nach dieser Berechnung in einem stark geneigten Zustand vorliegen würde. Die Helix des Mastoparanteils umfasst nur drei Windungen, d.h. das Peptid besitzt keine langgestreckte ausgedehnte Struktur wie beispielsweise PGLa, sondern das Erscheinungsbild ist eher kugelförmig. Daher ist die Mobilität des Systems zu groß, um die Orientierungsparameter mit dem stark vereinfachten statischen Modell zu beschreiben und damit bestimmen zu können.

Die Dynamik des Systems wurde in die Strukturberechnungen durch eine Gaussverteilung für τ und ρ einbezogen (dynamisches Modell). Die Berechnung der Orientierung des C-terminalen Teilstücks aus den Daten der TP10-Analoga mit einer C-terminalen Markierung (10-13-16-20-21) ergab nach diesem Modell einen Neigungswinkel von 58° und einen azimuthalen Rotationswinkel, ähnlich dem statischen Modell, von 119° (siehe Kapitel 4.7.2.2). In Abbildung 5.2 ist das gesamte

Peptid mit dem flexiblen N-terminalen Galaninteil (Abbildung 5.2, grün markiert) und dem berechneten Neigungswinkel $\tau=58^\circ$ für den C-terminalen Mastoparanteil (Abbildung 5.2, rot markiert) in einer Lipiddoppelschicht schematisch dargestellt. Der Mastoparanteil weist einen nahezu oberflächengebundenen Zustand auf.

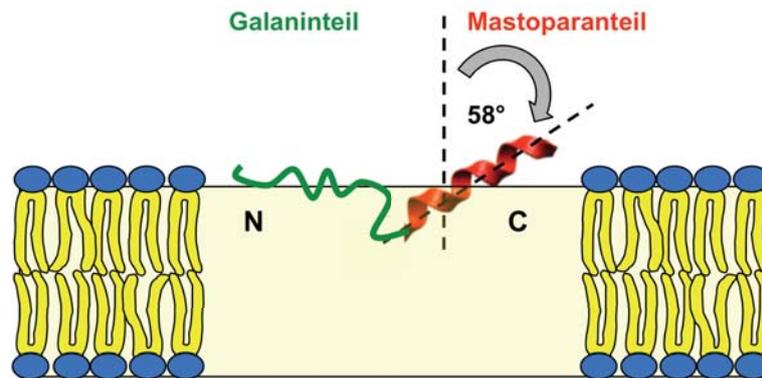


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung von TP10 in einer Lipiddoppelschicht mit dem flexiblen N-terminalen Galaninteil (grün markiert) und dem berechneten Neigungswinkel $\tau=58^\circ$ für den C-terminalen Mastoparanteil (rot markiert) auf Grundlage der dipolaren Kopplungen der fünf TP10-Analoga TP10-L10-, -L13-, -L16-, -I20- und -L21-CF₃-L-Bpg.

In Abbildung 5.3 ist die ‚Helical wheel‘-Projektion für TP10 in einer Membran mit der berechneten Orientierung, basierend auf dem dynamischen Modell, d.h. mit dem entsprechenden azimuthalen Rotationswinkel $\rho=119^\circ$, dargestellt.

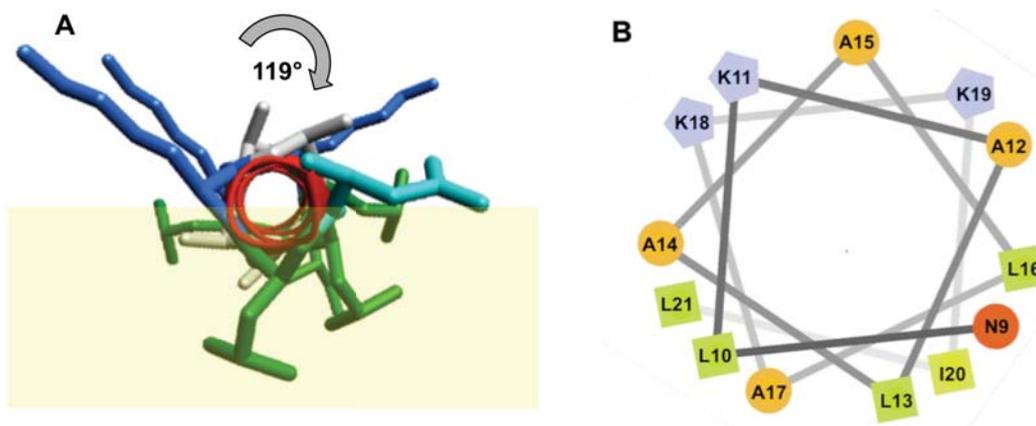


Abbildung 5.3: ‚Helical-Wheel‘-Projektion (A: 3D-Darstellung, B: schematische Darstellung⁶⁹) des C-terminalen Mastoparanteils mit dem berechneten azimuthalen Rotationswinkel $\rho=119^\circ$. Die hydrophoben Reste (grün) weisen ins Innere der Membran, während die geladenen Lys-Reste (blau) zur wässrigen Phase zeigen. Die Membran ist schematisch als gelbes Rechteck dargestellt.

Danach weisen, ähnlich der Orientierung von TP in Phospholipidbizellen³⁰, die hydrophoben Reste ins Innere der Membran, während die positiv geladenen Lys-Reste zur wässrigen Phase hin orientiert sind. Das Ergebnis für den azimuthalen Rotationswinkel steht somit ebenfalls im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Struktur des Ursprungspeptids TP in Bizellen³⁰.

Die Analyse nach dem dynamischen Modell, welches das System besser beschreibt, auf Grundlage der experimentell bestimmten Daten der vier C-terminal markierten Analoga TP10-L10-, -L13-, -L16- und -I20-CF₃-L-Bpg lieferte einen Neigungswinkel von 69°. Da die vier Orientierungsparameter jedoch nur durch vier Datenpunkte bestimmt werden, ist das Ergebnis dieser Regression statistisch nicht abgesichert. D.h. es existieren weitere Möglichkeiten für den Neigungswinkel τ mit einem geringen RMSD, aber anderen dynamischen Parametern, wie beispielsweise $\tau=13^\circ$. Wie in Abbildung 4.38 A1 und A2 gezeigt, ist die ‚Helical-wave‘-Funktion im Bereich von 100° bis 200° um die Helix eindeutig bestimmt, während im Bereich von 200° bis 360° kein Datenpunkt vorhanden ist, der die Kurve definiert. Dadurch erklärt sich der große Wertebereich für den Neigungswinkel τ .

Dennoch ist ein Neigungswinkel im Bereich von 60° die wahrscheinlichste Lösung, da auch die Interpretation der OCD-Spektren in allen gemessenen P/L's (P/L=1:50, 1:100 und 1:200) für einen oberflächengebundenen Zustand des Peptids in der Lipiddoppelschicht sprechen (siehe Kapitel 4.5).

5.5 Aggregationsverhalten

Die Strukturanalyse war nur für geringe Peptidkonzentrationen (P/L=1:200 oder 1:400) möglich, da bei hohen Peptidkonzentrationen, wie beispielsweise P/L=1:50, sowohl bei den *L*- als auch den *D*-Epimeren, Aggregation in Form von β -Faltblättern auftrat. In den NMR-Spektren wird die Immobilisierung durch ein entsprechendes Pulverspektrum angezeigt (vergleiche Abbildung 5.1). Das Aggregationsverhalten von TP10 und den CF₃-L- und -D-Bpg markierten Analoga in orientierten DMPC/DMPG-Lipiddoppelschichten wurde mithilfe der orientierten Zirkulardichroismus-Spektroskopie eingehend untersucht (siehe Kapitel 4.5). In nahezu allen OCD-Spektren des Wildtyps und der CF₃-L- und -D-Bpg markierten TP10-Analoga wurde ein Intensitätsverlust des OCD-Signals und eine langwellige Verschiebung der Banden beobachtet, der durch die teilweise Umwandlung α -

helikaler Strukturanteile in β -Stränge begründet ist. In einigen OCD-Spektren wurde die vollständige Umwandlung eines Spektrums, das typisch für eine Helix ist, in ein für β -Faltblätter typisches Spektrum beobachtet. Daher kam es zur Ausbildung eines speziellen positionsabhängigen Aggregationsmusters, welches in gleicher Weise in den Festkörper-NMR-Spektren beobachtet werden konnte.

Ein Vergleich der Ergebnisse der OCD- und ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie der Proben, die jeweils einen Tag hydratisiert wurden bei einem P/L von 1:50 zeigt große Übereinstimmungen im Aggregationsmuster (Abbildung 5.4).

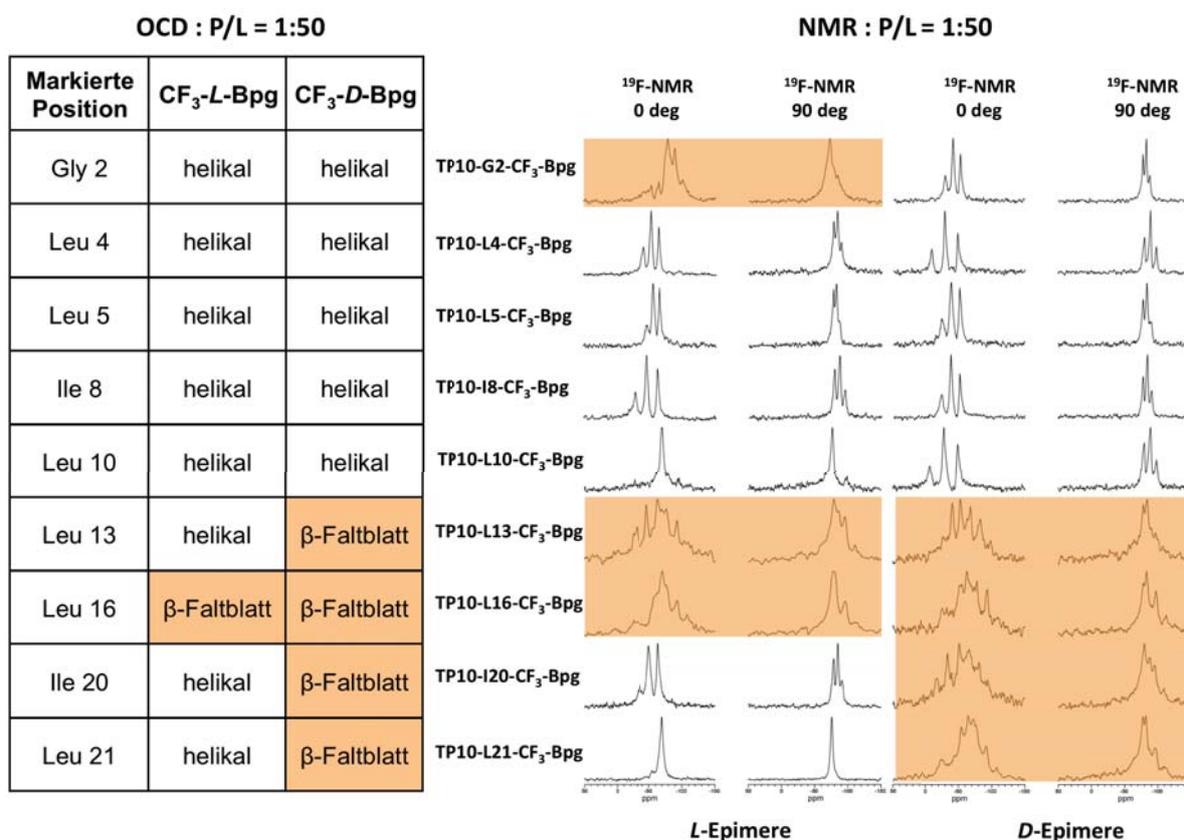


Abbildung 5.4: Vergleich der Ergebnisse der OCD- und ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie der CF_3 -Bpg markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) bei P/L=1:50. Die Pulverspektren sind farblich hervorgehoben.

Die L-Epimere mit einer CF_3 -Bpg-Markierung an Position 4, 5, 8, 10, 20 und 21 und die D-Epimere markiert an Position 2, 4, 5, 8 und 10 zeigen, in Analogie zu den gut aufgelösten Triplets im NMR-Spektrum, ein helikales OCD-Spektrum. Auch die Pulverspektren von TP10-L16- CF_3 -L-Bpg und TP10-L13-, -L16-, -I20- und -L21- CF_3 -D-Bpg stehen im Einklang mit den OCD-Spektren, deren Linienform typisch für ein β -Faltblatt ist. Lediglich bei den L-Epimeren TP10-G2- CF_3 -L-Bpg und TP10-L13- CF_3 -L-

Bpg treten Unterschiede auf. Während das OCD-Spektrum von TP10-G2-CF₃-L-Bpg eine typisch helikale Form aufweist, resultiert die NMR-Messung in einem Pulverspektrum. Das atypische Verhalten dieses Analogons, welches ebenfalls bei anderen Messverfahren (CD-Spektroskopie und Zellaufnahme-Experimente) in Erscheinung trat, hängt vermutlich mit der Substitution der relativ kleinen Aminosäure Gly durch das sterisch anspruchsvolle CF₃-Bpg zusammen. Tatsächlich eignet sich CF₃-Bpg eher zur Substitution von Leu oder Ile (siehe Kapitel 1.8). Die unterschiedlichen Mengen an Peptid (8 µg Peptid in der OCD- und 260 µg in der entsprechenden NMR-Probe) können ebenfalls eine Ursache für die beobachteten Abweichungen sein. Weiterhin zeigt TP10-L13-CF₃-L-Bpg ein Pulverspektrum, während das OCD-Spektrum nach 1 Tag Hydratation eine helikale Form aufweist. Bei genauerer Betrachtung des NMR-Spektrums kann neben dem Pulveranteil ein Triplet identifiziert werden. Neben den aggregierten Anteilen, liegt das Peptid demnach teilweise in helikaler Form vor. Da mittels OCD der genaue Anteil an den Sekundärstrukturmotiven nicht bestimmt werden kann und damit nur qualitative Aussagen getroffen werden können, widersprechen sich in diesem Fall die Ergebnisse der OCD- und NMR-Spektroskopie nicht. Darüber hinaus wird nach 5 Tagen Hydratation bei diesem Analogon ein Übergang in ein für β -Faltblätter typisches OCD-Spektrum beobachtet. In diesem Fall unterscheidet sich folglich die Kinetik der Aggregation in der OCD- und NMR-Probe.

Die Ergebnisse der OCD- und ¹⁹F-Festkörper-NMR-Spektroskopie bezüglich des Aggregationsverhaltens der TP10-Analoga nach 1 Tag Hydratation bei einem P/L von 1:200 stimmen, mit Ausnahme von TP10-G2-CF₃-L-Bpg, perfekt überein (Abbildung 5.5).

Die Aggregation steht in direkter Relation zur Position der ¹⁹F-markierten Aminosäure und deren Konfiguration. Während die TP10-Analoga mit einer CF₃-L- oder -D-Bpg-Markierung im flexibleren und weniger strukturierten N-terminalen Galaninteil keine eindeutige Aggregation, sondern nur teilweise Aggregation zeigten, aggregierten nur Analoga mit einer Markierung im C-terminalen und strukturierten Mastoparanteil des Peptids. Dabei aggregierten die *D*-Epimere stärker als die entsprechenden *L*-Epimere, da sie bereits nach einem Tag als β -Faltblatt vorlagen (vergleiche Abbildung 5.4). Im Normalfall können sowohl eine *L*- als auch eine *D*-Aminosäure an eine helikale Struktur angepasst werden, während die Inkorporation einer *D*-Aminosäure die Aggregation als β -Faltblatt unterbindet (vergleiche Wadhvani et

al.⁵⁹). Im Fall von TP10 wurden, wie oben beschrieben, andere Beobachtungen gemacht.

