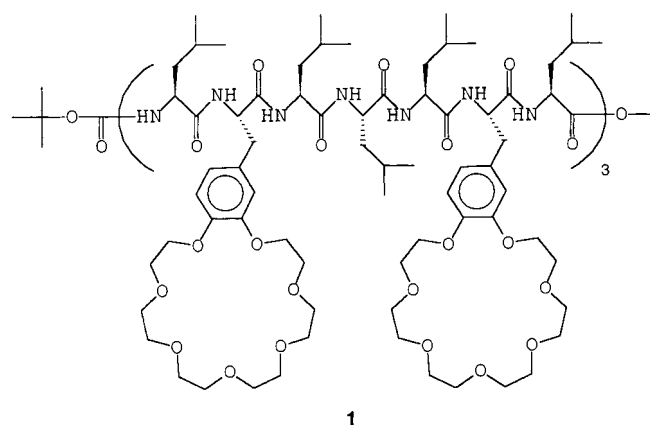


- [21] a) G. Antoni, R. Presentini, F. Perin, A. Tagliabue, P. Ghiara, S. Censini, G. Volpini, L. Villa, D. Boraschi, *J. Immunol.* **1986**, *137*, 3201–3204; b) D. Boraschi, L. Nencioni, L. Villa, S. Censini, P. Bossu, P. Ghiara, R. Presentini, F. Perin, D. Frasca, G. Doria, G. Forni, T. Musso, M. 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-Einhei-



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.

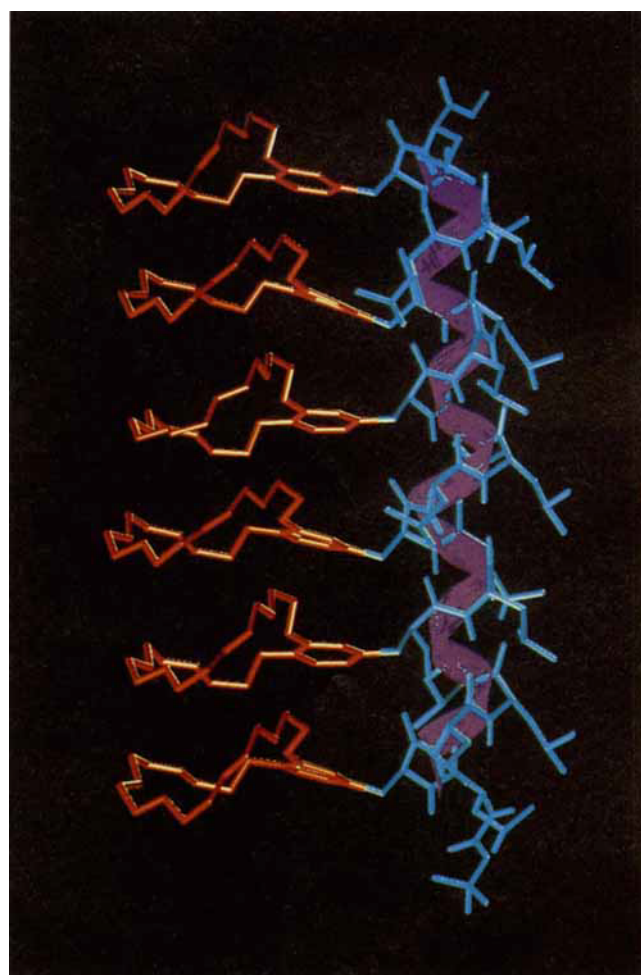


Abb. 1. Die bei der Minimierung mit dem Programm SYBIL ermittelte stabilste Konformation von **1**. Die Kronenetherringe sind rot und das Peptidrückgrat blau wiedergegeben. Das violette Band veranschaulicht die Helixkonformation des Rückgrats.

