

- [6] I. Weissbuch, R. Popovitz-Biro, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1995**, *51*, 115.
- [7] Bei maßgeschneiderten Additiven ist die stereospezifische Adsorption an bestimmten Kristallflächen auch mit Methoden nachgewiesen worden, mit denen sich zeigen ließ, daß die schließlich im Kristall eingeschlossenen Additive kristallographisch passende Positionen besetzen und dies nur durch die stereospezifische Adsorption an der wachsenden Kristallfläche möglich ist. Zu diesen Methoden zählen die Licht-Doppelbrechung [8], die Erzeugung der Oberschwingung (second harmonic generation), die Festkörperphotochemie sowie die Röntgen- und die Neutronenbeugung an großen Kristallen [5, 6].
- [8] J. M. McBride, S. B. Bertman, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 342; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 330.
- [9] H. Cai, A. C. Hillier, K. R. Franklin, C. C. Nunn, M. D. Ward, *Science* **1994**, *266*, 1551.
- [10] I. K. Robinson, D. J. Tweet, *Rep. Prog. Phys.* **1992**, *55*, 599.
- [11] J. Als-Nielsen, D. Jacquemain, K. Kjaer, F. Leveiller, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Phys. Rep.* **1994**, *246*, 251.
- [12] R. P. Chiarello, N. C. Sturchio, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1994**, *58*, 5633.
- [13] J.-P. Legros, Å. Kvick, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1980**, *36*, 3052.
- [14] $\{hkl\}$ steht für alle symmetrieverknüpften Flächen, (hkl) hingegen repräsentiert nur die Fläche mit den angegebenen h -, k - und l -Werten; z. B. steht $\{010\}$ für die (010) - und die $(0\bar{1}0)$ -Fläche.
- [15] Es wurde Röntgen-Strahlung der Wellenlänge 1.31 \AA verwendet. Für die Messung der nichtspekulären CTRs ist die Oberfläche vertikal angeordnet und wurde mit Hilfe eines Lasers so ausgerichtet, daß die Oberflächennormale parallel zur ω -Achse des Diffraktometers verlief, was einen konstanten Einfallwinkel während der Experimente sichersetzte. Dieser Einfallwinkel wurde auf 0.2° eingestellt. Die CTR-Messungen wurden so durchgeführt, daß ein Scan um die Oberflächennormale bei jeder Impulsübertragung senkrecht zur Oberfläche ausgeführt wurde, um die integrierte Intensität zu erhalten. Für die spekulären Reflexe wurde die Probe neu aufgesetzt, wobei die Oberfläche nahezu horizontal ausgerichtet wurde, um die vertikale Beugungsebene beizubehalten zu können. Der Scan entlang der spekulären stabsförmigen Intensitätsverteilung wurde an der Beugungskante durchgeführt. Die Hintergrundstrahlung wurde etwas neben der spekulären Strahlung bestimmt (Veränderung von ω). Dieses Verfahren wurde gewählt, um den durch Strahlung verursachten Schaden zu verringern, der bei der spekulären Reflexion wegen des größeren im Kristall zurückgelegten Wegs viel größer als bei der nichtspekulären ist. Es wurden Lorentz- und Polarisationskorrekturen sowie Korrekturen für Variationen in der effektiven Fläche in die Intensitäten eingeführt, um sowohl für spekuläre als auch für nichtspekuläre CTRs Strukturfaktoren zu erhalten.
- [16] a) I. K. Robinson, *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 3830; b) S. R. Andrews, R. A. Cowley, *J. Phys. C* **1985**, *18*, 6247.
- [17] D. Gidalevitz, R. Feidenhans'l, S. Matlis, D. M. Smilgies, M. J. Christensen, L. Leiserowitz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 991; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, Nr. 9.
- [18] Das Signal bei $k = 3.15$ in den $(0k0)$ -CTRs der (010) - und der $(0\bar{1}0)$ -Fläche (Abb. 3 oben, rote Rhomben) entspricht dem (004) -Reflex von (S) -Methionin. Die plättchenartigen Methioninkristalle wurden sowohl auf die (010) - als auch auf die $(0\bar{1}0)$ -Fläche von α -Glycin abgelagert, aber nicht stereospezifisch. In einem anderen Experiment, bei dem α -Glycinkristalle in Gegenwart von (S) -Methionin unter ähnlichen Bedingungen gezüchtet wurden, konnten wir sehr kleine (ca. 0.1 mm) Methioninplättchen beobachten, die statistisch auf der Glycinoberfläche und am Boden des Gefäßes verteilt waren. Sie ließen sich leicht entfernen, konnten also nicht strukturell mit der Glycinoberfläche verbunden sein. Diese Methioninkristallite tragen nicht zu den nichtspekulären Beugungsmustern bei.
- [19] Wenn die relativen Besetzungen um mehr als 0.1 von den besten Werten entfernt gewählt wurden, wurde die Anpassung wesentlich schlechter.
- [20] Die möglichen Konformationen der an die Glycin- $(0\bar{1}0)$ -Oberfläche gebundenen (S) -Methioninmoleküle wurden durch Energieminimierungsrechnungen ermittelt [21]. Dabei wurden für eine Schicht aus (S) -Methioninmolekülen, die über ein Pseudoinversionszentrum mit der darunterliegenden Glycinschicht verknüpft sind, als Funktion der $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}$ - und der $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$ -Torsionswinkel sechs mögliche Methioninkonformationen erhalten. Die Strukturfaktoren wurden mit ihnen in unterschiedlichen Kombinationen und für unterschiedliche Besetzungszahlen berechnet. Die beste Anpassung an die Meßdaten wurde unter Verwendung von zwei Molekükonformationen – A (*trans-gauche*) und B (*gauche-gauche*) – erhalten, die denen in (S) - und (R,S) -Methioninkristallen [22] ähneln, und für Besetzungszahlen von 0.5 bzw. 0.3.
- [21] Die Gitterenergien und die Energien der Molekülpakungen wurden mit Cerius², einem Molecular-Modeling-Softwarepaket für Materialforschung von BIOSYM/Molecular Simulations, Cambridge, Großbritannien, berechnet.
- [22] K. Torii, Y. Itaka, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1973**, *29*, 2799.
- [23] Das A:B-Besetzungsverhältnis von Methionin wurde bei 0.5:0.3 [20] festgehalten. Die beiden Konformere scheinen in getrennten Domänen gepackt zu sein: Modelle, bei denen sie sich innerhalb derselben Kristalldomäne befanden (inkohärente Addition), ergaben eine schlechtere Übereinstimmung mit den experimentellen Daten als das Modell, bei dem sie in getrennten Domänen vorliegen (inhomogene Addition).
- [24] Die pseudozeizählige Symmetrie von inkommensurablen H-Brücken-verknüpften Doppelschichten ist auch zur Erklärung der Packungsfehlordnung in racemischem Valin [25] und der Bildung von α -Glycin-Zwillingskristallen in Gegenwart von (S) -Leucin [26] – wenn die Leucinkonzentration größer als 8 mg mL^{-1} war – herangezogen worden. Im letztgenannten System liegen die zwei Doppelschichten, von denen man annimmt, daß sie die Verzwilligung bedingen, in der zentralen Ebene des Kristalls und bestehen aus (S) -Leucin/Glycin-Heterodimeren in einer Anordnung, die der der (S) -Methionin/Glycin-Heterodoppelschicht (Abb. 4B) ähnelt.
- [25] S. Grayer Wolf, Z. Berkovich-Yellin, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1990**, *86*, 3.
- [26] L. Li, D. Lechuga-Ballesteros, B. A. Szkudlarek, N. Rodriguez-Hornedo, *J. Coll. Interface Sci.* **1994**, *168*, 8.
- [27] Die an der (010) -Fläche erhaltenen GID-Ergebnisse stehen nicht im Gegensatz zu den experimentellen Beobachtungen, daß die Glycin- $\{010\}$ -Flächen bei Verwendung enantiomerenreiner α -Aminosäureadditive stereospezifisch inhibiert werden. Unsere Experimente sind mit gespaltenen Glycinkristallen durchgeführt worden, und die Konzentration des α -Aminosäureadditivs lag bei 9 Gew.-%.