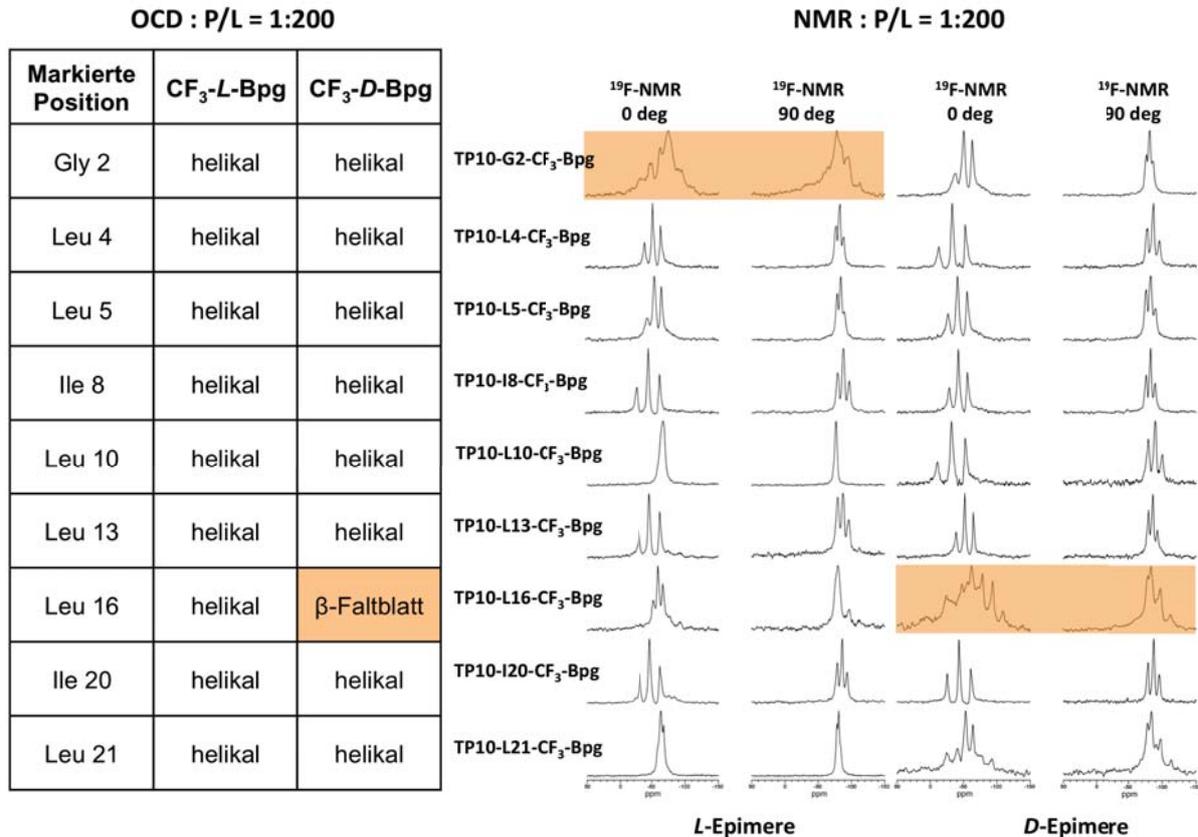


Abbildung 5.5: Vergleich der Ergebnisse der OCD- und ¹⁹F-Festkörper-NMR-Spektroskopie der CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) bei P/L=1:200. Die Pulverspektren sind farblich hervorgehoben.

Die Einführung von CF₃-D-Bpg sollte erwartungsgemäß Aggregation inhibieren, induziert diese aber im Gegensatz dazu, falls die markierte Aminosäure in den C-terminalen Teil des Peptids inkorporiert wird. Der C-Terminus des Peptids kann folglich nicht Teil des Faltblattes sein, sondern der aggregierende Anteil muss im strukturell flexibleren N-Terminus lokalisiert sein. Der Mastoparanteil von TP10 bildet, wie mittels ¹⁹F-Festkörper-NMR-Spektroskopie bestätigt (vergleiche Kapitel 5.4), eine helikale Struktur aus. Es wird deshalb angenommen, dass die Substitution einer Aminosäure im C-Terminus durch das sterisch anspruchsvolle CF₃-Bpg die Ausbildung der Sekundärstruktur beeinträchtigt und zum partiellen Aufwinden der Helix führt. Durch dieses Aufwinden wird im strukturell flexibleren N-Terminus Aggregation induziert, so dass dieser ein antiparalleles β-Faltblatt ausbilden kann. Wird dagegen durch CF₃-Bpg eine Aminosäure im N-terminalen Galaninteil von TP10

substituiert, verursacht dies keine Störung, da es zu keiner Veränderung in der Sekundärstruktur kommt. Die sterisch anspruchsvolle ^{19}F -markierte Aminosäure, egal welcher Konfiguration, kann an die flexible Struktur des N-terminalen Teils angepasst werden und verursacht keine wesentlichen Störungen des helikalen C-Terminus. Auch die *L*-Epimere zeigen ein ähnliches Verhalten, jedoch ist die Störung der helikalen Struktur durch CF_3 -*L*-Bpg im C-Terminus im Vergleich zum *D*-Enantiomer scheinbar geringer, da die *L*-Epimere langsamer und nicht im selben Ausmaß aggregieren. Erst nach 5 Tagen kommt es zur vollständigen Aggregation und die *L*-Epimere, in denen jeweils die letzten beiden C-terminalen Reste substituiert sind, aggregieren nicht als β -Faltblatt. Direkt am C-Terminus scheint die Störung der helikalen Struktur durch CF_3 -*L*-Bpg für ein Aufwinden der Helix nicht auszureichen. Die Position Leu10 nimmt eine Sonderstellung ein. Während beim *L*-Epimer Aggregation beobachtet wird, bildet das entsprechende *D*-Epimer kein β -Faltblatt. Folglich sollte hier die Grenze zwischen dem antiparallelen Faltblatt und der aufgewundenen Struktur liegen, denn die *L*-Form aggregiert, wohingegen die *D*-Form selbiges verhindert.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen bezüglich der OCD-Spektren der Carboxyfluorescein-markierten TP10-Analoga (siehe Kapitel 4.5.2). Sie wiesen eine deutlich geringere Tendenz zur Aggregation auf. Keines der CF -markierten *L*-Epimere zeigte nach einem Zeitraum von 8 Tagen und in einer hohen Peptidkonzentration ($P/L=1:50$) Aggregation als β -Faltblatt. Nur in den OCD-Spektren von zwei *D*-Epimeren (TP10-L13- und -L16- CF_3 -*D*-Bpg) wurde Aggregation beobachtet. Die Fluoreszenzmarkierung, die ebenfalls direkt am N-Terminus lokalisiert ist, verhindert die Aggregation des Galanteils und erklärt somit die deutlich geringere Aggregationstendenz.

Damit weist TP10, ähnlich dem Ursurspeptid TP, eine Tendenz zur Aggregation auf. Eine genaue Betrachtung des Aggregationmusters von TP10 ermöglicht erstmals die Erstellung eines Aggregationsmodells (Abbildung 5.6). Der N-Terminus von TP10 bildet demnach ein antiparalleles β -Faltblatt aus (Abbildung 5.6, grün), während die aufgewundenen losen C-terminalen Enden aus der Fibrille herausstehen (Abbildung 5.6, rot).

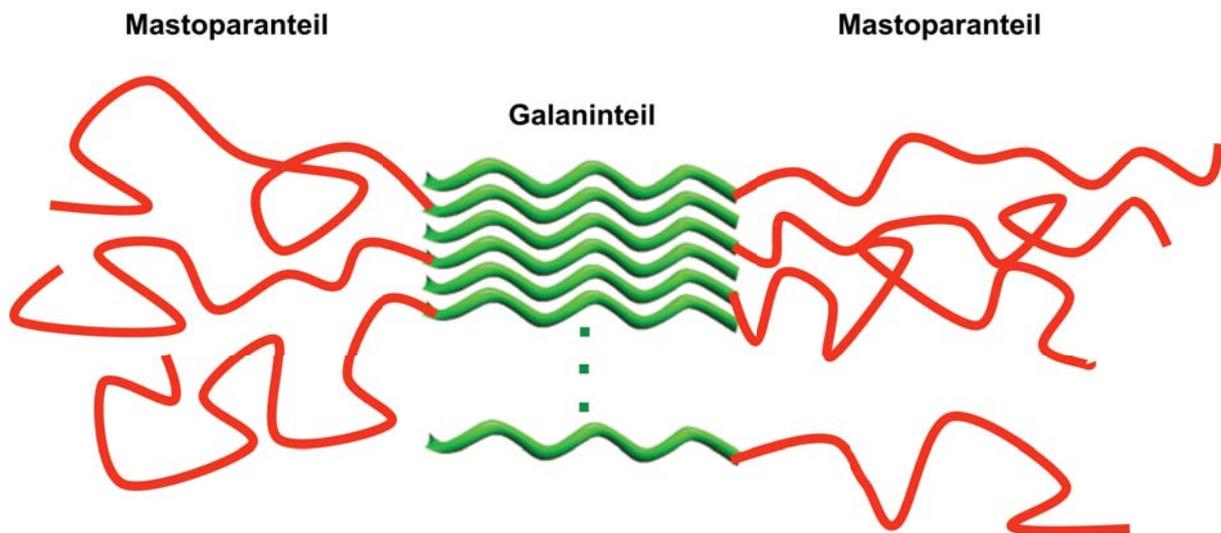


Abbildung 5.6: Modell der Aggregation von TP10. Der Galaninteil bildet eine Fibrille (grün), während der lose Mastoparanteil (rot) ungeordnet aus der Fibrille heraussteht.

In Tabelle 5.2 sind die gewonnenen Erkenntnisse von TP10 im Vergleich zum Ursurspeptid TP von der Synthesestrategie über die Strukturbestimmung and das Aggregationsverhalten nochmals zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der Ergebnisse für TP10 im direkten Vergleich zum Ursurspeptid TP.

Synthesestrategie: Transportan	G W T L N S A G Y L L G K I N L K A L A A L A K K I L-NH ₂																					
	Galanin							K	Mastoparan													
Synthesestrategie: Transportan-10																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
	A	G	Y	L	L	G	K	I	N	L	K	A	L	A	A	L	A	K	K	I	L-NH ₂	
	Galanin							K	Mastoparan													
Lösungs-NMR: in Bizellen	flexible α -Helix							starre α -Helix														
Festkörper-NMR: geringe Peptidkonzentration								flexibel							α -Helix $\tau=58^\circ$, $\rho=119^\circ$							
OCD: Aggregationstendenz Monomer								Markierung (CF ₃ -D/L-Bpg) verursacht keine Störung							sterisch anspruchsvolles CF ₃ -D-Bpg stört α -helikale Struktur und induziert Aggregation							
lokale Konformation in der aggregierten β -Fibrille								antiparalleles β -Faltblatt							unstrukturiert, steht aus der Fibrille heraus							

Diese Erkenntnisse sind für die Weiterentwicklung und Verbesserung zellpenetrierender Peptide von großer Bedeutung, da Aggregation je nachdem, ob

die zellpenetrierenden Eigenschaften positiv oder negativ beeinflusst werden, durch die gezielte Einführung einer Aminosäure mit einer starr am Rückgrat fixierten Seitenkette, induziert oder unterbunden werden kann.

6. Ausblick

Die Ergebnisse der Strukturuntersuchung des zellpenetrierenden Peptids Transportan-10 stehen weitestgehend im Einklang mit literaturbekannten Daten des Ursprungspeptids Transportan und lieferten grundlegend neue Einblicke.

Um die Ergebnisse der Strukturanalyse von TP10 in Phospholipiddoppelschichten einer Mischung aus DMPC/DMPG (3:1) zu bestätigen, wäre es sinnvoll in den strukturierten C-terminalen Teil von TP10 zwischen den Resten Leu10 und Ile20 weitere Markierungen einzuführen um mehr Datenpunkte zu erhalten, die einen kleinen RMSD liefern. Für die auf der Gauss-Verteilung basierende dynamische Strukturberechnung des Teilstücks zwischen den Resten Leu10 bis Ile20 ist eine weitere Markierung notwendig um ein statistisch gesichertes Ergebnis zu erhalten.

TP10: 1 5 10 15 20
 AGYLLGKINLK**A**L**A**LAKKIL-NH₂

Beispielsweise ist eine Substitution von Ala an Position 12, 14, 15 oder 17 (fett hervorgehoben) durch CF₃-Bpg möglich, wobei hier eine sorgfältige Prüfung der Beeinflussung von Sekundärstruktur und biologischen Eigenschaften notwendig ist, da Ala und CF₃-Bpg sich bezüglich ihrer Ausdehnung deutlich voneinander unterscheiden. Eine Markierung mit Ala-D₃ ist ebenfalls möglich. Eine Substitution der geladenen Lys-Reste empfiehlt sich nicht, da die Hydrophobizität des Peptids dramatisch verändert werden würde.

Desweiteren könnten zusätzliche Zellaufnahme-Experimente der *D*-Epimere und der an unterschiedlichen Positionen (N-terminal, Lys13 und C-terminal) markierten Transportan-Analoga Aufschluss über den Einfluss der Aggregation und des Verknüpfungspunktes mit der Cargo auf die zellpenetrierenden Eigenschaften von TP10 liefern.

Zur Fundierung/Bestätigung des aufgestellten Aggregationsmodells könnte die Darstellung von TP10-Analoga erfolgen, welche gleichzeitig eine CF₃-Bpg-Markierung im N- und C-terminalen Teil des Peptids tragen. Eine CF₃-*D*-Bpg-Markierung im C-terminalen Teil an Position 13, 16 oder 20, die Aggregation im N-terminalen Teil induziert, sollte durch eine zusätzliche Substitution einer Aminosäure im N-Terminus an Position 4, 5 oder 8 durch CF₃-*D*-Bpg unterbunden werden, während eine Markierung an derselben Position durch CF₃-*L*-Bpg keinen Einfluss auf die Aggregation ausüben dürfte.

7. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung des zellpenetrierenden Peptids Transportan-10 (TP10) in Biomembranen mittels ^{19}F -Festkörper-NMR- und orientierter Zirkulardichroismus-Spektroskopie.

Der Wildtyp und die an Position 2, 4, 5, 8, 10, 13, 16, 20 und 21 jeweils mit der NMR-Sonde CF_3 -*L*- oder -*D*-Bpg markierten TP10-Analoga, welche für die Zellaufnahme-Experimente zusätzlich N-terminal mit Carboxyfluorescein markiert wurden, konnten erfolgreich an der festen Phase synthetisiert, charakterisiert und in genügend großen Ausbeuten mittels HPLC aufgereinigt werden.

Eine Beeinflussung der strukturellen Eigenschaften oder der biologischen Aktivität durch die ^{19}F -markierte Aminosäure hat sich nicht gezeigt. Weder in der Sekundärstruktur, noch den zellpenetrierenden oder antimikrobiellen Eigenschaften ergaben sich wesentliche Unterschiede bezüglich des nativen Peptids und der TP10-Analoga, wie die Ergebnisse der Zirkulardichroismus-Spektroskopie, der Zellaufnahme-Experimente und die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration eindeutig belegen.

Die Strukturanalyse erfolgte anhand der durch ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie experimentell ermittelten dipolaren Kopplungen der nicht-aggregierenden *L*-Epimere in orientierten Phospholipiddoppelschichten, im konkreten Fall in einer Mischung aus DMPC/DMPG im molaren Verhältnis 3:1. Ein Einfluss der Peptidkonzentration oder Ladung der Lipide auf die Orientierung von TP10 wurde nicht festgestellt. Die Orientierungsparameter konnten eindeutig für den strukturierten C-terminalen Mastoparanteil des Peptids bestimmt werden, der eine starre α -Helix ausbildet. Die Strukturberechnungen ergaben, in Analogie zu dem aus Untersuchungen an Mizellen postulierten Strukturmodell des Ursprungspeptids Transportan, einen Neigungswinkel $\tau=58^\circ$, welcher einen oberflächengebundenen Zustand des Peptids repräsentiert, und einen azimuthalen Rotationswinkel $\rho=119^\circ$ bei dem die hydrophoben Reste ins Innere der Membran und die geladenen Lys-Reste zur wässrigen Phase hin weisen. Der strukturell flexiblere Galaninteil bildet keine starre helikale Struktur, weshalb hier keine eindeutige Bestimmung der Orientierungsparameter möglich war.

In hohen Peptidkonzentrationen (P/L=1:50) zeigten die TP10-Analoga mit einer Markierung im C-terminalen Mastoparanteil Aggregation. Das Aggregationsverhalten,

eingehend durch die orientierte Zirkulardichroismus-Spektroskopie untersucht, folgt einem positionsabhängigen Muster, welches in gleicher Weise in den Festkörper-NMR-Spektren identifiziert wurde. Während die Substitution einer Aminosäure durch das sterisch anspruchsvolle CF₃-Bpg im N-terminalen Galaninteil des Peptids keinerlei Störungen verursacht, führt die Inkorporation der ¹⁹F-markierten Aminosäure in den C-terminalen Mastoparanteil zum teilweisen Aufwinden der helikalen Struktur, wodurch im N-terminalen Galaninteil Aggregation induziert wird. Durch Analysieren dieses Musters wird damit erstmalig ein Modell der Aggregation für TP10 aufgestellt, bei dem der flexible Galaninteil ein antiparalleles β -Faltblatt ausbildet, während die Helix des Mastoparanteils aufgewunden ist und ungeordnet aus der Fibrille herausteht.