Zur Bestimmung der Konformation von **1** in Lösung wendeten wir die Circular dichroismus (CD)-Spektropolarimetrie in mehreren Solventen 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 Diphosphatidylcholin (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 Trifluor-ethanol 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]

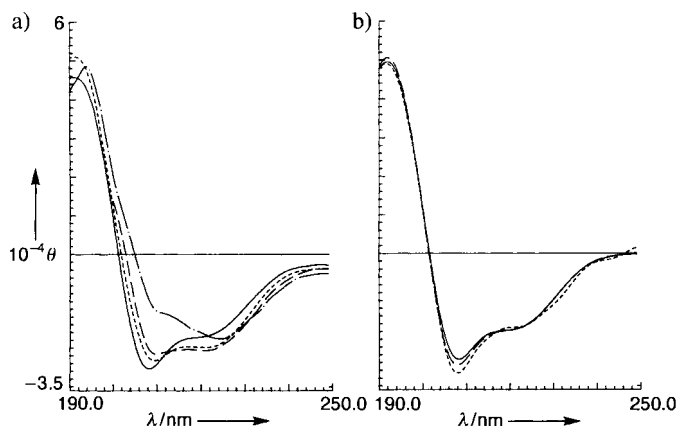


Abb. 2. a) CD-Spektren von **1** in 2,2,2-Trifluorethanol (TFE, durchgezogen), Methanol (gepunktet), 1,2-Dichlorethan (gestrichelt) und Eidotterlecithin-Vesikeln (strichpunktet) bei 25 °C. Die Peptidkonzentration ist in allen Fällen 2.3×10^{-4} M, und das Lipid/Peptid-Verhältnis beträgt in den Vesikeln 80/1. b) CD-Spektren von **1** in TFE bei unterschiedlichen Konzentrationen und 25 °C: 2.3×10^{-4} M (durchgezogen), 2.3×10^{-5} M (gestrichelt), 2.3×10^{-6} M (gepunktet). Die $[\theta]$ -Werte sind angegeben als mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest in $^{\circ}\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$.

Die Ionenkanalaktivität von **1** wurde in Einkanalmessungen^[9] mit einer modifizierten Patch-clamp-Technik^[10] bestimmt. Dazu führten wir zwei grundsätzlich verschiedene Experimente mit einer 0.1 mM Lösung von **1** in Methanol durch. In der ersten Art von Experimenten wurden 2 μL dieser Lösung in eine 2-mL-Zelle gegeben, die eine ungepufferte 1 M KCl-Lösung (pH = 5.8) enthielt, und es wurde eine Pipettenspitze verwendet, um die Doppelschicht aufzubauen. Als Lipid wurde ungeladenes Glycerinmonooleat (GMO) oder zwitterionisches DPPC (5 mg mL^{-1} in Hexadecan bzw. Decan) eingesetzt. In der zweiten Art von Experimenten wurden 2 μL der Peptidlösung mit 100 μL der Lipidprobe gemischt, das Methanol im Vakuum entfernt und die Doppelschicht unter Verwendung der Lipid/Peptid-Mischung hergestellt. In beiden Experimenten wurden die Daten nach dem Anlegen eines Transmembranpotentials gesammelt und analysiert.

Die in Abbildung 3 gezeigten Strom-Zeit-Kurven sind für Ionenkanalaktive Verbindungen charakteristisch: Während des ganzen Experiments treten typische Übergänge („Stufen“) zwischen offenen und geschlossenen Kanalzuständen auf, die diskrete, von der Zahl der offenen Kanäle abhängige Leitfähigkeiten aufweisen.^[9] In der DPPC-Doppelschicht hat der Kanalstrom einen Wert von (3.5 ± 0.2) pA mit Öffnungszeiten von etwa einer Sekunde.^[11] In der GMO-Doppelschicht sind sowohl der

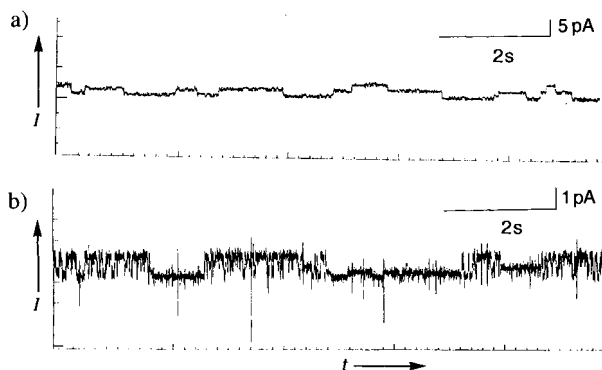


Abb. 3. Einkanalleitfähigkeit von **1** in 1 M KCl (bei +100 mV, gefiltert bei 200 Hz) in a) einer DPPC-Doppelschicht (Kanalstrom (3.5 ± 0.2) pA, durchschnittliche Kanalöffnungszeit > 1 s), b) in einer GMO-Doppelschicht (Kanalstrom (1.0 ± 0.1) pA, durchschnittliche Kanalöffnungszeit < 200 ms).