Selektive Inhibition von Interleukin-1 durch Antisense-Peptide

Joseph W. Davids, Ali El-Bakri, Jonathan Heal, Gary Christie, Gareth W. Roberts, John G. Raynes und Andrew D. Miller*

Die DNA-Doppelhelix besteht aus zwei komplementären Oligonucleotidsträngen. Bisher ging man davon aus, daß der plus-Strang (sense strand) den genetischen Code enthält und daß der minus-Strang (antisense strand) als Matrize zur Vervielfältigung dieses Codes dient. Die Beziehung zwischen minus- und plus-Strang scheint jedoch weitaus komplexer zu sein. Blalock und Smith entdeckten 1984, daß bei der Transkription des DNA-minus-Strangs „Antisense-Peptide“ entstehen, die hinsichtlich Hydrophilie und Hydrophobie komplementär zu den Peptiden sind, die durch den entsprechenden plus-Strang codiert werden.^[1] Von da an gab es immer wieder Hinweise, daß Sense- und Antisense-Peptide spezifisch miteinander wechselwirken, was wichtige biologische Konsequenzen hat.^[2] Die physikalischen Grundlagen dieser Wechselwirkung sind noch nicht im einzelnen geklärt, sie scheinen jedoch mit den gegensätzlichen Eigenschaften der Peptide bezüglich Hydrophilie und -phobie zusammenzuhängen.^[3–5] Wir berichten hier darüber, wie man diese spezifische Wechselwirkung zwischen Antisense- und Sense-Peptiden zur Hemmung von Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) nutzen kann. Mit der von uns beschriebenen

[*] Dr. A. D. Miller, Dr. J. W. Davids, J. Heal
Imperial College of Science, Technology & Medicine
Department of Chemistry
South Kensington, GB-London SW7 2AY (Großbritannien)
Telefax: Int. +171/594-5803
E-mail: a.miller@ic.ac.uk

A. El-Bakri, Dr. J. G. Raynes
Department of Clinical Sciences
London School of Hygiene and Tropical Medicine
GB-London (Großbritannien)
Dr. G. Christie, Dr. G. W. Roberts
SmithKline Beecham Pharmaceuticals
New Frontiers Science Park
Harlow, GB-Essex (Großbritannien)

[**] Antisense Peptide Chemistry, 1. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Mental Health Foundation und dem Medical Research Council unterstützt. Wir danken der Firma Immunex für löslichen humanen IL-1-Rezeptor vom Typ II und Prof. D. Boraschi für den BhrD2-Antikörper.

Methode könnten sich mit gewissen Einschränkungen eine Reihe von Protein- und Peptidinhibitoren entwerfen lassen.

IL-1 α und IL-1 β sind zwei Formen von Interleukin-1 (IL-1). Sie spielen bei Immunreaktionen, während der Blutbildung und bei Entzündungsprozessen eine zentrale Rolle; Störungen im IL-1-Haushalt können zu rheumatischer Arthritis und septischem Schock führen,^[6] aber auch zu neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimerschen Krankheit.^[7] IL-1 α und IL-1 β haben fast die gleiche Tertiärstruktur,^[8–10] binden an die gleichen Oberflächenrezeptoren der Zelle (IL-1-RI, IL-1-RII) und rufen dabei mit wenigen Ausnahmen ähnliche Reaktionen hervor.^[11, 12] An der Kontrolle der IL-1-Aktivität in einem Organismus ist ein weiteres Interleukin 1 beteiligt: der Rezeptorantagonist IL-1ra.^[13–15] Er bindet kompetitiv an die IL-1-Rezeptoren der Zelloberfläche, jedoch ohne eine vergleichbare biologische Reaktion hervorzurufen.^[16] Jüngste Versuche, die Wirkung von Interleukin-1 zu hemmen, basierten auf rekombinantem IL-1ra sowie löslichen Rezeptorantagonisten und Pyridylimidazol-Derivaten.^[17, 18]

Unser erster Schritt auf der Suche nach Inhibitoren für IL-1 α und IL-1 β war, einen Abschnitt zu finden, den beide Interleukin-1-Formen aufweisen und der für ihre Funktion wichtig ist. Dann galt es Antisense-Peptide zu entwerfen, die an diesen Abschnitt binden. Zu diesem Zweck betrachten wir die Kristallstrukturen von IL-1 α , IL-1 β und IL-1ra^[9, 10, 14] sowie Ergebnisse neuerer Mutationsstudien, die an allen drei Proteinen durchgeführt worden waren.^[19] Legt man die Strukturen von IL-1 β und IL-1ra übereinander (Abb. 1 a), so fällt auf, daß IL-1 β in der Nähe der Bindungsstelle eine Wölbung aus β -Schleifen besitzt, die dem Antagonisten IL-1ra fehlt. Beim IL-1 α fanden wir an der gleichen Stelle eine ähnliche „ β -Wölbung“ (nicht abgebildet). Tatsächlich scheint sich die Tertiärstruktur von IL-1 α und IL-1 β nur durch besagte Wölbung von der Struktur des Antagonisten IL-1ra zu unterscheiden. Die Abwesenheit des Sekundärstrukturelements spiegelt sich auch in der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) wider: IL-1ra besitzt keinen Bereich, der dem der β -Wölbung von IL-1 β (Aminosäure 48–54) oder IL-1 α (Aminosäure 60–66) entspricht (Abb. 1 b). Die Strukturunterschiede ließen vermuten, daß die β -Wölbungen von IL-1 β und IL-1 α vielversprechende Ziele für Antisense-Peptidinhibitoren sein könnten. Gestützt wurde diese Vermutung durch die Beobachtung, daß diese β -Wölbungen bei der Rezeptorstimulation mitunter eine wichtige Rolle spielen.^[20] Außerdem hatten Boraschi et al. über ein Peptid berichtet, das die Sequenz der β -Wölbung von IL-1 β hat und einige ähnliche biologische Effekte zeigt wie IL-1.^[21] Die β -Wölbung von IL-1 β ist ausgeprägter als die von IL-1 α . Daher erwarteten wir, daß Inhibitoren, die mit diesem Abschnitt wechselwirken, IL-1 β effektiver hemmen würden als IL-1 α . Folglich entwarfen wir Antisense-Peptide, deren Hauptziel die im folgenden als Boraschi-Schleife bezeichnete β -Wölbung war.