Diese Erkenntnisse sind für die Entwicklung zellpenetrierender Peptide von enormer Bedeutung, da Aggregation, je nach Einfluss auf die biologischen Eigenschaften, durch Inkorporation einer geeigneten Aminosäure an einer bestimmten Position, gezielt gesteuert werden kann.

8. Literatur

- ¹ V. Sebbage (2009), Cell-penetrating peptides and their therapeutic applications, *Bioscience Horizons* **2**, 64-72
- ² W. Müller-Esterl (2004), Biochemie, eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler, Spektrum Akademischer Verlag
- ³ S. J. Singer, G. L. Nicolson (1972), The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* **175**, 720–731
- ⁴ Cell_membrane_detailed_diagram_de.svg
- ⁵ C. R. Artalejo, A. Elhamdani, H. C. Palfrey (2002), Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-depended rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells, *Prog. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6358-6363
- ⁶ S. D. Conner, S. L. Schmid (2003), Regulated portals of entry into the cell, *Nature* **422**, 37-44
- ⁷ M. Zorko, Ü. Langel (2005), Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 529-545
- ⁸ M. Green, P. M. Loewenstein (1988), Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein, *Cell* **55**, 1179-1188
- ⁹ A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz (1991), Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 1864-1868
- ¹⁰ D. Derossi, M. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz (1994), The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J. Biol. Chem.* **269**, 10444-10450
- ¹¹ J. Oehlke, A. Scheller, B. Wiesner, E. Krause, M. Beyermann, E. Klauschenz, M. Melzig, M. Bienert (1998), Cellular uptake of an alpha-helical amphipatic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically, *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 127-139
- ¹² B. Allinquant, P. Hantraye, P. Mailloux, K. Moya, C. Bouillot, A. Prochiantz (1995), Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth *in vitro*, *J. Cell Biol.* **128**, 919-927
- ¹³ M. Pooga, U. Soomets, M. Hällbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaei, U. Kahl, J. X. Hao, X. J. Xu, Z. WiesenfeldHallin, T. Hokfelt, A. Bartfai, Ü. Langel (1998), Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission *in vivo*, *Nat. Biotechnol.* **16**, 857-861
- ¹⁴ J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu (2003), Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake, *J. Biol. Chem.* **278**, 585-590
- ¹⁵ S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura (2001), Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, *J. Biol. Chem.* **276**, 5836-5840

-
- ¹⁶ P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbardet (2000), The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13003-13008
- ¹⁷ M. Pooga, M. Lindgren, M. Hällbrink, E. Brakenhielm, Ü. Langel (1998), Galanin-based peptides, galparan and transportan, with receptor-dependent and independent activities, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **863**, 450-453
- ¹⁸ K. Tatemoto, Å. Rökaeus, H. Jörnvall, T. J. McDonald, V. Mutt (1983), Galanin – a novel biologically active peptide from porcine intestine, *FEBS* **164**, 124-126
- ¹⁹ T. Higashijima, S. Uzu, T. Nakajima, E. M. Ross (1988), Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G-proteins), *J. Biol. Chem.* **263**, 6491-6494
- ²⁰ T. Land, Ü. Langel, M. Löw, M. Berthold, A. Undén, T. Bartfai (1991), Linear and cyclic N-terminal galanin fragments and analogs as ligands at the hypothalamic galanin receptor, *Int. J. Pept. Protein. Res.* **38**, 267
- ²¹ Ü. Langel, M. Pooga, C. Kairane, M. Zilmer, T. Bartfai (1996), A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na⁺,K⁺-ATPase and reverses its inhibition by ouabain, *Regul. Pept.* **62**, 47-52
- ²² S. Consolo, G. Baldi, L. Nannini, M. C. Uboldi, M. Pooga, Ü. Langel, T. Bartfai (1997), Galparan induces *in vivo* acetylcholin release in the frontal cortex, *Brain Res.* **756**, 174-178
- ²³ C.-G. Östenson, S. Zaitsev, P.-O. Berggren, S. Efendic, Ü. Langel, T. Bartfai (1997), Galparan: a powerful insulin-releasing chimeric peptide acting at a novel site, *Endocrinology* **138**, 3308-3313
- ²⁴ M. Zorko, M. Pooga, K. Saar, K. Rezaei, Ü. Langel (1998), Differential regulation of GTPase activity by mastoparan and galparan, *Arch. Biochem. Biophys.* **349**, 321-328
- ²⁵ M. Pooga, A. Juréus, K. Rezaei, H. Hasanvan, K. Saar, K. Kask, P. Kjellén, T. Land, J. Halonen, U. Mäeorg, A. Uri, S. Solyom, T. Bartfai, Ü. Langel (1998), Novel galanin receptor ligands, *J. Pept. Res.* **51**, 65-74
- ²⁶ M. Pooga, C. Kut, M. Kihlmark, M. Hällbrink, S. Fernaeus, R. Raid, T. Land,* E. Hallberg, T. Bartfai, Ü. Langel (2001), Cellular translocation of proteins by transportan, *FASEB J.* **15**, 1451-1453
- ²⁷ A. Chugh, F. Eudes (2008), Cellular uptake of cell-penetrating peptides pVec and transportan in plants, *J. Pept. Sci.* **14**, 477-481
- ²⁸ K. Padari, P. Säälilik, M. Hansen, K. Koppel, R. Raid, Ü. Langel, M. Pooga (2005), Cell transduction pathways of transportans, *Bioconjugate Chem.* **16**, 1399-1410
- ²⁹ M. Lindberg, J. Jarvet, Ü. Langel, A. Gräslund (2001), Secondary structure and position of the cell-penetrating peptide transportan in SDS micelles as determined by NMR, *Biochemistry* **40**, 3141-3149
- ³⁰ E. Bárány-Wallje, A. Andersson, A. Gräslund, L. Mäler (2004), NMR solution structure and position of transportan in neutral phospholipid bicelles, *FEBS Letters* **567**, 265-269

-
- 31 S. Pujals, J. Fernández-Carneado, C. López-Iglesias, M. J. Kogan, E. Giralto (2006), Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly, *Biochim Biophys Acta* **1758**, 264-279
- 32 Ü. Langel (2002), Cell-penetrating peptides: processes and applications. 1st ed., *CRC press*, Boca Raton, FL
- 33 U. Soomets, M. Lindgren, X. Gallet, M. Hällbrink, A. Elmquist, L. Balaspiri, M. Zorko, M. Pooga, R. Brasseur, Ü. Langel (2000), Deletion analogues of transportan, *Biochim. Biophys. Acta* **1467**, 165-176
- 34 P. Säälük, K. Padari, A. Niinep, A. Lorents, M. Hansen, E. Jokitalo, Ü. Langel, M. Pooga (2009), Protein delivery with transportans is mediated by caveolae rather than flotillin-dependent pathways, *Bioconjugate Chem.* **20**, 877-887
- 35 L. E. Yandek, A. Pokorny, a. Florén, K. Knoelke, Ü. Langel, P. F. F. Almeida (2007), Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers, *Biophys. J.* **92**, 2434-2444
- 36 E. Bárány-Wallje, J. Gaur, P. Lundberg, Ü. Langel, A. Gräslund (2007), Differential membrane perturbation caused by the cell penetrating peptide TP10 depending on attached cargo, *FEBS Letters* **581**, 2389-2393
- 37 K. Kilk, S. EL-Andaloussi, P. Järver, A. Meikas, A. Valkna, T. Bartfai, P. Kogerman, M. Medsis, Ü. Langel (2005), Evaluation of transportan 10 in PEI mediated plasmid delivery assay, *J. Control. Rel.* **103**, 511-523
- 38 N. Nekhotiaeva, A. Elmquist, G. Kuttuva Rajarao, M. Hällbrink, Ü. Langel, L. Good (2004), Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides, *FASEB J.* **18**, 394-396
- 39 K. Saar, M. Lindgren, M. Hansen, E. Eiríksdóttir, Y. Jiang, K. Rosenthal-Aizman, M. Sassian, Ü. Langel (2005), Cell-penetrating peptides: a comparative membrane toxicity study, *Anal. Biochem.* **345**, 55-65
- 40 S. El-Andaloussi, P. Järver, H. J. Johansson, Ü. Langel (2007), Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study, *Biochem. J.* **407**, 285-292
- 41 R. B. G. Arrighi, C. Ebikeme, Y. Jiang, L. Ranford-Cartwright, M. P. Barrett, Ü. Langel, I. Faye (2008), Cell-penetrating peptide TP10 shows broad-spectrum activity against both *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei brucei*, *Antimicrobial. agents chemother.* **52**, 3414-3417
- 42 A. S. Ulrich (2005), Solid state ¹⁹F NMR methods for studying biomembranes, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.* **46**, 1-21
- 43 E. Strandberg, A. S. Ulrich (2004), NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides, *Concepts Magn. Res.* **23A**, 89-120
- 44 S. L. Grage, A. S. Ulrich (1999), structural parameters from ¹⁹F homonuclear dipolar couplings, obtained by multipulse solid-state NMR on static and oriented systems, *J. Magn. Res.* **138**, 98-106

-
- 45 S. L. Grage, J. Salgado, U. Dürr, S. Afonin, R. W. Glaser, A. S. Ulrich (2001), Solid state ^{19}F -NMR of biomembranes, „Perspective of solid state NMR in biology“ (Eds.: S. R. Kiihne, H. J. M. de Groot), Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, Holland
- 46 A. S. Ulrich, P. Wadhvani, U. H. N. Dürr, S. Afonin, R. W. Glaser, E. Strandberg, P. Tremouilhac, C. Sachse, M. Berditchevskaia, S. Grage (2005), Solid state ^{19}F -nuclear magnetic resonance analysis of membrane-active peptides NMR Spectroscopy of Biological Solids (Ed. A. Ramamoorthy), *Taylor & Francis*, 215-236
- 47 P. K. Mikhailiuk, S. Afonin, A. N. Chernega, E. B. Rusanov, M. O. Platonov, G. G. Dubhinina, M. Berditsch, A. S. Ulrich, I. V. Komarov (2006), Conformationally rigid trifluoromethyl-substituted α -amino acid designed for peptide structure analysis by solid-state ^{19}F NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 5659-5661
- 48 S. Afonin, P. K. Mikhailiuk, I. V. Komarov, A. S. Ulrich (2007), Evaluation the amino acid CF_3 -bicyclopentylglycine as a new label for solid-state ^{19}F -NMR structure analysis of membrane-bound peptides, *J. Pept. Sci.* **13**, 614-623
- 49 S. Afonin, R. W. Glaser, M. Berditchevskaia, P. Wadhvani, K.-H. Gührs, U. Möllmann, A. Perner, A. S. Ulrich (2003), 4-Fluorophenylglycin as a label for ^{19}F -NMR structure analysis of membrane-associated peptides, *Chem. Bio. Chem.* **4**, 100-112
- 50 S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price (2005), How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta* **1751**, 119-139
- 51 N. Sreerama, R. W. Woody (1993), A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism, *Anal. Biochem.* **209**, 32-44
- 52 W. C. Johnson (1999), Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **35**, 307-312
- 53 S. W. Provencher, J. Glöckner (1981), Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, *Biochemistry* **20**, 33-37
- 54 W. Moffit (1956), Optical rotary dispersion of helical polymers, *J. Chem. Phys.* **25**, 467-478
- 55 M. Bazzi, R. W. Woody, A. Brack (1987), Interaction of amphipathic polypeptides with phospholipids: characterization of conformations and the CD of oriented β -sheets, *Biopolymers* **26**, 1115-1124
- 56 T. M. Weiss, Y. Lin, L. Ding, A. J. Waring, R. I. Lehrer, H. W. Huang (2002), Two states of the cyclic antimicrobial peptide RTD-1 in lipid bilayers, *Biochemistry* **41**, 10070-10076
- 57 W. T. Heller, A. J. Waring, R. I. Lehrer, H. W. Huang (1998), Multiple states of β -sheet peptide protegrin in lipid bilayers, *Biochemistry* **37**, 17331-17338
- 58 J. Bürck, S. Roth, P. Wadhvani, S. Afonin, N. Kanithasen, E. Strandberg, A. S. Ulrich (2008), Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism, *Biophys. J.* **95**, 2872-3881
- 59 P. Wadhvani, J. Bürck, E. Strandberg, C. Mink, S. Afonin, A. S. Ulrich (2008), Using a sterically restrictive amino acid as a ^{19}F NMR label to monitor and to control peptide aggregation in membranes, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16515-16517

-
- 60 J. Buerck, S. Roth, P. Wadhvani (2008), Conformation and membrane orientation of
amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism, *Biophys. J.* **95**, 3872-3881
- 61 R. B. Merrifield (1986), Solid phase peptide synthesis, *Science* **232**, 341-347
- 62 L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P.
Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert (2002),
Kupplungsreagentien vom Uronium-/Guanidinium-Typ: Synthese und Charakterisierung der
authentischen Uroniumsalze, *Angew. Chem.* **114**, **3**, 457-461
- 63 R. Brückner (2003), Reaktionsmechanismen, Spektrum Akademischer Verlag
- 64 G. B. Fields, R. L. Noble (1990), Solid phase peptide synthesis utilizing 9-
fluorenylmethoxycarbonyl amino acids, *Int. J. Peptide Protein Res.* **35**, 161-214
- 65 R. W. Glaser, C. Sachse, U. H. Dürr, P. Wadhvani, S. Afonin, E. Strandberg, A. S. Ulrich
(2005), Concentration-dependent realignment of the antimicrobial peptide PGLa in lipid
membranes observed by solid-state ¹⁹F-NMR, *Biophys. J.* **88**, 3392-3397
- 66 E. Strandberg, N. Kanithasen, D. Tiltak, J. Bürck, P. Wadhvani, O. Zwernemann, A. S. Ulrich
(2008), Solid-state NMR analysis comparing the designer-made antibiotic MSI-103 with its
parent peptide PGLa in lipid bilayers, *Biochemistry* **47**, 2601-2616
- 67 P. Wadhvani et al., Structure analysis of KIGAKI, in preparation
- 68 R. Heinzmann, S. L. Grage, C. Schalck, J. Bürck, Z. Bánóczy, O. Toke, A. S. Ulrich (2011), A
kinked antimicrobial peptide from *Bombina maxima*. II. Behavior in phospholipid bilayers, *Eur.*
Biophys. J. **40**
- 69 rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi von Don Armstrong and Raphael Zidovetzki

9. Anhang

9.1 Endozytose-Mechanismen

9.1.1 Phagozytose

Zur Phagozytose sind nur spezielle Säugetierzellen, wie Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten, befähigt. Die Aufgabe dieser Zellen besteht beispielsweise darin Krankheitserreger (Bakterien oder Hefen), die Überreste von abgestorbenen Zellen oder arterielle Fettablagerungen zu beseitigen.

9.1.2 Makropinozytose

An der Signalkaskade, die Makropinozytose induziert, sind GTPasen der Rho-Familie beteiligt, die eine Aktin-getriebene Ausbildung von Membranausstülpungen auslösen. Diese Ausstülpung windet sich um das Partikel und fusioniert anschließend wieder mit der Plasmamembran unter Ausbildung eines großen Vesikels, dem Makropinosom mit einem Durchmesser von ungefähr 1 μm . Über den genauen Ablauf dieses Fusionsprozesses ist wenig bekannt. Die Makropinozytose spielt eine wichtige Rolle in der Herabregulation von aktivierten Signalmolekülen.

9.1.3 Caveolae-vermittelte Endozytose

Bei Caveolae handelt es sich um ca. 60 nm große sackförmige Einstülpungen der Plasmamembran, die Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen der Plasmamembran, in denen Membrantransporter und Signalmoleküle in hoher Konzentration auftreten, eingrenzen. Caveolae findet man hauptsächlich in Endothelzellen und Adipozyten. Das wichtigste Strukturelement ist Caveolin, ein dimeres Membranprotein, das eine Haarnadelschleife ausbildet, so dass sich sowohl der C- als auch N-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite befinden. Caveoline überziehen die gesamte Oberfläche der Membraneinbuchtung. Caveolae treten im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Signalmolekülen auf und sind damit in die Regulierung von Signalkaskaden involviert. Weiterhin spielen Caveolae eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport von Cholesterin und der Cholesterin-Homöostase und dem transzellulären Transport.

9.1.4 Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose

Caveolae repräsentieren nur eine Art von Cholesterin-reichen Mikrodomänen der Plasmamembran. Es existieren viele solcher ‚Lipid Rafts‘ (*engl.*: raft = Floß) mit einem Durchmesser von ca. 40 bis 50 nm, die frei auf der Zelloberfläche diffundieren. Aus all diesen kleinen Rafts können Vesikel entstehen, wobei über die Mechanismen, die zu deren Bildung führen, wenig bekannt ist. Beispielsweise treten auch Clathrin-unabhängige Mechanismen der Endozytose bei Neuronen und neuroendokrinen Zellen bei der schnellen Rückgewinnung von Membranproteinen nach der stimulierten Sekretion auf.