Kanalstrom ((1.0 ± 0.1) pA) als auch die Öffnungszeiten (weniger als 200 ms) anders. Gab man **1** zur reinen KCl-Lösung (erste Art von Experimenten), baute es sich nur schlecht ein. Dies könnte an der ausgeprägten Neigung von **1** liegen, beim Kontakt mit Wasser Assoziate zu bilden. Sobald man die Methanol-Lösung von **1** in die Zelle gab, fiel ein weißer Niederschlag aus. Dies verzögerte die Beobachtung aktiver Kanäle. Bei der zweiten Art von Experimenten traten häufig Störungen der Doppelschichtstabilität auf, und es konnten keine charakteristischen Kanalströme gemessen werden. Dies könnte an einer bevorzugten Adsorption des Peptids an der Membranoberfläche liegen, die mit elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Kronenethereinheiten und den polaren Kopfgruppen des Lipids zu erklären wäre. Sobald Peptidmoleküle parallel zu den Lipidketten eingebaut werden, tritt Kanalaktivität auf. Dies wurde von DeGrado et al. an ähnlichen Peptidsystemen gezeigt.^[12c] Weiterhin könnte das Fehlen polarer Kopfgruppen bei **1** teilweise seine Neigung erklären, an der Oberfläche der Doppelschicht zu bleiben.

Wir haben hier einen funktionellen künstlichen Ionenkanal beschrieben, der höchstwahrscheinlich in gut charakterisierter, monomerer Form aktiv ist. Die Ergebnisse veranschaulichen sehr schön die Eignung von Peptidgerüsten für den Aufbau molekularer Bauteile^[12] und könnten wichtige Auswirkungen auf die Entwicklung ionensensitiver Feldeffekttransistoren (IS-FETs)^[13] und molekularer Drähte^[14] haben. **1** weist typische, von der Lipiddoppelschichtstruktur abhängige Einkanalcharakteristika auf. Das Problem, es so einzubauen, daß es auch funktioniert, könnte dank der Einfachheit und Vielseitigkeit unserer Synthesestrategie^[15] leicht gelöst werden. Unsere derzeitigen Arbeiten zielen in diese Richtung, und wir synthetisieren darüber hinaus Analoga von **1**, um Struktur/Aktivitäts-Beziehungen und die aktive Form detailliert untersuchen zu können.

Eingegangen am 23. September.
veränderte Fassung am 23. Dezember 1996 [Z 9575]

Stichworte: Ionenkanäle · Kronenverbindungen · Peptide

- [1] a) O. Murillo, S. Watanabe, A. Nakano, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7665–7679; b) U. Koert, M. Stein, K. Harms, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1238–1240; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1180–1182; c) E. Stadler, P. Dedek, K. Yamashita, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6677–6682; d) G. G. Cross, T. M. Fyles, T. D. James, M. Zojaj, *Synlett* **1993**, 449–460; e) L. Jullien, T. Lazrak, J. Canceill, L. Lacombe, J.-M. Lehn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 1011–1020; f) D. M. Spencer, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Science* **1993**, *262*, 1019–1024; g) U. F. Kragten, M. F. M. Roks, R. J. M. Nolte, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 1275–1276; h) F. M. Menger, D. S. Davis, R. A. Persichetti, J. J. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2451–2452; i) J. H. Fuhrhop, U. Liman, V. Koesling *ibid.* **1988**, *110*, 6480–6485; j) I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Yokota, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4601–4604.
- [2] a) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, *369*, 301–304; b) D. Seebach, A. Brunner, H. M. Bürger, R. N. Reusch, L. L. Bramble, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 507–517; c) K. S. Akerfeldt, J. D. Lear, Z. R. Wasserman, L. A. Chung, W. F. DeGrado, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 191–197; d) Y. Tanaka, Y. Kobuke, M. Sokabe, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 717–719; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 693–694; e) M. Montal, M. S. Montal, J. M. Tomich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6929.
- [3] N. Voyer, M. Robitaille, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6599–6600.
- [4] D. M. Engelman, T. A. Steitz, *Cell* **1981**, *23*, 411–422.
- [5] a) G. E. Schultz, R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer, New York, **1979**, Kap. 6; b) H. Yamamoto, T. Hayakama, *Polymer* **1979**, *18*, 979–983.
- [6] W. F. DeGrado, J. D. Lear, *Biopolymers* **1990**, *29*, 205–213.
- [7] P. I. Haris, D. Chapman, *Biopolymers* **1995**, *37*, 251–263.
- [8] M. Cascio, B. A. Wallace, *Ann. NY Acad. Sci.* **1984**, *435*, 527–529.
- [9] a) B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer, Sunderland, MA, USA, **1992**; b) P. Läger, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 939–959; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 905–923; c) B. A. Suarez-Isla, K. Wan, J. Lindstrom, M. Montal, *Biochemistry* **1983**, *22*, 2319–2323.