Als „Bauplan“ für die Antisense-Peptide diente der entsprechende DNA-Bereich von IL-1 β .^[22] Dazu suchten wir die DNA-Sequenz, die die Boraschi-Schleife codiert, leiteten den plus-Strang von ihr ab und übersetzten diese von 5' nach 3' in korrespondierende Aminosäureketten, beginnend mit der N-terminalen Aminosäure (Abb. 1 c). Auf diese Weise synthetisierten wir zwei Peptide: Antisense-Peptid 1 mit der Sequenz N-VITFFSL-C ist komplementär zum Ausschnitt N-QGEESND-C der Boraschi-Schleife (IL-1 β -Aminosäure 48–54), Antisense-Peptid 2 ist C-terminal um eine Aminosäure verkürzt (N-VITFFS-C, IL-1 β -Aminosäure 49–54). Beide Peptide lagen nach der Synthese als Säureamid vor. Das Kyte-Doolittle-Hydrophatieprofil von 1 (Abb. 1 d) zeigt den entgegengesetzten Verlauf wie das Profil des Boraschi-Schleifen-Ausschnitts N-

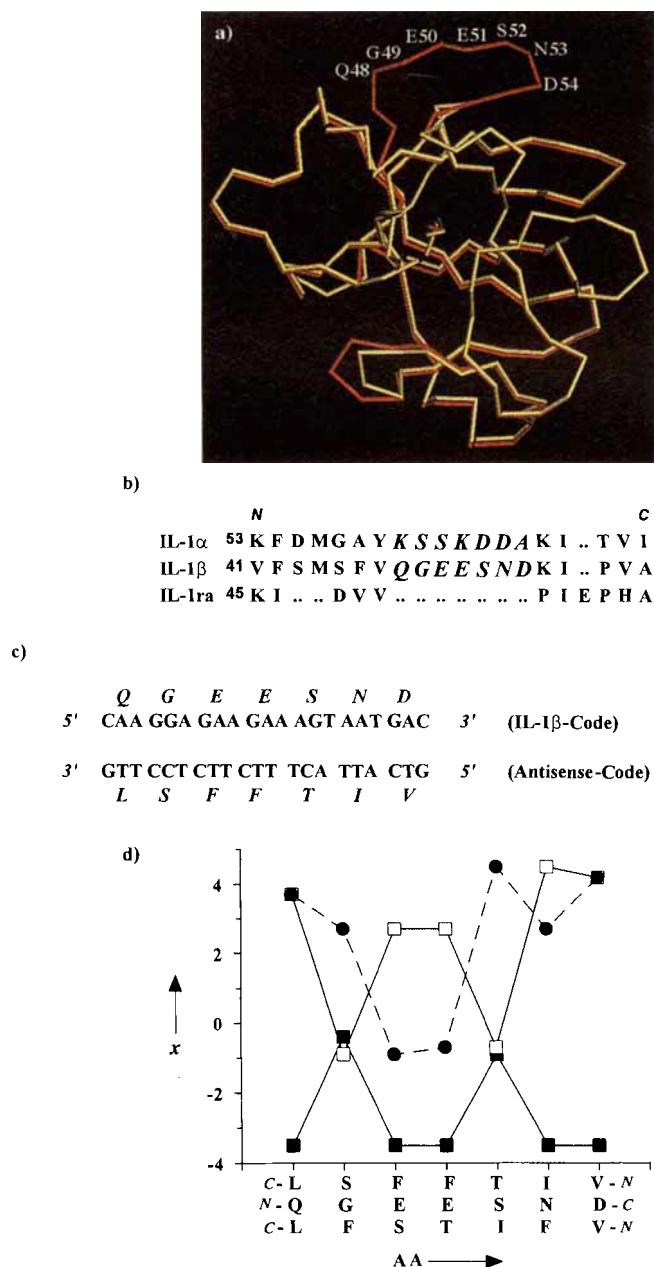
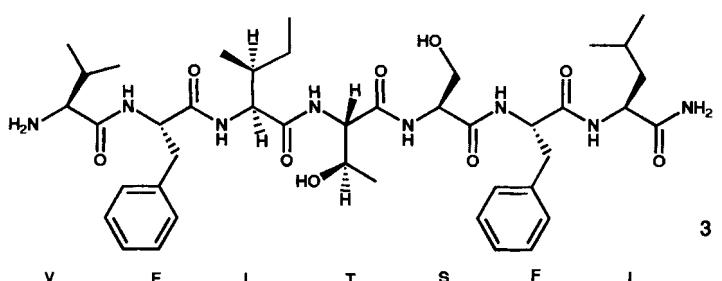
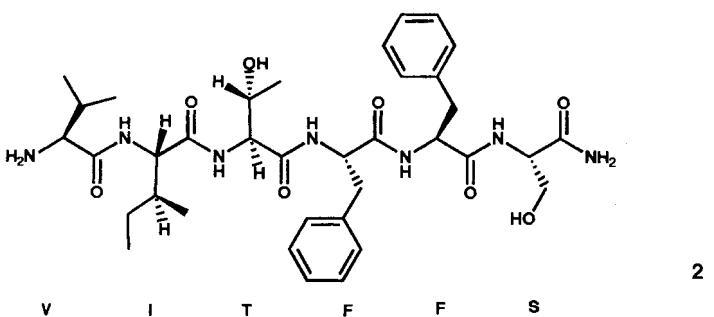
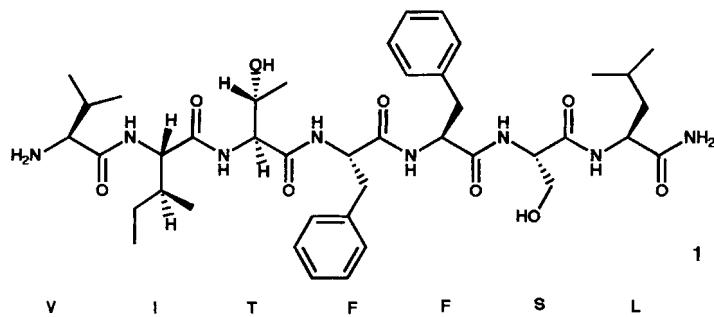


Abb. 1. a) Strukturen von IL-1 β (rot) und IL-1ra (gelb) im Kristall (ohne Seitenketten dargestellt). Die Überlagerung zeigt deutlich, daß die β -Wölbung (Boraschi-Schleife, beschrifteter Abschnitt) von IL-1 β in IL-1ra fehlt. b) Vergleich der von der DNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen von IL-1 α , IL-1 β und IL-1ra. Die an der β -Wölbung beteiligten Aminosäuren sind kursiv dargestellt. Sie fehlen in der IL-1ra-Sequenz. c) Planung der Antisense-Peptide. Der für die Boraschi-Schleife von IL-1 β codierende DNA-plus-Strang wurde in den zugehörigen minus-Strang (antisense-DNA) übersetzt, und diese wiederum von 5' nach 3' in passende Aminosäuresequenzen umgewandelt. d) Vergleich der Hydropathie x (Kyte-Doolittle-Profilen) der Boraschi-Schleife (N-QGEESND-C, ■), des Antisense-Peptids 1 (N-VITFFSL-C, □) und des Kontrollpeptids 3 (N-VITFFS-C, ●). Die Aminosäuren (AA) wurden wie folgt abgekürzt: Valin V, Isoleucin I, Threonin T, Phenylalanin F, Serin S, Leucin L, Glutamin Q, Glycin G, Glutaminsäure E, Asparagin N, Asparaginsäure D.