9.1.5 Clathrin-vermittelte Endozytose

Die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME, *engl.*: clathrin-mediated endocytosis) findet in allen Säugetierzellen statt und regelt die kontinuierliche Aufnahme von essentiellen Nährstoffen, wie Cholesterin-beladenen LDL-Partikeln (*engl.*: low density lipoprotein), das an LDL-Rezeptoren bindet, oder Tranferrin (Tfn), das an Tfn-Rezeptoren bindet. Desweiteren spielt die CME eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation während der Entwicklung von Zellgeweben und Organen, bei der Herabregulierung von aktivierten Signalmolekülen, bei der Zell- und Serumhomöostase und bei der Erregungsweiterleitung in Nervenzellen. Clathrin ist ein Hexamer aus drei schweren und drei leichten Untereinheiten, die in Form eines Dreibeins, eines Triskelions, angeordnet sind. Diese Einheiten sind in der Lage sich unter nicht-physiologischen Bedingungen zu einem Käfig zusammenzulagern. Unter physiologischen Bedingungen in der Zelle werden jedoch für die Ausbildung dieses Clathrin-Käfigs und damit des Vesikels noch weitere Komponenten wie Adaptorproteinkomplexe (*engl.*: adaptor protein complexes) und die GTPase Dynamin benötigt.

9.2 Allgemeine Grundlagen der NMR

Ein Großteil der spektroskopischen Methoden, die in der Chemie Anwendung finden, basiert auf dem Konzept der Resonanz. Bei der magnetischen Kernresonanz (NMR, *engl.*: nuclear magnetic resonance) werden die Energieniveaus der Kernspins durch Anlegen eines äußeren Magnetfelds modifiziert, so dass bei Einstrahlung von

elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Frequenz Absorption eintritt, wenn diese der Differenz der Energieniveaus entspricht.

Atomkerne besitzen einen Eigendrehimpuls, den sogenannten Spin, falls ihre Kernspinquantenzahl $I > 0$ ist. Bei Kernen mit einer geraden Zahl an Protonen und Neutronen ist $I = 0$. Diese Kerne weisen keinen Kernspin auf und sind deshalb in einem NMR-Spektrum unsichtbar. Kerne mit einer ungeraden Anzahl an Protonen und einer geraden Anzahl an Neutronen (oder umgekehrt) besitzen einen halbzahligen Spin und solche bei denen die Zahl an Protonen und Neutronen ungerade ist einen ganzzahligen Spin. Beispiele für Kerne mit verschiedenen Spins sind in Tabelle 9.1 aufgeführt.

Tabelle 9.1: Kerne mit verschiedenen Kernspinquantenzahlen.

Kernspin I	Kern	Protonenzahl	Neutronenzahl
0	^{12}C , ^{16}O	gerade	gerade
1/2	^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P	gerade ungerade	ungerade gerade
1	^2H , ^{14}N	ungerade	ungerade

Der Kernspin hat einen Betrag von

$$|\vec{I}| = \sqrt{I(I+1)} \hbar$$

mit \hbar als Plancksches Wirkungsquantum und einer Komponente um die z-Achse

$$I_z = \hbar m \quad m = -I, -I+1, \dots, -1$$

wobei m die magnetische Quantenzahl darstellt. Es gibt $2I+1$ mögliche Zustände bzw. Orientierungen für I_z , die $2I+1$ möglichen entarteten Energieniveaus entsprechen. Daraus folgt

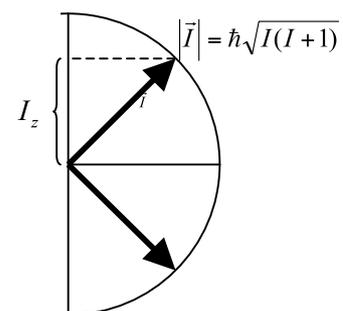
$$I = 0 \quad m = 0$$

$$I = 1/2 \quad m = -1/2, +1/2$$

$$I = 1 \quad m = -1, 0, +1$$

Da bewegte Ladungen Magnetfelder induzieren, besitzen Kerne mit $I > 0$ ein magnetisches Moment

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I}$$



mit dem für jeden Kern charakteristischen gyromagnetischen Verhältnis γ . In Tabelle 9.2 sind die Parameter einiger für die NMR-Spektroskopie wichtiger Kerne aufgelistet.

Tabelle 9.2: Parameter wichtiger NMR-aktiver Kerne.

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

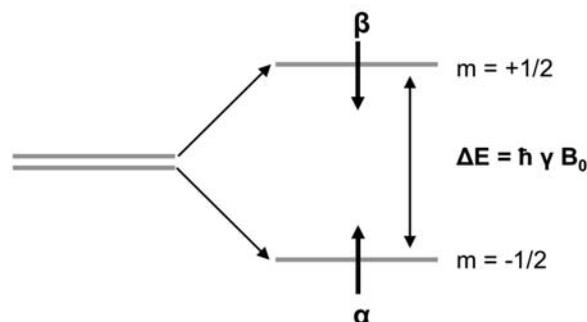


Abbildung 9.1: Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus.

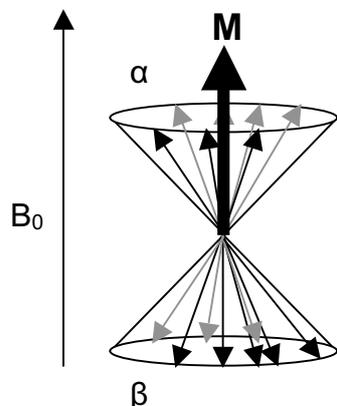
Wird beispielsweise ein Atomkern mit $I = 1/2$ einem Magnetfeld B_0 ausgesetzt, so sind die Energien der zwei möglichen Zustände der Kernspins I nicht mehr entartet (Abbildung 9.1). Die Energiedifferenz ist proportional zur Magnetfeldstärke und hängt mit der Larmorfrequenz ω_0 zusammen

$$\Delta E = -\hbar \gamma B_0 = \hbar \omega_0$$

Auch die Besetzungszahlen der beiden Energieniveaus sind in einem statischen Magnetfeld nicht mehr gleich. Die α -Spins sind energetisch begünstigt, weshalb sie

im Gleichgewichtszustand überwiegen. Die Besetzungszahlen folgen der Boltzmannverteilung:

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = \exp\left(-\frac{E_{\beta} - E_{\alpha}}{kT}\right)$$



Durch die Besetzungsunterschiede resultiert eine Nettomagnetisierung M (Abbildung 9.2) in z-Richtung und durch Einstrahlen elektromagnetischer Radiowellen werden Übergänge zwischen den beiden Energieniveaus möglich.

Abbildung 9.2: Nettomagnetisierung M.

9.3 Darstellung von CF₃-Bpg

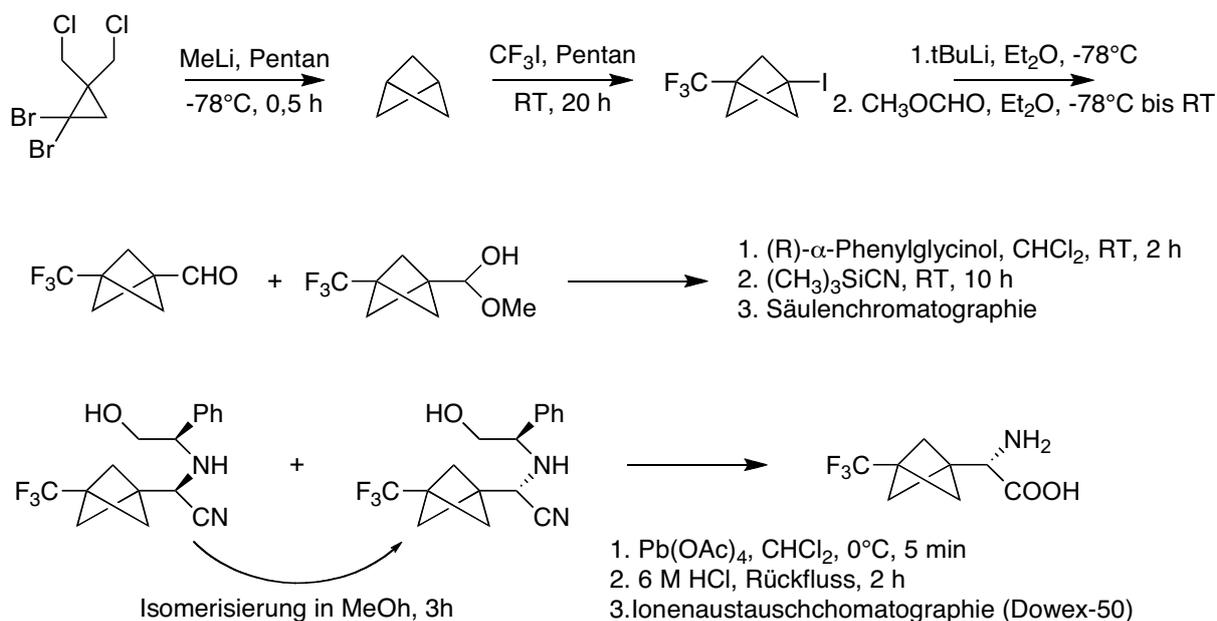


Abbildung 9.3: Chemische Synthese von CF₃-Bpg. Aus⁴⁷.

9.4 Allgemeine Methoden der Peptidsynthese

Das Ziel der Peptidsynthese ist der Aufbau von Peptiden aus Aminosäuren in der Art, dass genau die gewünschte Sequenz eingehalten wird, möglichst hohe Ausbeuten erzielt und Razemisierungen während der Reaktion vermieden werden. Am häufigsten erfolgt die Bildung einer Peptidbindung durch elektrophile Kupplungsreagenzien, die in einer Additions- oder Substitutionsreaktion die Carbonylkomponente aktivieren. Das reaktive Carbonylderivat wird dann von der Aminofunktion nucleophil angegriffen und somit die Peptidbindung über eine Additions-Eliminierungsreaktion geknüpft. Im Folgenden werden die verwendeten Kupplungsreagenzien und die Peptidsynthese an der festen Phase erläutert.

9.4.1 Klassische Kupplungsreagenzien

In der Peptidsynthese spielt die *in-situ*-Aktivierung mit Carbodiimiden (Abbildung 9.4) wie beispielsweise DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) oder das in dieser Arbeit für die Kupplung der ^{19}F -markierten Aminosäure CF_3 -Bpg verwendete DIC (Diisopropylcarbodiimid) eine große Rolle. Durch die Addition der Carbonsäure an die C=N-Doppelbindung dieses Reagenzes entstehen die so genannten O-Acylisoharnstoffe, die mit guten Nucleophilen rasch zum gewünschten Peptid reagieren. Schlechte Nucleophile reagieren mit O-Acylisoharnstoffen so langsam, dass sich Letztere zum N-Acylharnstoff zersetzen, welcher kein Acylierungsmittel mehr darstellt.

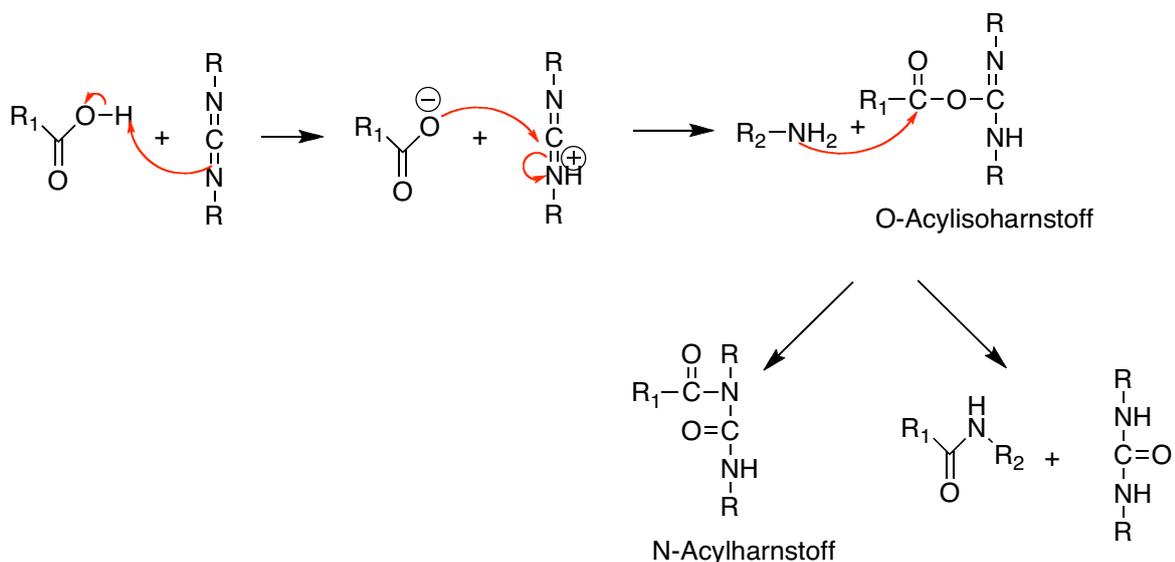


Abbildung 9.4: Wirkungsweise von Carbodiimiden und Nebenreaktion.

Um dieser unerwünschten Nebenreaktion vorzubeugen, setzt man als Additiv ein Hilfsnucleophil (Abbildung 9.5) zu, welches am Carboxy-Kohlenstoff des Carbonsäureteils vom O-Acylisoharnstoff substituiert. Es bildet sich der so genannte Aktivester, der ein genügend reaktives Acylierungsmittel darstellt.

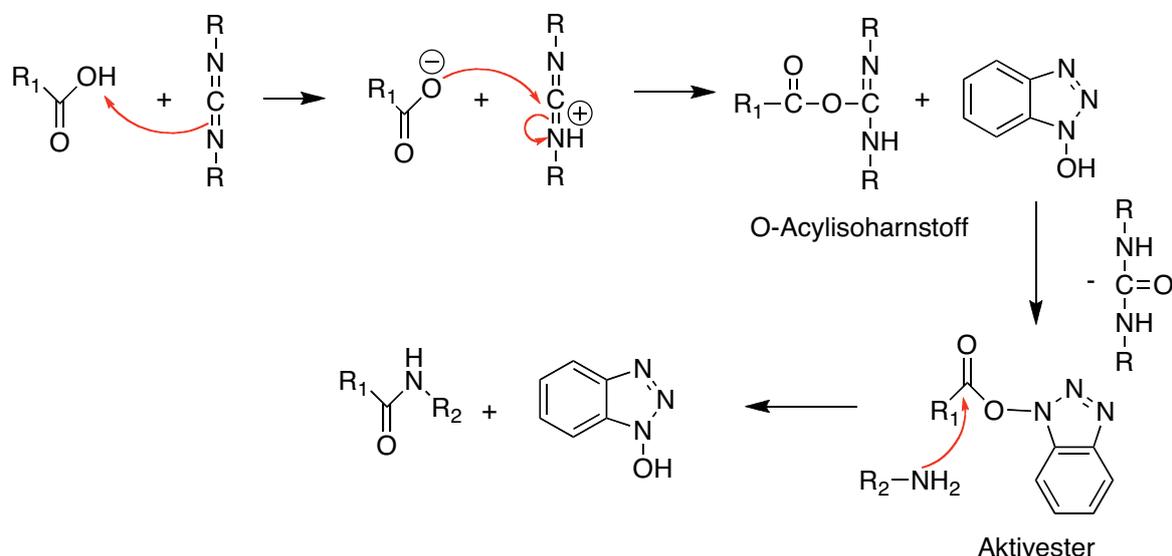
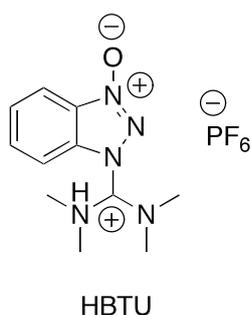


Abbildung 9.5: Wirkungsweise von Carbodiimiden unter Zusatz eines Additivs.

9.4.2 In situ-Aktivierung mit modernen Kupplungsreagenzien



Die in neuerer Zeit entwickelten Aminium- und Phosphonium-Derivate, wie das in dieser Arbeit verwendete HBTU (Abbildung 9.6), aktivieren die Carboxylgruppe *in situ* unter Zusatz einer tertiären Base wie N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA) und überführen diese in die entsprechenden Aktivester (Abbildung 9.7).

Abbildung 9.6: HBTU als Beispiel für moderne Kupplungsreagenzien.