- [10] G. A. Woolley, A. S. I. Jaikaran, Z. Zhang, S. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4448–4454.
 [11] Das kronenetherfreie Analogon von **1**, Boc-(L-F-L₃-F-L)₃-OMe, ist in diesem Doppelschichtexperiment inaktiv und stört sogar die Doppelschichtstabilität.
 [12] a) N. Voyer, J. Lamothe, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9241–9284; b) N. Voyer, *Top. Curr. Chem.* **1996**, *184*, 1–37.
 [13] C. D. Bain, S. D. Evans, *Chem. Br.* **1995**, *31* (1), 46–48. ■ Please add the publication date or volume and issue number ■
 [14] L. A. Bumm, J. J. Arnold, M. T. Cygan, T. D. Dunbar, T. P. Burgin, L. Jones II, D. L. Allara, J. M. Tour, P. S. Weiss, *Science* **1996**, *271*, 1705–1707.
 [15] N. Voyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1818–1821.

Kristall-Engineering bei Melamin-Imid-Komplexen: Beeinflussung der Stöchiometrie durch sterische Hinderung an den Imid-Carbonylgruppen**

Ronald F. M. Lange, Felix H. Beijer, Rint P. Sijbesma, Rob W. W. Hooft, Huub Kooijman, Anthony L. Spek, Jan Kroon und E. W. Meijer*

Das unendliche, zweidimensionale Kristallgitter, das durch die Komplexbildung von Melamin mit Cyanursäure über drei Wasserstoffbrücken gebildet wird,^[1] war für die supramolekulare Chemie außergewöhnlich inspirierend.^[2] Anhand von Modellen wurde versucht, die Bildung dieser drei Wasserstoffbrückenbindungen nachzuahmen.^[3–9] Whitesides et al. gelang es, sechs Melaminmoleküle und sechs Moleküle eines Cyanursäurederivats über 36 Wasserstoffbrücken zu einem wohldefinierten Komplex zu verknüpfen.^[3] Mit substituierten Melaminen und Barbitursäurederivaten konnten sie darüber hinaus molekulare und gekräuselte Bänder sowie Rosetten aufbauen.^[4] Lehn et al. beschrieben eine Variante eines linearen Bandes.^[5] Bei der Komplexbildung von dialkylsubstituierten Melaminen mit einem Dimid entstehen dagegen helikale^[6] und röhrenförmige^[7] Nanostrukturen, und nach Ergebnissen von Rebek et al. kann ein Triamid als molekulare „Klemme“ für Melamin fungieren.^[8] Allerdings wurden bisher nur zwei kristalline Melamin-Komplexe publiziert.^[9]

Wir beschreiben hier die Herstellung supramolekularer 1:1-, 1:2- und 1:3-Komplexe aus Melamin und Imiden. Die Bereitschaft der Carbonylgruppen im Imid, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen, wird stark durch kleine Unterschiede in der molekularen Struktur beeinflusst. Infolgedessen kann die Stöchiometrie der supramolekularen Komplexe eingestellt werden – ein großer Schritt in Richtung auf Kristall-Engineering.^[10]

Bei der Cokristallisation von Melamin mit Succinimid im molaren Verhältnis zwischen 1:10 und 1:1 aus Wasser oder DMSO entsteht ein supramolekularer 1:1-Komplex. Mit einem Überschuß an Melamin bilden sich Kristalle aus reinem Melamin sowie solche des 1:1-Komplexes. Die Kristallstrukturanalyse ergab eine blattartige 1:1-Struktur (Abb. 1).^[11] In beiden Molekülen werden alle Donor- und Acceptorstellen für Wasserstoffbrückenbindungen genutzt.