QGEESND-C, was auf komplementäre hydrophobe und hydrophile Bereiche hinweist. Diese Komplementarität besteht auch in guter Näherung zwischen den Profilen von 1 und dem Abschnitt der β -Wölbung von IL-1 α , (N-KSSKDDA-C, Aminosäure 60–66) (Abb. 1 b). Dieses Ergebnis ließ uns annehmen, daß die Antisense-Peptide 1 und 2 auch mit IL-1 α wechselwir-



ken, obwohl sie eigentlich nicht dafür entworfen wurden. Da komplementäre hydrophile und hydrophobe Bereiche offensichtlich für die Wechselwirkung zwischen Sense- und Antisense-Peptiden von Bedeutung sind,^[3–5] synthetisierten wir auch Peptid 3 mit der Sequenz N-VFITSFL-C. Das Hydropathieprofil dieses Peptids (Abb. 1 d) unterscheidet sich vollständig von dem des Antisense-Peptids 1 und ähnelt eher dem Profil des Boraschi-Schleifen-Ausschnitts N-QGEESND-C. Demzufolge sollte Peptid 3 weder an IL-1 α noch an IL-1 β binden und sich als Kontrollpeptid für die folgenden Untersuchungen eignen.

Die Wechselwirkung des Antisense-Peptids 1 mit IL-1 α , IL-1 β und einigen Kontrollproteinen wurde mit der kürzlich eingeführten Oberflächenplasmonen-Resonanz(SPR)-Spektroskopie untersucht.^[2,3] Hierzu wurden IL-1 α und IL-1 β auf SPR-Küvetten immobilisiert und einer steigenden Konzentration von 1 ausgesetzt. In beiden Fällen war eine beträchtliche Bindung zu beobachten (Abb. 2). Die Analyse der Affinitätsprofile zeigte, daß die Bindung von 1 an die beiden Cytokine ähnliche Dissoziationskonstanten (K_d) aufweist (Tabelle 1) wie sie für Wechselwirkungen zwischen anderen Sense- und Antisense-Peptiden gemessen wurden.^[3] Im Gegensatz dazu kam es zwischen dem Antisense-Peptid 1 und IL-1 α , dem die entscheidende β -Wölbung fehlt, zu keiner meßbaren Bindung. Die anderen Testproteine (Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-8, Lysozym so-

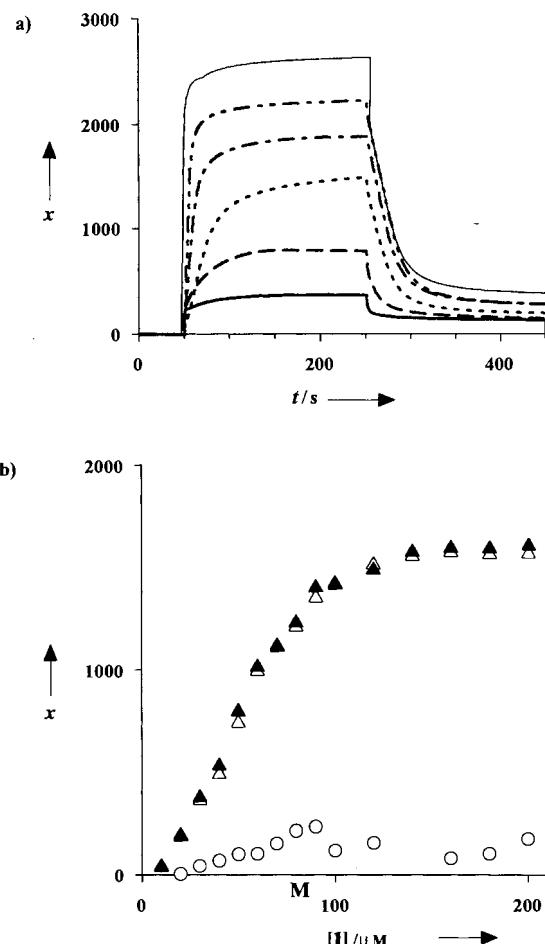


Abb. 2. a) Oberflächenplasmonenresonanz(SPR)-spektroskopisch bestimmte Affinitätsprofile (x = Signalaänderung in Bogensekunden) der Wechselwirkung zwischen dem Antisense-Peptid 1 und immobilisiertem IL-1 β bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen: 20 μM (—), 40 μM (---), 70 μM (●●●), 90 μM (●●), 100 μM (●●●) und 200 μM (—). IL-1 β lag in einer Oberflächenkonzentration von 22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ vor. b) Maximale Signalaänderung x (in Bogensekunden) als Funktion der Konzentration von Antisense-Peptid 1 (mit Hintergrundkorrektur) zur Veranschaulichung der Sättigung. Die gezeigten Ergebnisse wurden mit immobilisiertem IL-1 β (Oberflächenkonzentration 22 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in Abwesenheit (▲) und in Gegenwart (○) des Boraschi-Schleifen-Peptids N-QGEESND-C (äquimolar zu Antisense-Peptid 1) und mit immobilisiertem IL-1 α (△) (Oberflächenkonzentration 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) erhalten.

Tabelle 1. Zusammenfassung der Bindungsdaten, die aus SPR-spektroskopisch bestimmten Affinitätsprofilen ermittelt wurden. Die Daten wurden durch Analyse (mit IAsys-Software) der Sättigungsaffinitätsprofile gewonnen. Hierfür ließ man die Peptide mit immobilisiertem IL-1 α und IL-1 β wechselwirken. Die Fehler der angegebenen Werte können bis zu $\pm 50\%$ betragen. Abkürzungen der Aminosäuren: R für Arginin, P für Prolin, andere siehe Legende zu Abbildung 1.

Peptid	k_{ass} [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	$10^4 \times k_{\text{diss}}$ [s^{-1}]	K_d [μM]
1	IL-1 α	56.3	6.5
	IL-1 β	64.5	6.6
3	IL-1 α	[a]	[a]
	IL-1 β	[a]	[a]
N-LSFFTIV-C	IL-1 α	88.9	249.9
	IL-1 β	71.1	113.7
N-LLSLLRV-C	IL-1 α	60.8	210.8
	IL-1 β	86.5	252.4
N-LLSLLPV-C	IL-1 α	52.4	318.5
	IL-1 β	48.4	203.8

[a] Nicht meßbar.

wie Glycoprotein CD59) lieferten die gleichen, negativen Ergebnisse. Peptid **1** scheint spezifisch an die beiden Formen von Interleukin-1 zu binden. Kontrollexperimente mit dem Peptid **3** untermauern diese Schlußfolgerung, da es weder mit IL-1 α und IL-1 β (Tabelle 1) noch mit irgendeinem der anderen Proteine, einschließlich IL-1ra, wechselwirkt.

Nachdem wir eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem Antisense-Peptid **1** und IL-1 α sowie IL-1 β nachgewiesen hatten, testeten wir die Antisense-Peptide **1** und **2** als IL-1-Inhibitoren an einem Hepatomzellsystem,^[24] und zwar unter ähnlichen Pufferbedingungen wie bei der SPR-Spektroskopie. IL-1 α und IL-1 β lösen in den Hepatomzellen unabhängig voneinander die Synthese der Proteine Serumamyloid A (SAA) und Haptoglobin aus.^[25] Durch die Hemmung von IL-1 α oder IL-1 β reduziert sich die synthetisierte Menge der beiden Proteine. Im Test stellte sich nun heraus, daß beide Antisense-Peptide die Produktion von SAA und Haptoglobin hemmen, wobei das Ausmaß der Hemmung von der Peptidkonzentration abhängt (Abb. 3a; Tabelle 2) und teilweise sogar größer ist als bei dem natürlichen Inhibitor IL-1ra oder dem löslichen humanen IL-1-Rezeptorprotein vom Typ II (sIL-1 RII) (Tabelle 2). Die Ergebnisse zeigten außerdem (Abb. 3a; Tabelle 2), daß die Synthese von SAA schneller gehemmt wird als die von Haptoglobin, was auch bei Verwendung von IL-1ra beobachtet wurde.^[24] Für das Kontrollpeptid **3** konnten innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen des biologischen Tests (<10 % Hemmung) weder eine Hemmung von IL-1 β noch von IL-1 α festgestellt werden (Tabelle 2).