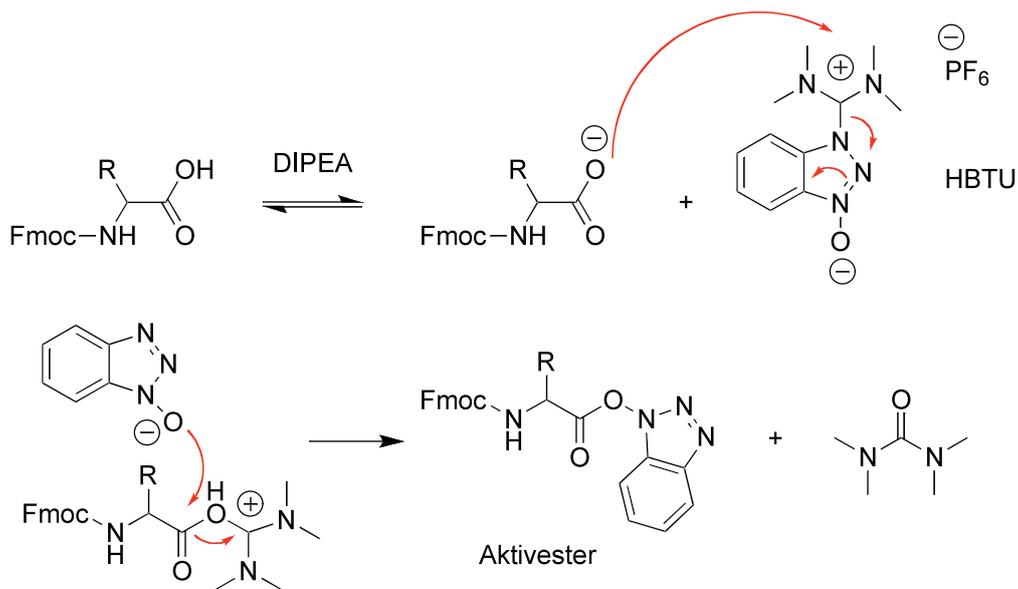
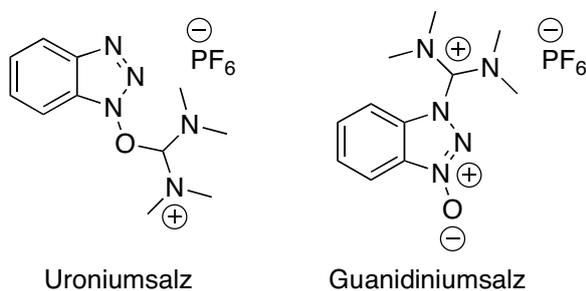


Abbildung 9.7: Bildung des Aktivesters mittels HBTU.

Der Vorteil dieser Reagenzien ist, dass sie Razemisierung in Anwesenheit einer tertiären Base weitgehend verhindern und Nebenreaktionen unterdrücken.



Man ging lange Zeit davon aus, dass das Kupplungsreagenz HBTU die Struktur eines Uroniumsalzes (O-Form) besitzt, bis durch Röntgenstrukturuntersuchungen gezeigt werden konnte, dass es tatsächlich als Guanidiniumsalz (N-Form) vorliegt. Die

Bedeutung dieses Ergebnisses liegt in der verminderten Reaktivität des Guanidiniumsalzes gegenüber dem Uroniumsalz.

9.4.3 Allgemeines Prinzip der Peptidsynthese an der festen Phase

Das Prinzip der Festphasenpeptidsynthese (SPPS, *engl.*: solid phase peptide synthesis, Abbildung 9.8) beruht auf der sequentiellen Addition eines α -Amino- und eines seitenkettengeschützten Aminosäurerestes an einen unlöslichen polymeren Träger, das so genannte Harz, wobei die erste Aminosäure C-terminal über einen Linker mit dem Harz verbunden ist.

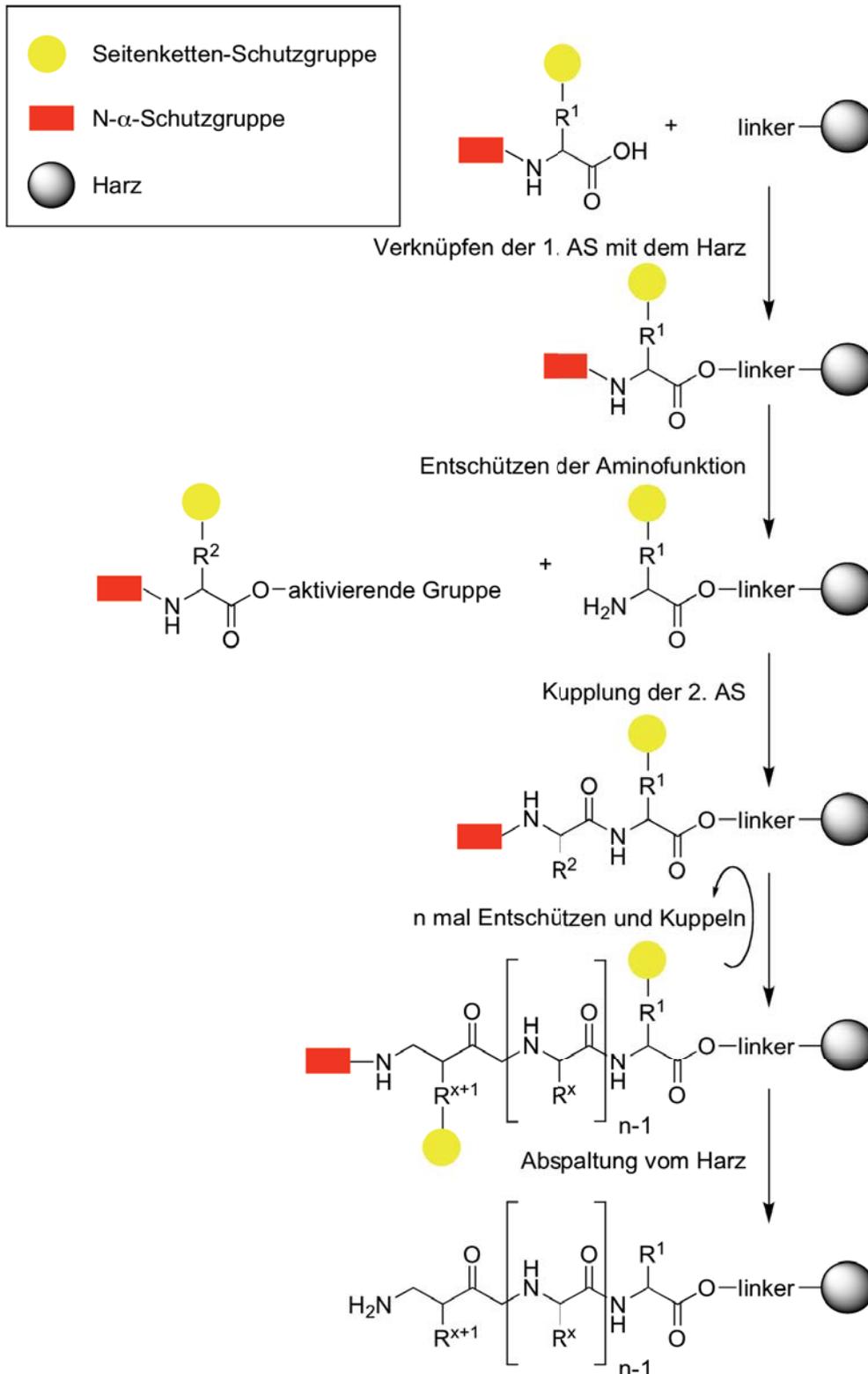
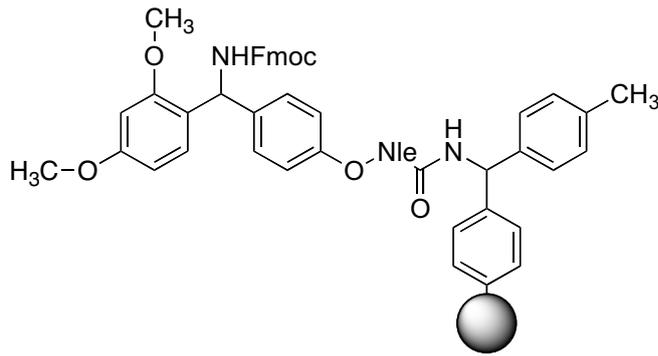


Abbildung 9.8: Allgemeines Schema der Festphasenpeptidsynthese.

Das in dieser Arbeit verwendete Rink-Amid-MBHA-Harz ist in Abbildung 9.9 gezeigt. Die permanenten Seitenkettenschutzgruppen müssen dabei orthogonal zu der temporären Schutzgruppe der α -Aminofunktion sein. Als temporäre Schutzgruppe



wird die basenlabile Fmoc-Gruppe, als permanente Seitenschutzgruppen werden die säurelabile Trt-, Boc- und tBu-Gruppe verwendet.

Abbildung 9.9: Rink-Amid-MBHA-Harz zur Synthese von C-terminal amidierten Peptiden.

Nach Entfernung der α -Aminoschutzgruppe durch Piperidin wird der nächste N- α - und seitenkettengeschützte Aminosäurerest addiert. Diese als Kupplung bezeichnete Knüpfung der Peptidbindung erfolgt durch ein geeignetes Kupplungsreagenz, wie das in dieser Arbeit verwendete HBTU. Die Kupplungs- und Entschützungsprozedur wird solange wiederholt bis das Peptid die gewünschte Primärstruktur erreicht hat. Die Abspaltung des vollständigen Peptids vom Harz, im Idealfall unter gleichzeitiger Abspaltung aller Seitenkettenschutzgruppen, erfolgt mittels TFA und geeigneter Abfangreagenzien. Die Festphasensynthese kann sowohl manuell als auch automatisch an einem Peptidsynthesizer erfolgen. Sie hat gegenüber einer Synthese in Lösung den Vorteil, dass durch die Verwendung eines Überschusses an Reagenzien das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der Produkte gedrängt werden kann, so dass die Kupplungsreaktion fast vollständig abläuft. Überschüssige Reagenzien, sowie lösliche Nebenprodukte, können leicht durch mehrfaches Waschen entfernt werden. Darüber hinaus werden physikalische Verluste weitestgehend minimiert, da das Produkt während der gesamten Synthese am Harz fixiert ist. Im Unterschied zur Biosynthese von Peptiden, die vom N- zum C-Terminus erfolgt, wird das Peptid in der Festphasensynthese entgegengesetzt, also vom C- zum N-Terminus synthetisiert.

9.5 CD-Spektroskopie

9.5.1 CD-Messungen in wässriger Lösung

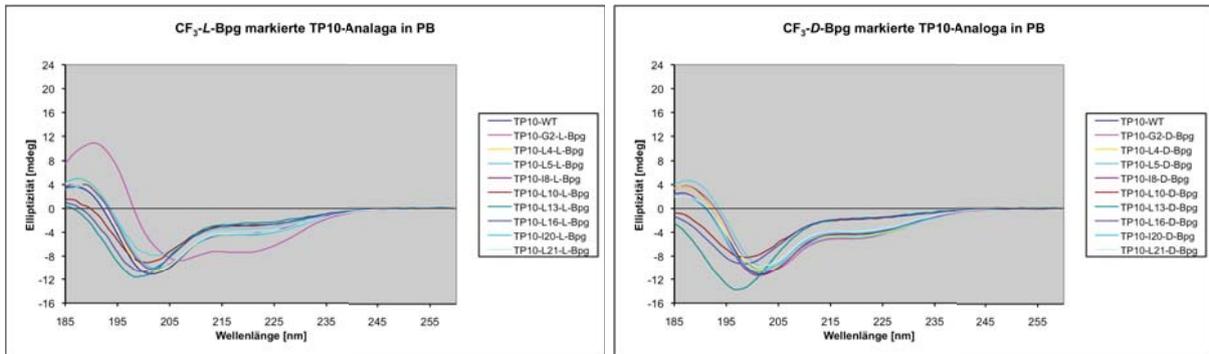


Abbildung 9.10: CD-Spektren der CF_3 -L- (links) und -D-Bpg (rechts) markierten TP10-Analoga in Phosphatpuffer (10 mM).

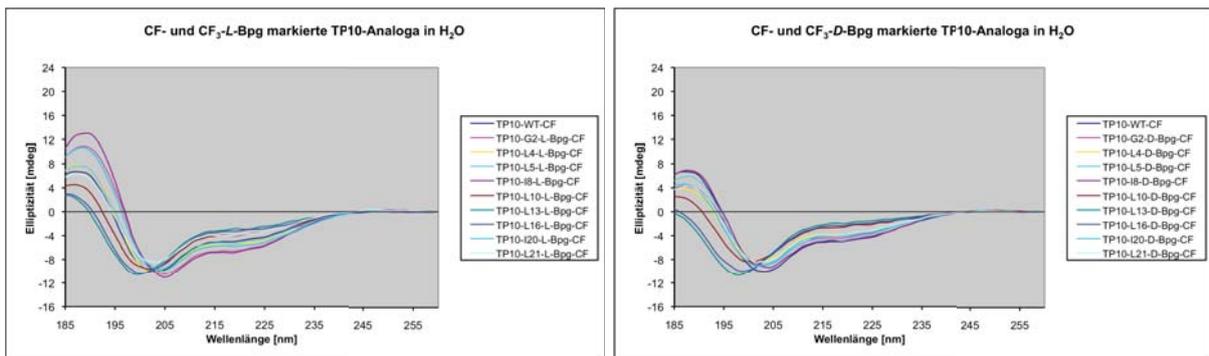


Abbildung 9.11: CD-Spektren der CF-markierten und CF_3 -L- (links) und -D-Bpg (rechts) markierten TP10-Analoga in wässriger Lösung.

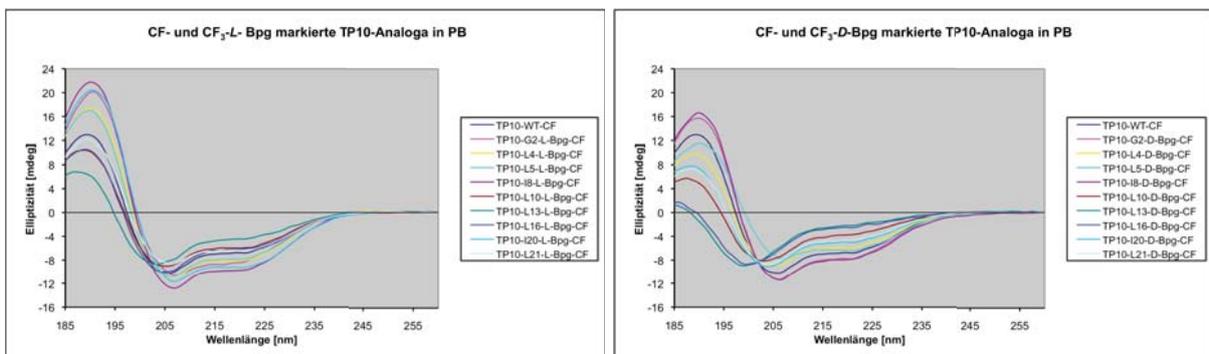


Abbildung 9.12: CD-Spektren der CF-markierten CF_3 -L- (links) und -D-Bpg markierten TP10-Analoga in Phosphatpuffer (10 mM).

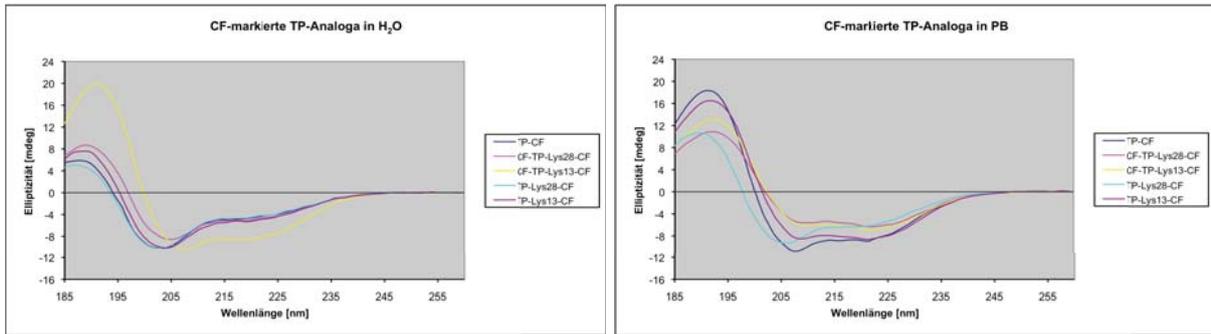


Abbildung 9.13: CD-Spektren der CF-markierten TP-Analoga in wässriger Lösung (links) und in Phosphatpuffer (10 mM) (rechts).