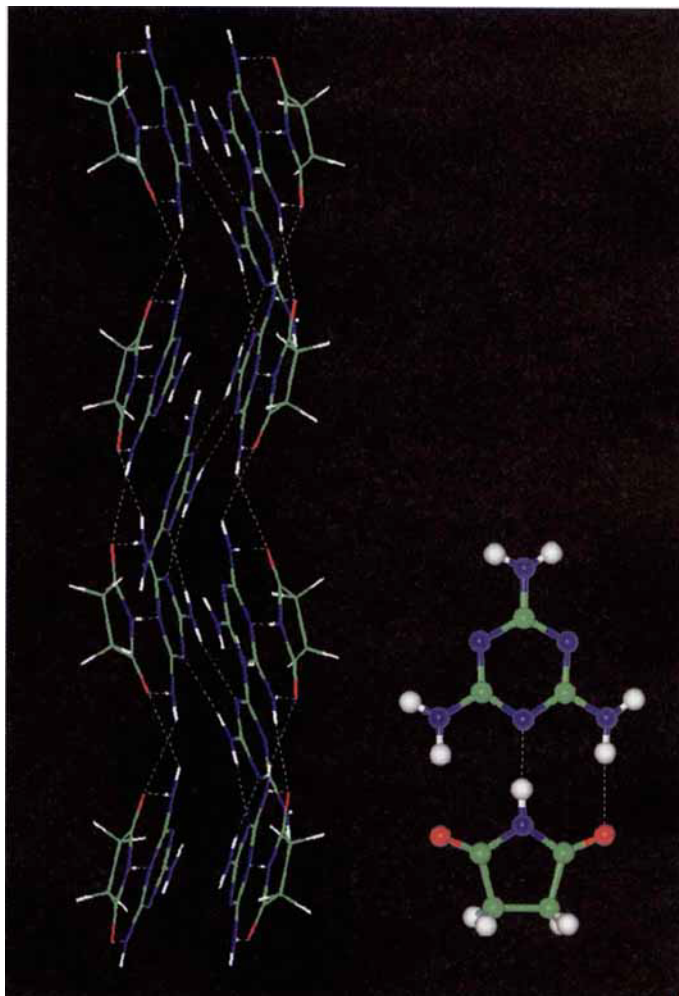


Abb. 1. Struktur des 1:1-Komplexes aus Melamin und Succinimid im Kristall (PLUTON-Ausdruck).

Überraschenderweise entsteht bei einem Melamin-Glutarsäureimid-Verhältnis zwischen 1:10 und 1:2 ein 1:2-Komplex. Die Kristallstrukturanalyse ergab eine „fischgrätenartige“ 1:2-Struktur (Abb. 2).^[12] In diesem Komplex ist eine der vier Carbonyl-Acceptorstellen des Imidmoleküls nicht an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt. Demnach sollte ein 1:3-Cokristall mit Melamin gebildet werden, wenn zwei der vier Carbonyl-Acceptorstellen eines Imidmoleküls maskiert sind. Melamin wurde daher mit Imiden (Adipinsäureimid, 2,3-Diphenylmaleinsäureimid, *o*-Phthalsäureimid, Dibenzoessäureimid und Naphthalin-1,8-dicarbonsäureimid) in unterschiedlichen Verhältnissen aus DMSO, DMF, Ethanol oder 1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) cokristallisiert. Einkristalle des gewünschten 1:3-Melamin-Imid-Komplexes wurden allerdings nicht erhalten.

[*] Prof. E. W. Meijer, F. H. Beijer, Dr. R. P. Sijbesma
 Laboratory of Organic Chemistry, Eindhoven University of Technology
 P. O. Box 513, NL-5600 MB Eindhoven (Niederlande)
 Telefax: Int. + 40/2451036
 E-mail: tigtobm@chem.tue.nl
 R. F. M. Lange
 DSM Research
 P. O. Box 18, NL-6160 MD Geleen (Niederlande)
 Dr. R. W. W. Hooft, Dr. H. Kooijman, Dr. A. L. Spek, Prof. J. Kroon
 Department of Crystal and Structural Chemistry, Bijvoet Center for Biomolecular Research
 University of Utrecht
 Padualaan 8, NL-3584 CH Utrecht (Niederlande)

[**] Die Autoren danken den Kollegen vom DSM Research und von der Universität Eindhoven für Diskussionen und Dr. B. Coussens für ihre Hilfe beim Molecular Modeling.