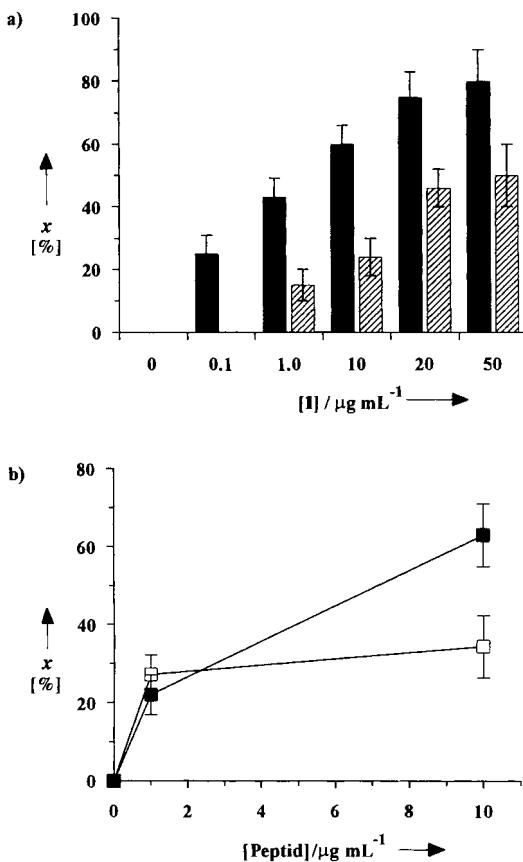


Abb. 3. a) Konzentrationsabhängige Hemmung x der IL-1 β -stimulierten Synthese von Serumamyloid A (SAA) (schwarze Balken) und Haptoglobin (gestrichelte Balken) durch Antisense-Peptid **1**. b) Prozentuale Hemmung x der Wechselwirkung von IL-1 β mit löslichem menschlichen IL-1-Typ-II-Rezeptor (sIL-1 RII) durch die Antisense-Peptide **1** (■) und **2** (□).

Tabelle 2. Zusammenfassung der Ergebnisse der Inhibierungs-Studien an der Hepatoma-Zellreihe HuH7. Die unten aufgeführten Peptide und Proteine wurden als Inhibitoren der IL-1 α - und IL-1 β -stimulierten Synthese von Serumamyloid A (SAA) und Haptoglobin getestet. Die beobachtete Hemmung ist in Prozent angegeben; als Kontrolle diente ein System ohne mutmaßliche Inhibitoren. ND heißt „nicht bestimmt“.

Peptid	SAA-Hemmung [%]		Haptoglobin-Hemmung [%]		
	IL-1 α [a]	IL-1 β [a]	IL-1 α [a]	IL-1 β [a]	
1 [b]		75	78	ND	66
2 [b]		55	65	ND	57
3 [c]	<10	<10	<10	<10	<10
sIL-1 RII [c]	25	90	38	75	
IL-1ra [d]	100	100	100	100	
<i>N</i> -LSFFTIV-C [c]	<10	<10	<10	<10	
<i>N</i> -LLSLLPV-C [c]	<10	<10	<10	<10	
<i>N</i> -LLSLLRV-C [c]	<10	<10	<10	<10	

[a] 1 ng mL^{-1} . [b] 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. [c] 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. [d] 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [24].

Die Ergebnisse der SPR-spektroskopischen Bindungsstudien (Tabelle 1) sprachen dafür, daß die Wirkung der Antisense-Peptide **1** und **2** als IL-1-Inhibitoren auf der Bindung an IL-1 α oder IL-1 β beruht, wodurch deren Wechselwirkung mit dem IL-1-Rezeptor sterisch gehindert ist. Um diese Hypothese zu testen, führten wir eine Reihe von Rezeptorbindungsstudien durch. Diese Tests sollten zeigen, ob die Antisense-Peptide die Wechselwirkung zwischen dem löslichen IL-1-Rezeptorprotein sIL-1 RII und IL-1 β hemmen. Tatsächlich hemmen sowohl **1** als auch **2** in Abhängigkeit von ihrer Konzentration eben diese Wechselwirkung (Abb. 3 b). Peptid **1** führt im Vergleich zur Bindung ohne Antisense-Peptid zu mindestens 63 % Hemmung. Es scheint daher tatsächlich sinnvoll, von einer Bindung der Antisense-Peptide an IL-1 auszugehen, die zur sterischen Behinderung der IL-1/Rezeptor-Wechselwirkung führt.

Für weitere Kontrollexperimente wurden drei andere Antisense-Peptide synthetisiert. Das erste, *N*-LSFFTIV-C, hat die gleiche Sequenz und das gleiche Hydropathieprofil wie **1**, aber in umgekehrter Richtung. Das zweite, *N*-LLSLLRV-C, hat ein ähnliches Hydropathieprofil wie **1**, aber eine unterschiedliche Aminosäuresequenz. Das dritte, *N*-LLSLLPV-C, hat ein ähnliches Hydropathieprofil wie **1**, aber seine Aminosäuresequenz ergibt sich durch Translation der Antisense-DNA in 3' \rightarrow 5'-Richtung, also entgegengesetzt zur üblichen 5' \rightarrow 3'-Richtung (Abb. 1 c). Jedes dieser drei Kontrollpeptide wechselwirkt mit IL-1 α und IL-1 β (Tabelle 1), ihre Bindungsaaffinitäten sind jedoch um das 20–60fache niedriger als die von **1**, wofür hauptsächlich die größere Dissoziationskonstante, k_{diss} , verantwortlich zu sein scheint (Tabelle 1). Aufgrund dieser schwächeren Wechselwirkung erschien es unwahrscheinlich, daß eines der drei Peptide die von IL-1 induzierte Proteinsynthese hemmen könnte. Es war deshalb nicht überraschend, daß sich keines der Kontrollpeptide innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen des biologischen Tests (<10 % Hemmung) als wirksamer Inhibitor erwies (Tabelle 2).

Die hier beschriebenen Befunde stützen die Ansicht, daß die Antisense-Peptide **1** und **2** spezifisch die von IL-1 induzierte Proteinsynthese hemmen, indem sie die Cytokin-Rezeptor-Wechselwirkung durch Bindung an das Cytokin sterisch blockieren. Man könnte die Peptide somit auch als „Mini-Rezeptor-inhibitoren“ bezeichnen. Wenn wir auch nicht ganz sicher sein können, daß **1** und **2** über ihre β -Wölbung an IL-1 α und IL-1 β binden, so gibt es doch Anhaltspunkte, die diese Vermutung stützen. Zum einen konnte **1** nicht mit IL-1ra wechselwirken, dem die β -Wölbung fehlt (Abb. 1). Zum anderen reduzierte sich die Wechselwirkung von **1** mit IL-1 β in Gegenwart der Borschi-Schleife *N*-QGEESND-C erheblich (Abb. 2 b). Der Grund

dafür ist vermutlich die direkte Konkurrenz zwischen diesem Schleifen-Peptid und der äquivalenten Boraschi-Schleife in IL-1 β um die Bindung zu 1. Schließlich hemmen beide, 1 und 2, in geringerem Maße die Anlagerung von IL-1 β an den BhrD2-Antikörper (Ergebnisse sind nicht aufgeführt). Diese Wirkung ist spezifisch für die IL-1 β -Region 45–87, in dem auch die Boraschi-Schleife liegt (Abb. 1 b).