9.5.2 CD-Messungen in TFE/Phosphatpuffer

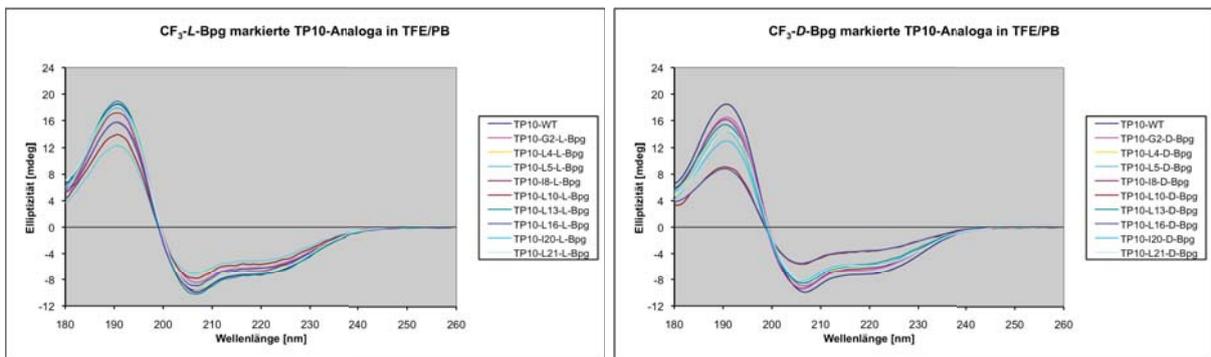


Abbildung 9.14: CD-Spektren der CF₃-L- (links) und -D-Bpg (rechts) markierten TP10-Analoga in TFE/Phosphatpuffer (50% v/v).

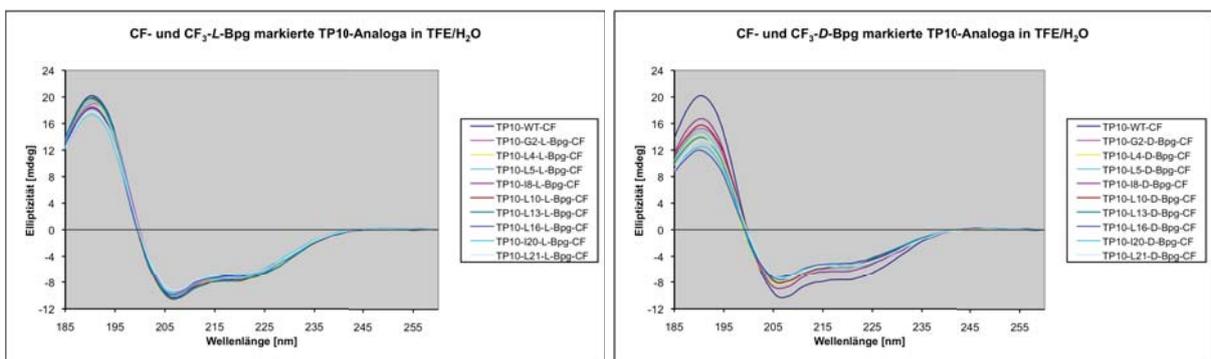


Abbildung 9.15: CD-Spektren der CF-markierten CF₃-L- (links) und -D-Bpg (rechts) markierten TP10-Analoga in TFE/H₂O (50% v/v).

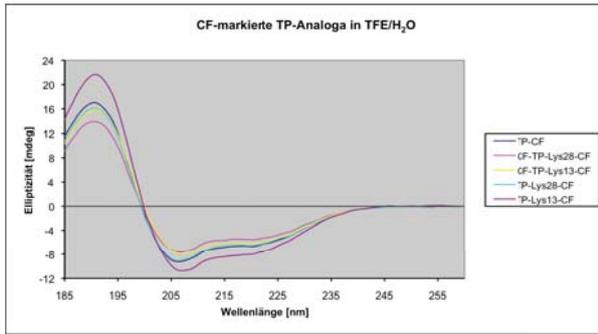


Abbildung 9.16: CD-Spektren der CF-markierten TP-Analoga in TFE/H₂O (50% v/v).

9.5.3 CD-Messungen in Lipidvesikeln

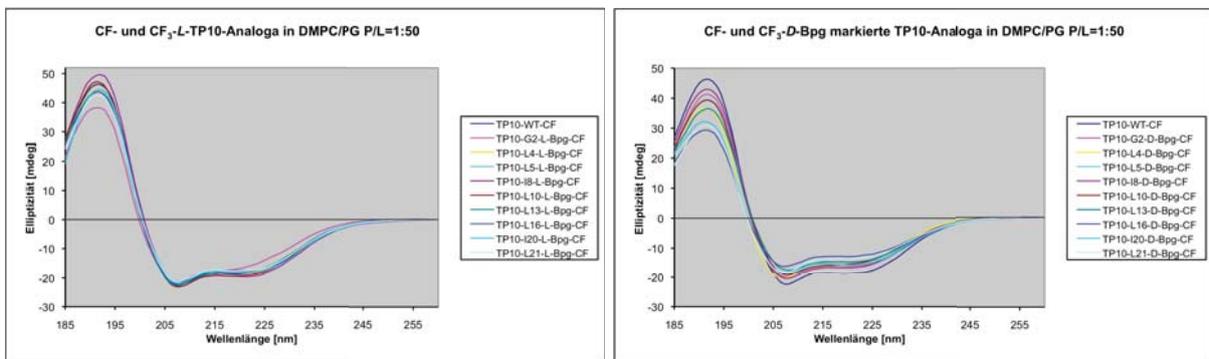


Abbildung 9.17: CD-Spektren der CF-markierten CF₃-L- (links) und -D-Bpg (rechts) markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1)-Vesikeln mit P/L=1:50.

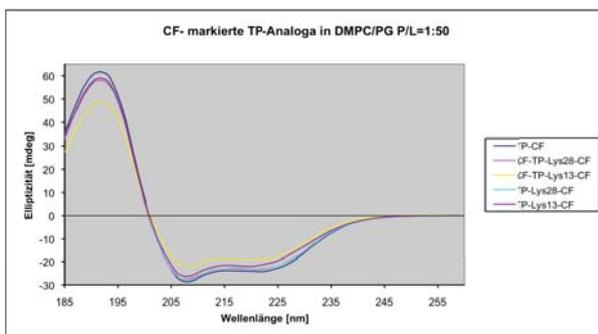


Abbildung 9.18: CD-Spektren der CF-markierten TP-Analoga in DMPC/DMPG (3:1)-Vesikeln mit P/L=1:50.

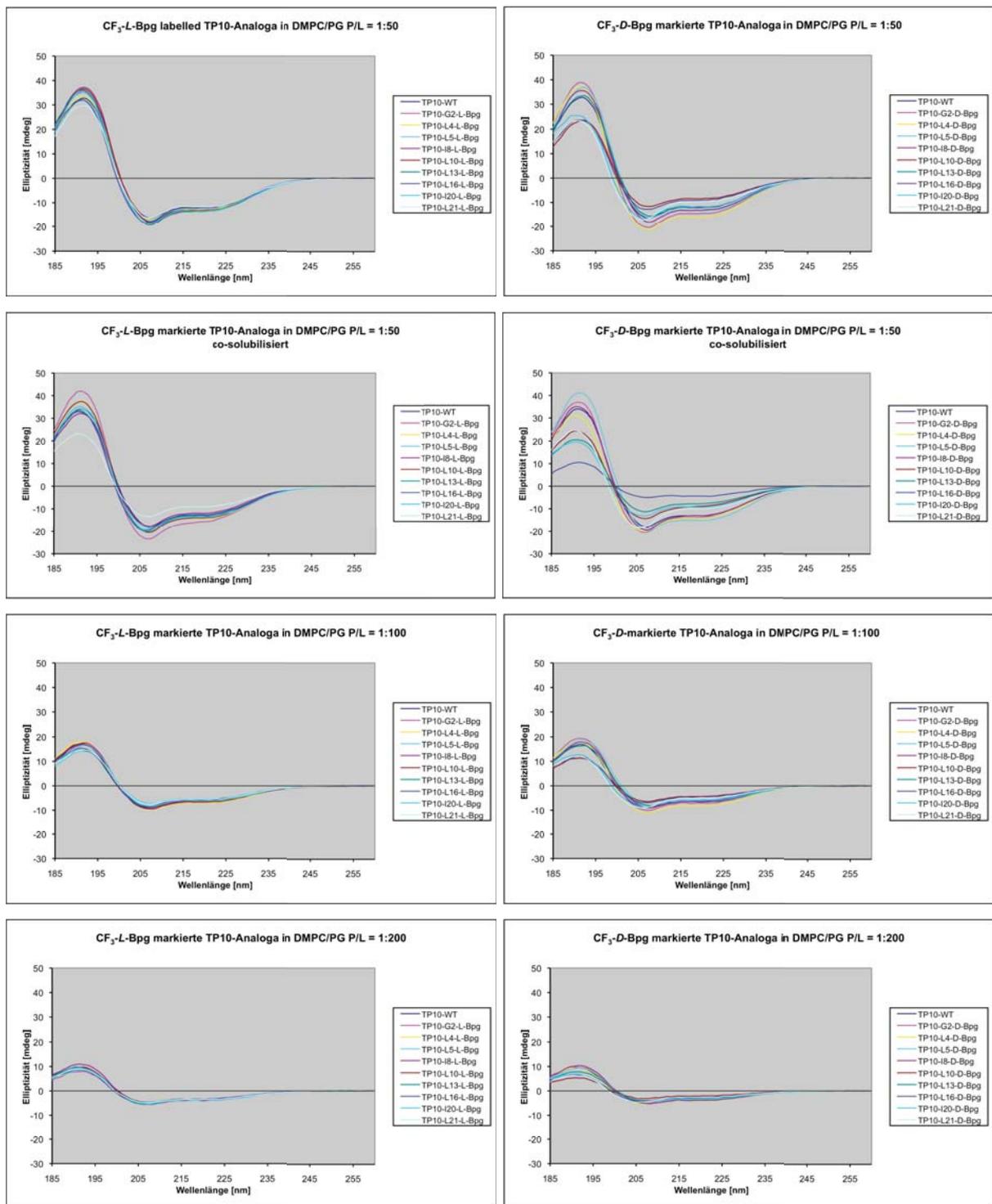


Abbildung 9.19: CD-Spektren der CF_3 -L- (links) und -D-Bpg (rechts) markierten TP10-Analoga in DMPC/DMPG (3:1)-Vesikeln mit P/L=1:50, P/L=1:50 co-solubilisiert, P/L=1:100 und P/L=1:200.

9.6. Experimenteller Teil

9.6.1. Synthese der ¹⁹F-markierten TP10-Analoga

Die Synthese der CF₃-L- und -D-Bpg markierten TP10-Analoga erfolgte im 100-μmol-Ansatz und gliederte sich in 3 Teile.



Abbildung 9.20: Aminosäuresequenz von TP10-L10-CF₃-L-Bpg. Die einzelnen Teilstücke der Synthese sind farblich hervorgehoben.

Der erste C-terminale Teil der Peptide mit Ausnahme von TP10-I20-CF₃-Bpg (nur eine Aminosäure vor der Markierung) und TP10-L21-CF₃-Bpg (markiert ist die erste Aminosäure) bis jeweils zur markierten Aminosäure (Abbildung 9.20, in blau dargestellt) wurde am multiplen Synthesizer hergestellt, anschließend eine kleine Menge Peptid abgespalten und mithilfe der LC-MS charakterisiert. Als Kupplungsreagenz wurde HBTU unter Zusatz von HOBt verwendet. Der erste Teil von TP10-I20-CF₃-Bpg wurde manuell synthetisiert und aufgrund der zu geringen Masse nicht mittels LC-MS charakterisiert. Die Kupplung der ¹⁹F-markierten Aminosäure (Abbildung 9.20, in rot dargestellt) erfolgte manuell über einen Zeitraum von mindestens 12 h unter Verwendung des Kupplungsreagenzes DIC. Nachdem die Vollständigkeit der CF₃-Bpg-Kupplung ebenfalls mittels einer Testabspaltung und LC-MS überprüft wurde, erfolgte die Synthese des dritten N-terminalen Teils (Abbildung 9.20, in schwarz dargestellt) der TP10-Analoga. Die stöchiometrischen Verhältnisse der 3 Syntheseschritte sind in Tabelle 9.3 und 9.4 und die Charakterisierung der einzelnen Teilstücke über LC-MS in den Tabellen 9.5 bis 9.8 gezeigt. Die Abspaltung der Peptide vom Harz, wie in Kapitel 3.2.1.6 beschrieben, erfolgte mittels TFA (93,5%), TIS (4%) und H₂O (2,5%) über einen Zeitraum von 4 h. Dabei wurde nur die Hälfte des Harzes mit der Abspaltungslösung versetzt. Die andere Hälfte wurde für die Reaktion mit Carboxyfluorescein eingesetzt. Eine Übersicht der Aminosäuresequenzen, molaren Massen und Retentionszeiten (LC-MS) der CF₃-L- und -D-Bpg markierten TP10 Analoga, sowie des Wildtyps, zeigen die Tabelle 9.9 und 9.10. Eine Ausnahme bildete TP10-L10-CF₃-D-Bpg, dessen Synthese am multiplen

Syntheser mehrfach fehl schlug und somit nicht das gewünschte Produkt erhalten wurde. Der 3. Teil dieses TP10-Analogons wurde deshalb manuell synthetisiert.

Tabelle 9.3: Stöchiometrische Verhältnisse für Teil 1 und 3 der Synthese.

Reagenz	n [mmol]	eq
Harz	0,1	1
Fmoc-AA-OH	0,4	4
HOBt	0,4	4
HBTU	0,4	4
DIPEA	0,8	8

Tabelle 9.4: Stöchiometrische Verhältnisse der CF₃-Bpg-Kupplung.

Reagenz	n [mmol]	eq
Harz	0,1	1
Fmoc-CF ₃ -OH	0,2	2
HOBt	0,2	2
DIC	0,5	5

Tabelle 9.5: Charakterisierung: 1. Teil der CF₃-L-Bpg markierten TP10-Analoga über LC-MS.

Peptid	Sequenz	Berechnete Masse	Gefundene Masse
TP10- G2 -CF ₃ -L-Bpg	YLLGKINLKALAALAKKIL- NH ₂	2055	2055
TP10- L4 -CF ₃ -L-Bpg	LGKINLKALAALAKKIL- NH ₂	1778	1778
TP10- L5 -CF ₃ -L-Bpg	GKINLKALAALAKKIL- NH ₂	1665	1665
TP10- I8 -CF ₃ -L-Bpg	NLKALAALAKKIL- NH ₂	1367	1367
TP10- L10 -CF ₃ -L-Bpg	KALAALAKKIL- NH ₂	1139	1139
TP10- L13 -CF ₃ -L-Bpg	AALAKKIL- NH ₂	827	827
TP10- L16 -CF ₃ -L-Bpg	AKKIL- NH ₂	572	572

Tabelle 9.6: Charakterisierung: 1. Teil der CF₃-D-Bpg markierten TP10-Analoga über LC-MS.

Peptid	Sequenz	Berechnete Masse	Gefundene Masse
TP10- G2 -CF ₃ -D-Bpg	YLLGKINLKALAALAKKIL- NH ₂	2055	2055
TP10- L4 -CF ₃ -D-Bpg	LGKINLKALAALAKKIL- NH ₂	1778	1778
TP10- L5 -CF ₃ -D-Bpg	GKINLKALAALAKKIL- NH ₂	1665	1665
TP10- I8 -CF ₃ -D-Bpg	NLKALAALAKKIL- NH ₂	1367	1367
TP10- L10 -CF ₃ -D-Bpg	KALAALAKKIL- NH ₂	1139	1139
TP10- L13 -CF ₃ -D-Bpg	AALAKKIL- NH ₂	827	827
TP10- L16 -CF ₃ -D-Bpg	AKKIL- NH ₂	572	572

Tabelle 9.7: Charakterisierung: 2. Teil der CF₃-L-Bpg markierten TP10-Analoga über LC-MS.

Peptid	Sequenz	Berechnete Masse	Gefundene Masse
TP10-G2-CF ₃ -L-Bpg	Fmoc- CF₃-L-Bpg YLLGKINLKALAALAKKIL- NH ₂	2469	2470
TP10-L4-CF ₃ -L-Bpg	Fmoc- CF₃-L-Bpg LGKINLKALAALAKKIL- NH ₂	2192	2192
TP10-L5-CF ₃ -L-Bpg	Fmoc- CF₃-L-Bpg GKINLKALAALAKKIL- NH ₂	2079	2079
TP10-I8-CF ₃ -L-Bpg	Fmoc- CF₃-L-Bpg NLKALAALAKKIL- NH ₂	1781	1782
TP10-L10-CF ₃ -L-Bpg	Fmoc- CF₃-L-Bpg KALAALAKKIL- NH ₂	1553	1552
TP10-L13-CF ₃ -L-Bpg	Fmoc- CF₃-L-Bpg AALAKKIL- NH ₂	1241	1241
TP10-L16-CF ₃ -L-Bpg	Fmoc- CF₃-L-Bpg AKKIL- NH ₂	986	986

Tabelle 9.8: Charakterisierung: 2. Teil der CF₃-D-Bpg markierten TP10-Analoga über LC-MS.