Die von uns gezielt entworfenen Antisense-Peptide haben sich als wirksame „Mini-Rezeptorinhibitoren“ der IL-1-induzierten Proteinsynthese in menschlichen Heptomzellen erwiesen. Derartige Peptide können eine neue Klasse von vielseitigen niedermolekularen Inhibitoren bilden; Voraussetzung ist, daß sie an Rezeptorbindungsstellen oder Effektorschleifen binden und entsprechend entworfen werden.

Experimentelles

Die kristallographischen Daten von IL-1 α [10], IL-1 β [9] und IL-1 α [14] stammen aus der Brookhaven-Protein-Datenbank. Die Synthese der Peptide erfolgte, wenn nicht anders angegeben, nach Standardprotokollen an einem Festphasen-Peptidsynthesizer (ABI-431A) mit N-terminal Fmoc-geschützten Aminosäuren (Bachem Ltd.) und dem Rink-Amidharz MBHA (Novabiochem). Nach Entschüttung und Abspaltung vom Harz wurden die Peptide durch Gelfiltration entsalzt (P2-Bioigel; Säule: Durchmesser 2 cm, Länge 30 cm, 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)/H₂O). Die Peptide wurden durch RP-HPLC (Pep RPC HR10/10, Pharmacia FPLC-System) und einem linearen Gradienten aus Acetonitril/0,1 % TFA in Wasser gereinigt. Nach dem Gefrierrocknen wurden die Peptide bei –20 °C trocken gelagert. Die Charakterisierung der Peptide erfolgte mittels FAB-MS (positiv ion) und quantitativer Aminosäureanalyse. Laut RP-HPLC waren die Peptide zu > 95 % rein.

Die SPR-Spektroskopie [23] wurde mit einem IAsys-Gerät der Firma Affinity Sensors durchgeführt. Um die Proteine (einschließlich IL-1 α und IL-1 β) zu immobilisieren, wurden sie in 10 mM Acetatpuffer, pH 4,75, 30 min bei 37 °C mit N-Hydroxysuccinimid/1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (NHS/EDC) aktiviert und an die Carboxymethyldeextran-Beschichtung der Küvette gekuppelt. Ausgehend von einer Stammlösung (200 μ M Peptid in PBS-Puffer mit 0,05% Tween-20 [v/v], pH 7,4, mit 1 % DMSO [v/v]) erzeugte man durch Verdünnung mit dem Testpuffer (PBS-Puffer mit 0,05% Tween-20 [v/v], pH 7,4) Peptidlösungen mit Konzentrationen von 20 bis 200 μ M. Die Küvette wurde nacheinander bei 37 °C mit den Peptidlösungen behandelt und anschließend die jeweiligen Affinitätsprofile aufgenommen. Typischerweise folgten nach Assoziationszeiten von 200–250 s mehrere „Dissoziations-Waschgänge“. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Küvette 1–2 min mit 50 mM HCl regeneriert, um alle noch gebundenen Peptide zu entfernen. Vor der nächsten Messung wusch man die Küvette mehrere Male mit dem Testpuffer. Aus den Affinitätsprofilen wurden die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{ass} bzw. k_{diss}) ermittelt und daraus die Dissoziationskonstante K_{diss} berechnet.

Die Hemmung von IL-1 β und IL-1 α wurde mit Hilfe des kürzlich beschriebenen menschlichen HuH7-Hepatomzellsystems untersucht [24]. Die mutmaßlichen Peptidinhibitoren wurden in DMSO gelöst (10 mg mL^{–1}) und zu den durch IL-1 β oder IL-1 α (1 ng mL^{–1}) stimulierten HuH7-Hepatomzellen gegeben bis eine bestimmte Endkonzentration erreicht war. Die Konzentrationen von Serumamyloid A und Haptoglobin wurden nach 48 h mit einem ELISA (enzym linked immunosorbent assay) bestimmt [24]. Zur Kontrolle der Brauchbarkeit der Zellen diente die Albuminsynthese.

Für die Rezeptorbindungsstudien wurde IL-1 β (10 μ g mL^{–1}) auf Immulon-II-Platten immobilisiert (16 h, 4 °C, PBS-Puffer, pH 7,4). Die restlichen Bindungsstellen wurden mit Rinderserumalbumin (BSA) (1% [w/v] in PBS-Puffer mit 0,05% Tween-20 [v/v], pH 7,4) blockiert. Anschließend wurde löslicher menschlicher IL-1-Typ-II-Rezeptor (sIL-1 RII) (Immunex Corporation) (4 ng mL^{–1}) zusammen mit den Peptiden in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Die Stärke der Rezeptorbindung an IL-1 β wurde nach 2 h bei 4 °C mit einem ELISA bestimmt (polyklonale Kaninchen-Antikörper: anti-sIL-1 RII, Immunex Corporation; Anti-Kaninchen-IgG-Meereittich-Peroxidase-Konjugat (HRP), Jackson Laboratories). Als Substrat für das HRP-Konjugat diente 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB).

Eingegangen am 9. September 1996,
veränderte Fassung am 5. Februar 1997 [Z 9538]

Stichworte: Antisense-Agentien · Interleukin-1 · Molekulare Erkennung · Peptide

- [1] J. E. Blalock, E. M. Smith, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *121*, 203–207.
- [2] a) K. L. Bost, E. M. Smith, J. E. Blalock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 1372–1375; b) K. L. Bost, E. M. Smith, J. E. Blalock, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *128*, 1373–1380; c) D. A. Weigert, P. D. Hoeprich, K. L. Bost,

T. K. Brunck, W. E. Reiher, III, J. E. Blalock, *ibid.* **1986**, *139*, 367–374; d) J. E. Blalock, J. N. Whitaker, E. N. Benveniste, K. L. Bost, *Methods Enzymol.* **1989**, *178*, 63–74; e) J. Ghiso, E. Saball, J. Leoni, A. Rostagno, B. Frangione, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1288–1291; f) E. Roubos, *TibTECH* **1990**, *8*, 279–281; g) T. K. Gartner, R. Loudon, D. B. Taylor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *180*, 1446–1452; h) G. Fassina, G. Cassani, *Biochem. J.* **1992**, *282*, 773–779; i) G. Fassina, A. Corti, G. Cassani, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *39*, 549–556; j) S. J. de Souza, R. Brentani, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13763–13767; k) S. Araga, R. D. LeBoeuf, J. E. Blalock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8747–8751; l) P. K. Misra, W. Haq, S. B. Katti, K. B. Mathur, R. Raghubir, G. K. Patnaik, B. N. Dhawan, *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 660–661; m) D. D. Holsworth, J. S. Keily, R. S. Root-Bernstein, R. W. Overhiser, *Pept. Res.* **1994**, *7*, 185–193; n) L. Baranyi, W. Campbell, K. Ohshima, S. Fujimoto, M. Boros, H. Okada, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 894–901.

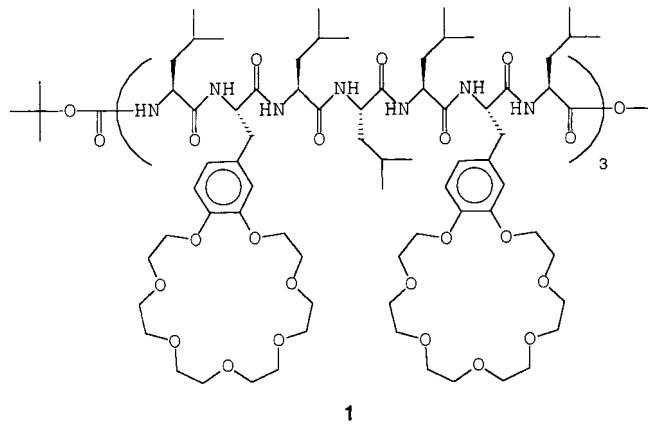
- [3] Y. Shai, T. K. Brunck, I. M. Chaiken, *Biochemistry* **1989**, *28*, 8804–8811.
- [4] Y. Shai, M. Flashner, I. M. Chaiken, *Biochemistry* **1987**, *26*, 669–675.
- [5] R. R. Brentani, *J. Theor. Biol.* **1988**, *135*, 495–499.
- [6] a) C. A. Dinarello, *Blood* **1991**, *77*, 1627–1652; b) C. A. Dinarello, S. M. Wolff, *N. Engl. J. Med.* **1993**, *328*, 106–113.
- [7] a) P. Vandenebelle, W. Fiers, *Immunol. Today* **1991**, *12*, 217–219; b) J. P. Vasilakos, R. T. Carroll, M. R. Emmerling, P. D. Doyle, R. E. Davis, K. S. Kim, B. D. Shivers, *FEBS Lett.* **1994**, *354*, 289–292; c) J. D. Buxbaum, M. Oishi, H. I. Chen, R. Pinkas-Kramarski, E. A. Jaffe, S. E. Gandy, P. Greengard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10075–10078.
- [8] G. M. Clore, P. T. Wingfield, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2315–2323.
- [9] a) J. P. Priestle, H.-P. Schär, M. G. Grüter, *EMBO J.* **1988**, *7*, 339–343; b) B. C. Finzel, L. L. Clancy, D. R. Holland, S. W. Muchmore, K. D. Watenpaugh, H. M. Einspahr, *J. Mol. Biol.* **1989**, *209*, 779–791.
- [10] B. J. Graves, M. H. Hatada, W. A. Hendrickson, J. K. Miller, V. S. Madison, Y. Satow, *Biochemistry* **1990**, *29*, 2679–2684.
- [11] a) S. K. Dower, S. R. Kronheim, T. P. Hopp, M. Cantrell, M. Deeley, S. Gillis, C. S. Henney, D. L. Urdal, *Nature* **1986**, *324*, 266–268; b) P. L. Kilian, K. L. Kaffka, A. S. Stern, D. Woehle, W. R. Benjamin, T. M. Dechiara, U. Gubler, J. J. Farrar, S. B. Mizel, P. T. Lomedico, *J. Immunol.* **1986**, *136*, 4509–4514; c) S. K. Dower, J. E. Sims, *Ann. Rheum. Dis.* **1990**, *No. S1*, 452–459.
- [12] a) D. Boraschi, L. Villa, G. Volpini, P. Bossu, S. Censini, P. Ghiara, G. Scapigliati, L. Nencioni, M. Bartalini, G. Matteucci, F. Cioli, M. Carnasciali, E. Olmastroni, M. Mengozzi, P. Ghezzi, A. Tagliabue, *Eur. J. Immunol.* **1990**, *20*, 317–321; b) J. H. Calkins, H. Guo, M. M. Sigel, T. Lin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *167*, 548–553.
- [13] a) D. B. Carter, M. R. Deibel, Jr., C. J. Dunn, C.-S. C. Tomich, A. L. Laborde, J. L. Slichtom, A. E. Berger, M. J. Bienkowski, F. F. Sun, R. N. McEwan, P. K. W. Harris, A. W. Yem, G. A. Waszak, J. G. Chosay, L. C. Sieu, M. M. Hardee, H. A. Zurcher-Neely, I. M. Reardon, R. L. Heinrikson, S. E. Truesdell, J. A. Shelly, T. E. Eessalu, B. M. Taylor, D. E. Tracey, *Nature* **1990**, *344*, 633–637; b) C. H. Hannum, C. J. Wilcox, W. P. Arend, F. G. Joslin, D. J. Dripps, P. L. Heimdal, L. G. Armes, A. Sommer, S. P. Eisenberg, R. C. Thompson, *ibid.* **1990**, *343*, 336–340; c) S. P. Eisenberg, R. J. Evans, W. P. Arend, E. Verderber, M. T. Brewer, C. H. Hannum, R. C. Thompson, *ibid.* **1990**, *343*, 341–346.
- [14] G. P. A. Vigers, P. Caffes, R. J. Evans, R. C. Thompson, S. P. Eisenberg, B. J. Brandhuber, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12874–12879.
- [15] B. J. Stockman, T. A. Scahill, N. A. Strakalaitis, D. P. Brunner, A. W. Yem, M. R. Deibel, Jr., *FEBS Lett.* **1994**, *349*, 79–83.
- [16] D. J. Dripps, B. J. Brandhuber, R. C. Thompson, S. P. Eisenberg, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 10331–10336.
- [17] P. C. Bates, P. W. Ledger, R. Aston, *Expert Opin. Ther. Pat.* **1994**, *4*, 917–930.
- [18] J. C. Lee, J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landwatter, J. E. Strickler, M. M. McLaughlin, I. R. Siemens, S. M. Fisher, G. P. Livi, J. R. White, J. L. Adams, P. R. Young, *Nature* **1994**, *372*, 739–746.
- [19] a) E. Labriola-Tompkins, C. Chandran, K. L. Kaffka, D. Biondi, B. J. Graves, M. Hatada, V. S. Madison, J. Karas, P. L. Kilian, G. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11182–11186; b) H. Kawashima, J.-I. Yamagishi, M. Yamayoshi, M. Ohue, T. Fukui, H. Kotani, M. Yamada, *Protein Eng.* **1992**, *5*, 171–176; c) R. B. Gayle, III, K. Poindexter, D. Cosman, S. K. Dower, S. Gillis, T. Hopp, R. Jerzy, S. Kronheim, V. Lum, A. Lewis, M. M. Goodgame, C. J. March, D. L. Smith, S. Srinivasan, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22105–22111; d) E. Labriola-Tompkins, C. Chandran, T. A. Varnell, V. S. Madison, G. Ju, *Protein Eng.* **1993**, *6*, 535–539; e) M. G. Grüter, J. van Oostrum, J. P. Priestle, E. Edelmann, U. Joss, U. Feige, K. Vosbeck, A. Schmitz, *ibid.* **1994**, *7*, 663–671; f) R. J. Evans, J. Bray, J. D. Childs, G. P. A. Vigers, B. J. Brandhuber, J. J. Skalicky, R. C. Thompson, S. P. Eisenberg, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 11477–11483.
- [20] P. E. Auron, G. J. Quigley, L. J. Rosenwasser, L. Gehrke, *Biochemistry* **1992**, *31*, 6632–6638.