Peptid	Sequenz	Berechnete Masse	Gefundene Masse
TP10-G2-CF ₃ -D-Bpg	Fmoc- CF₃-D-Bpg YLLGKINLKALAALAKKIL- NH ₂	2469	2469
TP10-L4-CF ₃ -D-Bpg	Fmoc- CF₃-D-Bpg LGKINLKALAALAKKIL- NH ₂	2192	2192
TP10-L5-CF ₃ -D-Bpg	Fmoc- CF₃-D-Bpg GKINLKALAALAKKIL- NH ₂	2079	2079
TP10-I8-CF ₃ -D-Bpg	Fmoc- CF₃-D-Bpg NLKALAALAKKIL- NH ₂	1781	1782
TP10-L10-CF ₃ -D-Bpg	Fmoc- CF₃-D-Bpg KALAALAKKIL- NH ₂	1553	1552
TP10-L13-CF ₃ -D-Bpg	Fmoc- CF₃-D-Bpg AALAKKIL- NH ₂	1241	1241
TP10-L16-CF ₃ -D-Bpg	Fmoc- CF₃-D-Bpg AKKIL- NH ₂	986	986

Tabelle 9.9: Charakterisierung: Wildtyp und CF₃-L-Bpg markierte TP10-Analoga über LC-MS.

Peptid	Sequenz	Berechnete Masse	Gefundene Masse
TP10-WT	AYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2182	2183
TP10-G2-CF ₃ -L-Bpg	A CF₃-L-Bpg YLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2316	2316
TP10-L4-CF ₃ -L-Bpg	AGY CF₃-L-Bpg LGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2260	2260
TP10-L5-CF ₃ -L-Bpg	AGYL CF₃-L-Bpg GKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2260	2260
TP10-I8-CF ₃ -L-Bpg	AGYLLGK CF₃-L-Bpg NLKALAALAKKIL-NH ₂	2260	2260
TP10-L10-CF ₃ -L-Bpg	AGYLLGKIN CF₃-L-Bpg KALAALAKKIL-NH ₂	2260	2260
TP10-L13-CF ₃ -L-Bpg	AGYLLGKINLKA CF₃-L-Bpg AALAKKIL-NH ₂	2260	2261
TP10-L16-CF ₃ -L-Bpg	AGYLLGKINLKALAA CF₃-L-Bpg AKKIL-NH ₂	2260	2260
TP10-I20-CF ₃ -L-Bpg	AGYLLGKINLKALAALAKK CF₃-L-Bpg L-NH ₂	2260	2260
TP10-L21-CF ₃ -L-Bpg	AGYLLGKINLKALAALAKKI CF₃-L-Bpg -NH ₂	2260	2260

Tabelle 9.10: Charakterisierung: CF₃-D-Bpg markierte TP10-Analoga über LC-MS.

Peptid	Sequenz	Berechnete Masse	Gefundene Masse
TP10-G2-CF ₃ -D-Bpg	A CF₃-D-Bpg YLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2316	2316
TP10-L4-CF ₃ -D-Bpg	AGY CF₃-D-Bpg LGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2260	2260
TP10-L5-CF ₃ -D-Bpg	AGYL CF₃-D-Bpg GKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2260	2260
TP10-I8-CF ₃ -D-Bpg	AGYLLGK CF₃-D-Bpg NLKALAALAKKIL-NH ₂	2260	2260
TP10-L10-CF ₃ -D-Bpg	AGYLLGKIN CF₃-D-Bpg KALAALAKKIL-NH ₂	2260	2261
TP10-L13-CF ₃ -D-Bpg	AGYLLGKINLKA CF₃-D-Bpg AALAKKIL-NH ₂	2260	2261
TP10-L16-CF ₃ -D-Bpg	AGYLLGKINLKALAA CF₃-D-Bpg AKKIL-NH ₂	2260	2260
TP10-I20-CF ₃ -D-Bpg	AGYLLGKINLKALAALAKK CF₃-D-Bpg L-NH ₂	2260	2260
TP10-L21-CF ₃ -D-Bpg	AGYLLGKINLKALAALAKKI CF₃-D-Bpg -NH ₂	2260	2260

9.6.2 Synthese der Carboxyfluorescein-markierten TP und TP10-Analoga

9.6.2.1 Synthese der CF₃-Bpg- und N-terminal Carboxyfluorescein- markierten TP10-Analoga

Die CF₃-Bpg markierten TP10-Analoga wurden, wie in Kapitel 3.2.1.8 beschrieben, zusätzlich am N-Terminus mit Carboxyfluorescein markiert. Die stöchiometrischen Verhältnisse, bezogen auf die Harzbeladung (50 µmol), sind in Tabelle 9.11 angegeben. Die Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgte über einen Zeitraum von 2 h. Die Peptide wurden mittels LC-MS charakterisiert (Tabelle 9.12 und 9.13).

Tabelle 9.11: Stöchiometrische Verhältnisse für die Markierung mit Carboxyfluorescein.

Reagenz	n[mmol]	eq
Harz	0,05	1
5,6-Carboxyfluorescein	0,25	5
HOBt	0,25	5
DIC	0,25	5

Tabelle 9.12: Charakterisierung: CF₃-L-Bpg und CF-markierte TP10-Analoga über LC-MS.

Peptid	Sequenz	Berechnete Masse	Gefundene Masse
TP10-WT-CF	CF-AYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2540	2541
TP10-G2-CF ₃ -L-Bpg-CF	CF-A CF ₃ -L-Bpg YLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2674	2675
TP10-L4-CF ₃ -L-Bpg-CF	CF-AGY CF ₃ -L-Bpg LGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-L5-CF ₃ -L-Bpg-CF	CF-AGYL CF ₃ -L-Bpg GKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-I8-CF ₃ -L-Bpg-CF	CF-AGYLLGK CF ₃ -L-Bpg NLKALAALAKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-L10-CF ₃ -L-Bpg-CF	CF-AGYLLGKIN CF ₃ -L-Bpg KALAALAKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-L13-CF ₃ -L-Bpg-CF	CF-AGYLLGKINLKA CF ₃ -L-Bpg AALAKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-L16-CF ₃ -L-Bpg-CF	CF-AGYLLGKINLKALAA CF ₃ -L-Bpg AKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-I20-CF ₃ -L-Bpg-CF	CF-AGYLLGKINLKALAALAKK CF ₃ -L-Bpg L-NH ₂	2618	2619
TP10-L21-CF ₃ -L-Bpg-CF	CF-AGYLLGKINLKALAALAKKI CF ₃ -L-Bpg -NH ₂	2618	2619

Tabelle 9.13: Charakterisierung: CF₃-D-Bpg und CF-markierte TP10-Analoga über LC-MS.

Peptid	Sequenz	Berechnete Masse	Gefundene Masse
TP10-G2-CF ₃ -D-Bpg-CF	CF-A CF ₃ -D-Bpg YLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2674	2676
TP10-L4-CF ₃ -D-Bpg-CF	CF-AGY CF ₃ -D-Bpg LGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-L5-CF ₃ -D-Bpg-CF	CF-AGYL CF ₃ -D-Bpg GKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-I8-CF ₃ -D-Bpg-CF	CF-AGYLLGK CF ₃ -D-Bpg NLKALAALAKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-L10-CF ₃ -D-Bpg-CF	CF-AGYLLGKIN CF ₃ -D-Bpg KALAALAKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-L13-CF ₃ -D-Bpg-CF	CF-AGYLLGKINLKA CF ₃ -D-Bpg AALAKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-L16-CF ₃ -D-Bpg-CF	CF-AGYLLGKINLKALAA CF ₃ -D-Bpg AKKIL-NH ₂	2618	2619
TP10-I20-CF ₃ -D-Bpg-CF	CF-AGYLLGKINLKALAALAKK CF ₃ -D-Bpg L-NH ₂	2618	2619
TP10-L21-CF ₃ -D-Bpg-CF	CF-AGYLLGKINLKALAALAKKI CF ₃ -D-Bpg -NH ₂	2618	2619

9.6.2.2 Synthese der N-terminal, C-terminal und innerhalb der Sequenz mit Carboxyfluorescein-markierten Transportan-Analoga

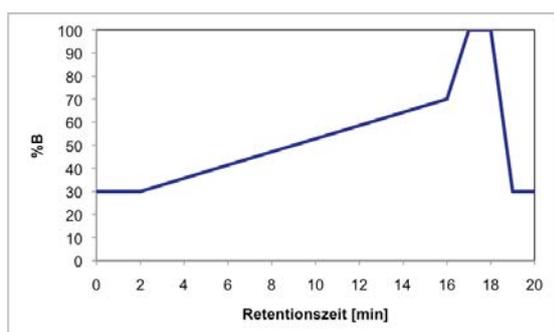
Die Synthese der Carboxyfluorescein-markierten Transportan-Analoga erfolgte am multiplen Synthesizer. Um den N- und C-Terminus mit Carboxyfluorescein markieren zu können (*CF-TP-Lys28-CF*), wurde das Peptid C-terminal um ein zusätzliches Lysin (Position 28), versehen mit einer Dde-Schutzgruppe, verlängert. Die Dde-Schutzgruppe kann mittels Hydrazin selektiv, vor der Reaktion mit Carboxyfluorescein und unter gleichzeitiger Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe des N-terminalen Glycins, abgespalten werden. Für die Carboxyfluorescein-Markierung innerhalb der Peptidsequenz und am N-Terminus (*CF-TP-Lys13-CF*) wurde an Position 13 ein Lysinrest, versehen mit einer Dde-Schutzgruppe, in die Peptidsequenz eingeführt. Für die Synthese der C-terminal (*TP-Lys28-CF*) und innerhalb der Peptidsequenz an Position 13 (*TP-Lys13-CF*) mono-Carboxyfluorescein-markierten Transportan-Analoga wurde N-terminal ein Boc-geschütztes Gly eingeführt. Somit kann die Dde-Schutzgruppe mittels Hydrazin abgespalten werden. Die Abspaltung der Peptide erfolgte über einen Zeitraum von 2 h. Die Rohpeptide wurden mittels LC-MS (Tabelle 9.14) charakterisiert.

Tabelle 9.14: Charakterisierung der CF-markierten TP-Analoga über LC-MS.

Peptid	Sequenz	Berechnete Masse	Gefundene Masse
TP-CF	CF-GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	3200	3200
CF-TP-Lys28-CF	CF-GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKILK(CF)-NH ₂	3687	3688
CF-TP-Lys13-CF	CF-GWTLNSAGYLLGK(CF)INLKALAALAKKIL-NH ₂	3558	3559
TP-Lys28-CF	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKILK(CF)-NH ₂	3326	3328
TP-Lys13-CF	GWTLNSAGYLLGK(CF)INLKALAALAKKIL-NH ₂	3200	3200

9.6.3 Aufreinigung der Rohpeptide mittels RP-HPLC

Die Aufreinigung der Rohpeptide erfolgte mittels RP-HPLC. In Abbildung 9.21 ist der Gradient für die Aufreinigung des Wildtyps gezeigt.



Gradient für die Aufreinigung des Wildtyps gezeigt.

Abbildung 9.21: Gradient zur Aufreinigung des Wildtyps.

Die verwendeten Gradienten, die Retentionszeiten der LC-MS und die

Ausbeuten der aufgereinigten Peptide sind in den Tabellen 9.15 bis 9.18 aufgelistet.

Tabelle 9.15: Gradienten für die Aufreinigung des Wildtyps und der L-Epimere.

Peptid	Retentionszeit LC-MS [min]	HPLC Gradient	m (roh) [mg]	m (rein) [mg]	Ausbeute [%]
TP10-WT	17,6	P_30-70%B_	55	17	30,9
TP10-G2-CF ₃ -L-Bpg	19,7	P_35-70%B_	70	16	22,9
TP10-L4-CF ₃ -L-Bpg	19,1	P_35-70%B_	78	15	19,2
TP10-L5-CF ₃ -L-Bpg	19	P_35-70%B_	88	22	25
TP10-I8-CF ₃ -L-Bpg	19,3	P_35-70%B_	77	21	27,3
TP10-L10-CF ₃ -L-Bpg	19,3	P_35-70%B_	100	21	21
TP10-L13-CF ₃ -L-Bpg	18,8	P_30-70%B_	64	15	23,4
TP10-L16-CF ₃ -L-Bpg	19,1	P_30-70%B_	69	17	24,6
TP10-I20-CF ₃ -L-Bpg	19,3	P_35-70%B_	70	22	31,4
TP10-L21-CF ₃ -L-Bpg	19,3	P_35-70%B_	77	22	28,6

Tabelle 9.16: Gradienten für die Aufreinigung der D-Epimere.

Peptid	Retentionszeit LC-MS [min]	HPLC Gradient	m (roh) [mg]	m (rein) [mg]	Ausbeute [%]
TP10-G2-CF ₃ -D-Bpg	18,5	P_35-70%B_	77	13	16,9
TP10-L4-CF ₃ -D-Bpg	20,2	P_35-70%B_	63	15	23,8
TP10-L5-CF ₃ -D-Bpg	18	P_35-70%B_	60	12	20
TP10-I8-CF ₃ -D-Bpg	19	P_35-70%B_	70	14	20
TP10-L13-CF ₃ -D-Bpg	17,6	P_20-60%B_	54	12	22,2
TP10-L16-CF ₃ -D-Bpg	16,9	P_20-55%B_	81	21	25,9
TP10-I20-CF ₃ -D-Bpg	18,3	P_30-65%B_	64	25	39,1
TP10-L21-CF ₃ -D-Bpg	18,1	P_30-65%B_	67	16	23,9

*Bei TP10-L10-CF₃-D-Bpg wurde auf bereits vorhandene Bestände zurückgegriffen

Tabelle 9.17: Gradienten für den CF-markierten Wildtyps und die CF- und CF₃-L-Bpg markierten TP10-Analoga.

Peptid	Retentionszeit LC-MS [min]	HPLC Gradient	m (roh) [mg]	m (rein) [mg]	Ausbeute [%]
TP10-WT-CF	21,5	P_40-90%B_	40	11	27,5
TP10-G2-CF ₃ -L-Bpg -CF	22,6	P_40-90%B_	40	7	17,5
TP10-L4-CF ₃ -L-Bpg -CF	21,9	P_40-90%B_	40	10	25,0
TP10-L5-CF ₃ -L-Bpg -CF	21,6	P_40-90%B_	40	8	20,0
TP10-I8-CF ₃ -L-Bpg -CF	21,7	P_40-90%B_	40	10	25,0
TP10-L10-CF ₃ -L-Bpg -CF	22,0	P_40-90%B_	35	13	37,1
TP10-L13-CF ₃ -L-Bpg -CF	21,5	P_40-90%B_	33	6	18,2
TP10-L16-CF ₃ -L-Bpg -CF	21,9	P_40-90%B_	35	6	17,1
TP10-I20-CF ₃ -L-Bpg -CF	22,0	P_40-90%B_	35	9	25,7
TP10-L21-CF ₃ -L-Bpg -CF	22,0	P_40-90%B_	35	8	27,5

Tabelle 9.18: Gradienten für die CF- und CF₃-D-Bpg-CF markierten TP10-Analoga.

Peptid	Retentionszeit LC-MS [min]	HPLC Gradient	m (roh) [mg]	m (rein) [mg]	Ausbeute [%]
TP10-G2-CF ₃ -D-Bpg-CF	21,9	P_40-90%B_	35	4	11,4
TP10-L4-CF ₃ -D-Bpg-CF	21,9	P_40-90%B_	35	8	22,9
TP10-L5-CF ₃ -D-Bpg-CF	21,3	P_40-90%B_	35	11	31,4
TP10-I8-CF ₃ -D-Bpg-CF	21,0	P_40-90%B_	35	8	22,9
TP10-L10-CF ₃ -D-Bpg-CF	20,7	P_40-90%B_	45	14	31,1
TP10-L13-CF ₃ -D-Bpg-CF	19,8	P_40-90%B_	35	6	17,1
TP10-L16-CF ₃ -D-Bpg-CF	19,4	P_40-90%B_	35	11	31,4
TP10-I20-CF ₃ -D-Bpg-CF	20,6	P_40-90%B_	35	12	34,3
TP10-L21-CF ₃ -D-Bpg-CF	20,4	P_40-90%B_	30	8	26,7

Für die Berechnung der einzuwiegenden Mengen an Peptid wurden zur entsprechenden Molmasse jeweils 5 HCl-Moleküle (ein Molekül HCl pro positive Ladung) hinzugezählt.