- [21] a) G. Antoni, R. Presentini, F. Perin, A. Tagliabue, P. Ghiara, S. Censini, G. Volpini, L. Villa, D. Boraschi, *J. Immunol.* **1986**, *137*, 3201–3204; b) D. Boraschi, L. Nencioni, L. Villa, S. Censini, P. Bossu, P. Ghiara, R. Presentini, F. Perin, D. Frasca, G. Doria, G. Forni, T. Musso, M. Giovarelli, P. Ghezzi, R. Bertini, H. O. Besedovsky, A. Del Rey, J. D. Sipe, G. Antoni, S. Silvestri, A. Tagliabue, *J. Exp. Med.* **1988**, *168*, 675–686.
- [22] C. J. March, B. Mosley, A. Larsen, D. P. Cerretti, G. Braedt, V. Price, S. Gillis, C. S. Henney, S. R. Kronheim, K. Grabstein, P. J. Conlon, T. P. Hopp, D. Cosman, *Nature* **1985**, *315*, 641–647.
- [23] D. Griffiths, G. Hall, *TIBTECH.* **1993**, *11*, 122–130.
- [24] S. Bevan, J. G. Raynes, *J. Immunol.* **1991**, *147*, 2574–2578.
- [25] J. G. Raynes, S. Eagling, K. P. W. J. McAdam, *Clin. Exp. Immunol.* **1991**, *83*, 448–491.

Ein synthetischer, in Lipiddoppelschichten aktiver Transmembrankanal**

Jean-Christophe Meillon und Normand Voyer*

Seit Mitte der achtziger Jahre sind viele Arbeiten zur Synthese von Verbindungen erschienen, von denen man sich erhofft, daß sie in der Lage sind, natürliche Ionenkanalproteine nachzuahmen.^[1] Nur wenige dieser Verbindungen zeigten eine deutliche Einkanalaktivität.^[2] Wir berichteten kürzlich,^[3] daß das Peptid **1** aus 21 Aminosäuren mit insgesamt sechs [21]Krone-7-Einheiten



ten in einem Vesikelexperiment eine Ionentransportfähigkeit ähnlich der von Gramicidin A zeigte. Wahrscheinlich führt eine Stapelung der Kronenetherringe zur Bildung des Transmembrankanals. Das Peptid sollte wegen der 15 in ihm enthaltenen L-Leucinreste zum einen hydrophob genug sein, um in Lipiddoppelschichten eingebaut werden zu können,^[4] und zum anderen bevorzugt in der α -Helixkonformation vorliegen.^[5] Unter diesen Umständen wären die Kronenetherringe optimal angeordnet (Abb. 1). Wir berichten hier über Konformationsstudien und über Untersuchungen mit ebenen Lipiddoppelschichten, die bestätigen, daß das sechs Kronenethereinheiten tragende Peptid **1** als funktioneller Ionenkanal dienen kann.

[*] Dr. N. Voyer, J.-C. Meillon
Département de Chimie, Faculté des Sciences et de Génie
Université Laval
Ste-Foy, PQ G1K 7P4 (Kanada)
Telefax: Int. + 418/656 7916
E-mail: normand.voyer@chm.ulaval.ca

[**] Diese Arbeit wurde vom NSERC (Kanada) und vom Fonds FCAR du Québec unterstützt. Wir danken Marc Drouin für Unterstützung bei der Modellierung von **1**, Dr. G. Andrew Woolley und Dominic C. Jaikaran (University of Toronto) für Hilfe bei den Einkanalmessungen.

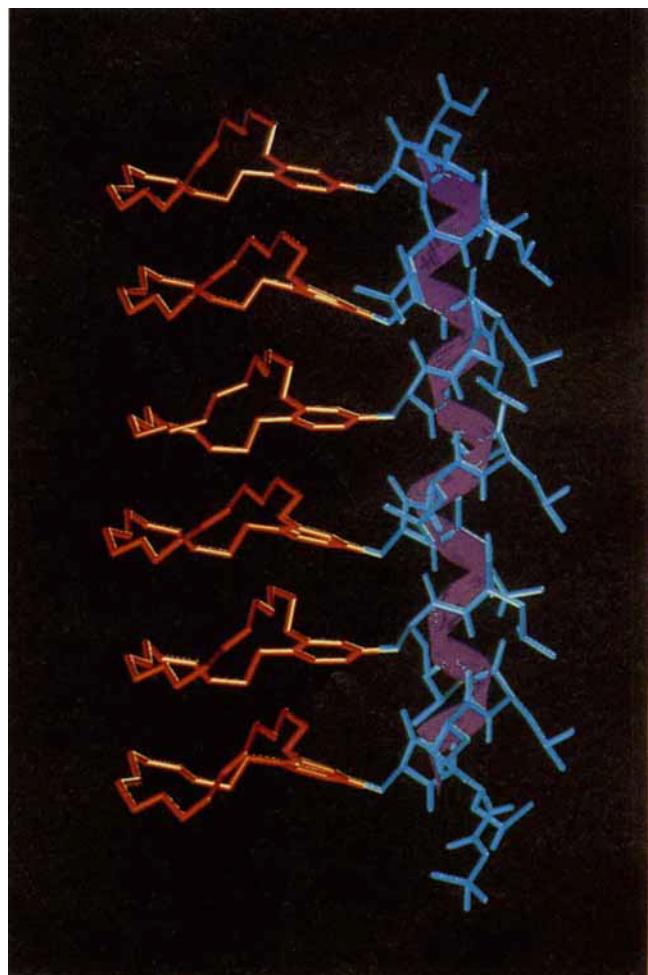


Abb. 1. Die bei der Minimierung mit dem Programm SYBIL ermittelte stabile Konformation von **1**. Die Kronenetherringe sind rot und das Peptidrückgrat blau wiedergegeben. Das violette Band veranschaulicht die Helixkonformation des Rückgrats.

Zur Bestimmung der Konformation von **1** in Lösung wendeten wir die Circular dichroismus(CD)-Spektropolarimetrie in mehreren Solventien mit einer Peptidkonzentration von 1 mg mL^{-1} sowie in Eidotterlecithin-Vesikeln (Lipid/Peptid-Verhältnis 80/1) an. Im letztgenannten Fall wurden das jeweilige Lipid und das Peptid gemeinsam in Chloroform gelöst. Anschließend wurde die Mischung im Heliumstrom zu einem Film getrocknet und dieser im Vakuum weiter getrocknet. Die Filme wurden jeweils mit einer 0.01 M HCl-Lösung hydratisiert und danach so lange mit Ultraschall beschallt, bis die Lösung klar war.^[6] In allen untersuchten Medien – protischen wie hydrophoben – wiesen die CD-Spektren (Abb. 2a) auf das Vorliegen der als bevorzugt vorausgesagten α -Helixkonformation hin, in der die Kronenethereinheiten einen funktionellen Kanal bilden. Dieser Schluß wird durch IR-spektroskopische Befunde gestützt: Sowohl in Chloroform als auch in hydratisiertem Diphantanoylphosphatidylcholin (DPPC) absorbiert **1** bei 1656 cm^{-1} , wie es für die Amid-I-Bande α -helicaler Strukturen charakteristisch ist.^[7] Weiterhin sind die CD-Spektren von **1** in Trifluorethanol konzentrationsunabhängig (Abb. 2b). Obwohl aggregierte Formen nicht ganz ausgeschlossen werden können, sollte **1** diesen Ergebnissen zufolge in wenig polaren Medien und in dem Konzentrationsbereich, in dem die Leitfähigkeitsmessungen durchgeführt wurden, als Monomer vorliegen.^[8]