9.6.4 Vorbereitung der CD-Proben in Lipidvesikeln

9.6.4.1 CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga

Von der Lipidmischung (DMPC/DMPG 3:1) wurde eine wässrige Stammlösung der Konzentration $c_{\text{Stammlsg.}}(\text{Lipid})=8,975$ mg/ml und von den Peptiden jeweils eine Stammlösung mit $c_{\text{Stammlsg.}}(\text{Peptid})=0,5$ mg/ml hergestellt. Die entsprechenden Volumina der Stammlösungen, die für die CD-Proben mit verschiedenen Peptid-zu-Lipid-Verhältnissen und einem Probenvolumen von 200 μ l vermischt wurden, zeigen Tabelle 9.19 bis 9.21.

Tabelle 9.19: CF₃-Bpg-markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der CD-Proben mit P/L=1:50.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]	V [μ l]	V (PB) [μ l]	c [mg/ml]
Lipidmischung	680,67	0,3000	0,0004	33,5	-	1,5
TP10-WT	2365	0,0208	8,8148E-06	41,7	124,8	0,10
TP10-CF₃-Bpg (Leu/Ile)	2442	0,0215	8,8148E-06	43,1	123,5	0,11
TP10-CF₃-Bpg (Gly)	2498	0,0220	8,8148E-06	44,0	122,5	0,11
DMPC	677,94	0,2241	0,0003	-	-	-
DMPG	688,85	0,0759	0,0001	-	-	-

Tabelle 9.20: CF₃-Bpg-markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der CD-Proben mit P/L=1:100.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]	V [μl]	V (PB) [μl]	c [mg/ml]
Lipidmischung	680,67	0,3000	0,0004	33,5	-	1,5
TP10-WT	2365	0,0104	4,4074E-06	20,8	145,7	0,052
TP10-CF ₃ -Bpg (Leu/Ile)	2442	0,0108	4,4074E-06	21,5	145,0	0,054
TP10-CF ₃ -Bpg (Gly)	2498	0,0110	4,4074E-06	22,0	144,5	0,055
DMPC	677,94	0,2241	0,0003	-	-	-
DMPG	688,85	0,0759	0,0001	-	-	-

Tabelle 9.21: CF₃-Bpg-markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der CD-Proben mit P/L=1:200.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]	V [μl]	V (PB) [μl]	c [mg/ml]
Lipidmischung	680,67	0,3000	0,0004	33,5	-	1,5
TP10-WT	2365	0,0052	2,2037E-06	10,4	156,1	0,026
TP10-CF ₃ -Bpg (Leu/Ile)	2442	0,0054	2,2037E-06	10,8	155,7	0,027
TP10-CF ₃ -Bpg (Gly)	2498	0,0055	2,2037E-06	11,0	155,5	0,028
DMPC	677,94	0,2241	0,0003	-	-	-
DMPG	688,85	0,0759	0,0001	-	-	-

9.6.4.2 Carboxyfluorescein- und CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga

Von der Lipidmischung (DMPC/DMPG 3:1) wurde eine wässrige Stammlösung der Konzentration $c_{\text{Stammlsg.}}(\text{Lipid})=6,019$ mg/ml und von den Peptiden jeweils eine Stammlösung mit $c_{\text{Stammlsg.}}(\text{Peptid})=0,5$ mg/ml hergestellt. Die entsprechenden Volumina der Stammlösungen, die für die CD-Proben (200 μl Probenvolumen) vermischt wurden, zeigt Tabelle 9.22.

Tabelle 9.22: CF- und CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der CD-Proben mit P/L=1:50.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]	V [μl]	V (PB) [μl]	c [mg/ml]
Lipidmischung	680,67	0,3000	0,0004	50,1	-	1,5
TP10-WT-CF	2722	0,0240	8,815E-06	48,0	101,9	0,120
TP10-CF ₃ -Bpg-CF (Leu/Ile)	2442	0,0247	8,815E-06	49,4	100,6	0,124
TP10-CF ₃ -Bpg-CF (Gly)	2498	0,0252	8,815E-06	50,4	99,6	0,126
DMPC	677,94	0,2241	0,0003	-	-	-
DMPG	688,85	0,0759	0,0001	-	-	-

9.6.4.3 Carboxyfluorescein-markierte Transportan-Analoga

Von der Lipidmischung (DMPC/DMPG 3:1) wurde eine wässrige Stammlösung der Konzentration $c_{\text{Stammlsg.}}(\text{Lipid})=6,019$ mg/ml und von den Peptiden jeweils eine

Stammlösung mit $c_{\text{Stammlsg.}}(\text{Peptid})=0,5$ mg/ml hergestellt. Die entsprechenden Volumina der Stammlösungen, die für die CD-Proben (200 μl Probenvolumen) zusammen vermischt wurden, zeigt Tabelle 9.23.

Tabelle 9.23: CF-markierte Transportan-Analoga: Vorbereitung der CD-Proben mit P/L=1:50.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]	V [μl]	V (PB) [μl]	c [mg/ml]
Lipidmischung	680,67	0,3000	0,0004	50,1	-	1,5
TP-WT-CF	3382	0,0298	8,8149E-06	59,6	90,3	0,149
CF-TP-Lys28-CF	3869	0,0341	8,8149E-06	68,2	81,7	0,171
CF-TP-Lys13-CF	3740	0,0330	8,8149E-06	65,9	84,0	0,165
TP-Lys28-CF	3508	0,0309	8,8149E-06	61,8	88,1	0,155
TP-Lys13-CF	3282	0,0298	8,8149E-06	59,6	90,3	0,149
DMPC	677,94	0,2241	0,0003	-	-	-
DMPG	688,85	0,0759	0,0001	-	-	-

9.6.5 Vorbereitung der OCD-Proben

9.6.5.1 CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga

Von der Lipidmischung (DMPC/DMPG 3:1) wurde eine Stammlösung in Chloroform der Konzentration 10,03 mg/ml (P/L=1:50), 7,472 mg/ml (P/L=1:100) oder 25 mg/ml (P/L=1:200) und von den Peptiden jeweils eine Stammlösung in Methanol der Konzentration 0,5 mg/ml hergestellt. Die entsprechenden Volumina (Tabelle 9.24 bis 9.26) der Stammlösungen wurden vermischt, mit Chloroform aufgefüllt (200 μl Probenvolumen) und jeweils 80 μl in 20 μl -Portionen auf die Quarzglasplättchen aufgetragen.

Tabelle 9.24: CF₃-Bpg-markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der OCD-Proben mit P/L=1:50.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]	V [μl]	V (CHCl ₃) [μl]	m (pro GP) [μg]
Lipidmischung	680,67	0,2500	0,0003	25	-	100
TP10-WT	2365	0,0174	7,346E-06	34,7	140,3	7,3
TP10-CF₃-Bpg (Leu/Ile)	2442	0,0179	7,346E-06	35,9	139,1	7,3
TP10-CF₃-Bpg (Gly)	2498	0,0183	7,346E-06	36,7	138,3	7,3
DMPC	677,94	0,1867	0,0003	-	-	-
DMPG	688,85	0,0633	0,0001	-	-	-

Tabelle 9.25: CF₃-Bpg-markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der OCD-Proben mit P/L=1:100.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]	V [μl]	V (CHCl ₃) [μl]	m (pro GP) [μg]
Lipidmischung	680,67	0,5000	0,0007	66,6	-	200
TP10-WT	2365	0,0174	7,346E-06	34,7	97,3	7,3
TP10-CF₃-Bpg (Leu/Ile)	2442	0,0179	7,346E-06	35,9	97,6	7,3
TP10-CF₃-Bpg (Gly)	2498	0,0183	7,346E-06	36,7	96,7	7,3
DMPC	677,94	0,3735	0,0006	-	-	-
DMPG	688,85	0,1265	0,0002	-	-	-

Tabelle 9.26: CF₃-Bpg-markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der OCD-Proben mit P/L=1:200.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]	V [μl]	V (CHCl ₃) [μl]	m (pro GP) [μg]
Lipidmischung	680,67	1,0000	0,0015	40,0	-	400
TP10-WT	2365	0,0174	7,346E-06	34,7	125,3	7,3
TP10-CF₃-Bpg (Leu/Ile)	2442	0,0179	7,346E-06	35,9	124,1	7,3
TP10-CF₃-Bpg (Gly)	2498	0,0183	7,346E-06	36,7	123,3	7,3
DMPC	677,94	0,7470	0,0011	-	-	-
DMPG	688,85	0,2530	0,0004	-	-	-

9.6.5.2 Carboxyfluorescein- und CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga

Von der Lipidmischung (DMPC/DMPG 3:1) wurde eine Stammlösung in Chloroform der Konzentration 3,75 mg/ml und von den Peptiden jeweils eine Stammlösung in Methanol der Konzentration 0,5 mg/ml hergestellt. Die entsprechenden Volumina (Tabelle 9.27) der Stammlösungen wurden vermischt, mit Chloroform aufgefüllt (200 μl Probenvolumen) und jeweils 80 μl in 20 μl-Portionen auf die Quarzglasplättchen aufgetragen.

Tabelle 9.27: CF- und CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der OCD-Proben mit P/L=1:50.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]	V [μl]	V (CHCl ₃) [μl]	m (pro GP) [μg]
Lipidmischung	680,67	0,2500	0,0004	66,2	-	100
TP10-WT-CF	2722	0,0200	7,346E-06	40,0	93,8	8,2
TP10-CF₃-Bpg-CF (Leu/Ile)	2800	0,0206	7,346E-06	41,1	92,6	8,2
TP10-CF₃-Bpg-CF (Gly)	2856	0,0210	7,346E-06	42,07	91,8	8,2
DMPC	677,94	0,1867	0,0003	-	-	-
DMPG	688,85	0,0633	0,0001	-	-	-

9.6.5.3 Carboxyfluorescein-markierte Transportan-Analoga

Von der Lipidmischung (DMPC/DMPG 3:1) wurde eine Stammlösung in Chloroform der Konzentration 2,519 mg/ml und von den Peptiden jeweils eine Stammlösung in Methanol der Konzentration 0,5 mg/ml hergestellt. Die entsprechenden Volumina (Tabelle 9.28) der Stammlösungen wurden vermischt, mit Chloroform aufgefüllt (200 µl Probenvolumen) und jeweils 80 µl in 20 µl-Portionen auf die Quarzglasplättchen aufgetragen.

Tabelle 9.28: CF-markierte Transportan-Analoga: Vorbereitung der OCD-Proben mit P/L=1:50.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]	V [µl]	V (CHCl ₃) [µl]	m (pro GP) [µg]
Lipidmischung	680,67	0,2500	0,0004	98,7	-	100
TP-WT-CF	3382	0,0248	7,3457E-06	49,7	51,7	9,9
CF-TP-Lys28-CF	3869	0,0284	7,3457E-06	56,8	44,9	9,9
CF-TP-Lys13-CF	3740	0,0275	7,3457E-06	54,9	46,4	9,9
TP-Lys28-CF	3558	0,0258	7,3457E-06	51,5	49,8	9,9
TP-Lys13-CF	3282	0,0248	7,3457E-06	49,7	51,7	9,9
DMPC	677,94	0,1867	0,0003	-	-	-
DMPG	688,85	0,0633	0,0001	-	-	-

9.6.6 Vorbereitung der NMR-Proben

9.6.6.1 CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga

In Tabelle 9.29 bis 9.32 sind die für die Vorbereitung der NMR-Proben eingewogenen Mengen an Peptid und Lipid für verschiedene Peptid-zu-Lipid-Verhältnisse aufgelistet.

Tabelle 9.29: CF₃-Bpg-markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der NMR-Proben mit P/L=1:50.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]
Lipidmischung	680,67	8,0000	0,0118
TP10-CF₃-Bpg (Leu/Ile)	2442	0,5740	0,0002
TP10-CF₃-Bpg (Gly)	2498	0,5872	0,0002
DMPC	677,94	5,9760	0,0088
DMPG	688,85	2,0240	0,0029

Tabelle 9.30: CF₃-Bpg-markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der NMR-Proben mit P/L=1:200.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]
Lipidmischung	680,67	14,1667	0,0208
TP10-CF₃-Bpg (Leu/Ile)	2442	0,2541	0,0001
TP10-CF₃-Bpg (Gly)	2498	0,2600	0,0001
DMPC	677,94	10,5824	0,0156
DMPG	688,85	3,5842	0,0052

Tabelle 9.31: CF₃-Bpg-markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der NMR-Proben mit P/L=1:400.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]
Lipidmischung	680,67	14,1667	0,0208
TP10-CF₃-Bpg (Leu/Ile)	2442	0,1271	0,0001
TP10-CF₃-Bpg (Gly)	2498	0,1300	0,0001
DMPC	677,94	10,5824	0,0156
DMPG	688,85	3,5842	0,0052

Tabelle 9.32: CF₃-Bpg-markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der NMR-Proben mit P/L=1:800.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]
Lipidmischung	680,67	14,1667	0,0208
TP10-CF₃-Bpg (Leu/Ile)	2442	0,0635	0,00003
TP10-CF₃-Bpg (Gly)	2498	0,0650	0,00003
DMPC	677,94	10,5824	0,0156
DMPG	688,85	3,5842	0,0052

9.6.6.2 Carboxyfluorescein- und CF₃-Bpg markierte TP10-Analoga

In Tabelle 9.33 sind die für die Vorbereitung der NMR-Proben eingewogenen Mengen an Peptid und Lipid für ein Peptid-zu-Lipid-Verhältnis von 1:50 aufgelistet.

Tabelle 9.33: CF- und CF₃-Bpg-markierte TP10-Analoga: Vorbereitung der NMR-Proben mit P/L=1:200.

	M [g/mol]	m [mg]	n [mmol]
Lipidmischung	680,67	14,1667	0,0208
TP10-CF₃-Bpg-CF (Leu/Ile)	2800	0,2914	0,0001
TP10-CF₃-Bpg-CF (Gly)	2856	0,22972	0,0001
DMPC	677,94	10,5824	0,0156
DMPG	688,85	3,5842	0,0052

Publikationsliste

Susanne Fanghänel, Synthese von ^{19}F -markierten Analoga des antibiotischen Peptaibols Harzianin für NMR-Strukturuntersuchungen, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (2007)

S. Fanghänel, P. Wadhvani, E. Strandberg, S. Ehni, W. Verdurmen, R. Brock and A. S. Ulrich, Structure analysis of the cell-penetrating peptide transportan-10 by solid-state ^{19}F -NMR spectroscopy, in Bearbeitung

Tagungsbeiträge

„Structure analysis of the cell-penetrating peptide transportan-10 by solid-state ^{19}F -NMR and oriented circular dichroism“, S. Fanghänel, P. Wadhvani, E. Strandberg, S. Ehni, A. S. Ulrich, *455th WE-Heraeus-Seminar on Biophysics of Membrane-Active Peptides* 2010, Bad Honnef

Lebenslauf

Susanne Fanghänel

*15.11.1982, Zwickau

Rathausplatz 4
76356 Weingarten
Tel.: 07244/608614

Familienstand

ledig, keine Kinder

Schule

08/1989 - 11/1991

Grundschule Kleinwaltersdorf (Kreis Freiberg)

11/1991 - 07/1993

Grundschule Leopoldshafen (Kreis Karlsruhe)

09/1993 - 04/2000

Gymnasium Neureut (Karlsruhe)

04/2000 - 06/2002

Kreuzgymnasium Dresden

Abschluss: Abitur

Note: sehr gut (1.0)

Studium

10/2002 - 09/2007

Chemiestudium, Universität Karlsruhe

(heute: Karlsruhe Institute of Technology, KIT)

Schwerpunkt: Biochemie

Abschluss des Diplom-Studiengangs Chemie

Prüfung und Anfertigung der Diplomarbeit

Thema der Diplomarbeit:

"Synthese von ¹⁹F-markierten Analoga des antibiotischen Peptaibols Harzianin für NMR-Strukturuntersuchungen"

Note: gut (1.7)

Promotion

11/2007 - 04/2011

Universität Karlsruhe

(heute: Karlsruhe Institute of Technology, KIT)

Thema der Dissertation:

"Strukturuntersuchungen des zellpenetrierenden Peptids Transportan-10 mittels ¹⁹F-Festkörper-NMR- und orientierter Zirkulardichroismus- Spektroskopie "