

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Gesamtfakultät für Mathematik,
Ingenieur- und Naturwissenschaften
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Thomas Heim
aus
Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2026

Peptidmembranen aus de novo designten Helix-Loop-Helix-Peptiden

Peptide Membranes From de novo Designed Helix-Loop-Helix Peptides

Gutachter: Prof. Dr. Franziska Thomas
Prof. Dr. Eva Blasco

„Nec scire fas est omnia”

– Horatius (65 v. Chr. – 8 v. Chr.)

Die Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurden unter Anleitung und Betreuung von Prof. Franziska Thomas im Zeitraum von März 2022 bis Oktober 2025 durchgeführt. Zwischen März 2022 und Februar 2024 wurden die Arbeiten am Institute for Molecular Systems Engineering and Advanced Materials (IMSEAM) der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg durchgeführt und ab Februar 2024 bis Oktober 2025 am Organisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg fortgesetzt. Die Arbeit wurde durchgehend vom Exzellenzcluster „3D Matter Made to Order“ gefördert.

Kurzzusammenfassung

Obwohl Liposomen in den letzten Jahrzehnten unter anderem für den Transport von Pharmazeutika und den Aufbau künstlicher Zellen genutzt wurden, ist ihre Synthese komplex und die breite, kostengünstige Anwendung eingeschränkt. Künstliche, auf Peptiden basierende Membranen bieten Vorteile im Hinblick auf die Einfachheit ihrer Synthese, der Vielfalt an chemisch modifizierbaren Bausteinen und der Fülle an möglichen Morphologien mit hoher Stabilität. Damit einher geht eine bessere Anpassungsfähigkeit an spezifische Anwendungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erweiterung des Feldes der amphiphilen Peptide um einen komplexen Baustein in Form des Helix-Loop-Helix-Motivs. Dieses Motiv umfasst zwei hydrophobe α -helikale Segmente, die durch eine hydrophile Schleife verbunden sind und wurde herangezogen, um die Designlimitierungen, vor allem linearer amphiphiler Peptide, zu umgehen. Die Synthese einer Bibliothek an Helix-Loop-Helix (HLH)-Peptiden erlaubte zudem die Analyse von Sequenz-Funktion-Beziehungen.

Es wurden repetitive Sequenzen hydrophober Aminosäuren zum Aufbau der Helixarme genutzt, während die hydrophilen Segmente aus Glycin, Prolin und verschiedenen positiv geladenen Aminosäuren aufgebaut wurden. Varianten der HLH-Peptide mit jeweils neun Alanin-Einheiten in den hydrophoben Segmenten bildeten keine stabilen dreidimensionalen Strukturen. Hingegen gelang eine erfolgreiche Selbstassemblierung in sphärische Peptidpartikel aus ethanolischer Lösung durch die Verwendung von Leucinresten in den hydrophoben Segmenten. Eine umfassende Charakterisierung der vierfach positiv-geladenen Stammverbindung **HLHP4** zeigte die Bildung diskreter Partikel mit Durchmessern von unter 100 nm mit α -helikaler Sekundärstruktur. Darüber hinaus wiesen die Partikel unter den richtigen Lagerungsbedingungen eine sehr gute Langzeitstabilität auf. Interessant war die Beobachtung einer temperaturinduzierten, irreversiblen Umwandlung zur β -Faltblatt-Sekundärstruktur bei Temperaturen um 50 °C. Basierend auf diesen Beobachtungen konnte **HLHP4** ebenfalls gezielt in Partikel mit β -Faltblatt-Sekundärstruktur assembliert werden, die sich von den α -helikalen Konformeren in den Eigenschaften unterschieden und beispielsweise Partikelfusion eingingen.

Unter der Verwendung α -helikaler Peptidpartikel von **HLHP4** konnte die Existenz einer hydrophoben Umgebung in den Partikeln mit umgebungssensitiven Farbstoffen und die erfolgreiche Einkapsulierung und Retention von Amplex® Red nachgewiesen werden. Die Gruppe an Leucin-haltigen Peptiden wurde um **HLHP5** und **HLHP6** erweitert, die sich in der Zusammensetzung der hydrophilen Schleife unterschieden. In **HLHP5** wurden vier

Argininreste durch Lysine ersetzt und die Länge der Schleife im Vergleich zu **HLHP4** konstant gehalten. In **HLHP6** wurde die hydrophile Region um eine Einheit verlängert und insgesamt fünf Argininreste verwendet. Dabei konnten sequenzabhängige Unterschiede zwischen den Peptidpartikeln beobachtet werden. **HLHP4** war dabei am stabilsten.

Abstract

Although liposomes are used for decades in drug delivery applications or construction of artificial cells, their synthesis is complex and they lack broad and economical applicability. Artificial peptide-based membranes offer many advantages over lipids, *e.g.* established and easy chemical synthesis, high number of chemically modifiable building blocks and a plethora of possible morphologies with high stability. All these factors enable a better tunability to specific applications.

The aim of this project was to expand the field of amphiphilic peptides by using the helix-loop-helix motif. This building block comprises two hydrophobic segments, which are connected by a hydrophilic loop. The higher complexity of this motif in comparison to linear amphiphilic peptides allows to circumvent their design limitations. The synthesis of a small library of helix-loop-helix (HLH) peptides shed light onto sequence-function-relationships of this class of peptides.

Both helical arms incorporated a repetitive sequence of hydrophobic amino acids. The hydrophilic segments encompassed glycine, proline and different positively charged residues. Variations of the HLH peptides incorporating nine alanine residues per hydrophobic area did not form stable three-dimensional structures. However, utilizing peptides with nine leucine residues per hydrophobic segment led to successful self-assembly into spherical particles starting from an ethanolic peptide solution. An extensive characterization of the first, fourfold positively charged variant **HLHP4** proved the formation of discrete particles with sub 100 nm diameters and α -helical secondary structure. These particles also exhibited excellent long-term stability under the right storage conditions. Most interestingly, an irreversible temperature induced transformation of secondary structure to β -sheet was observed at temperatures around 50 °C. Based on these results a straightforward preparation method for β -sheet **HLHP4** was found. These conformers showed different properties than the α -helical counterparts and underwent particle fusion.

The hydrophobic environment of the α -helical particles of **HLHP4** was successfully probed with environmental-sensitive dyes and the ability to encapsulate and retain Amplex® Red was shown as well. The group of leucin-rich HLH peptides was expanded by synthesizing **HLHP5** and **HLHP6**, which both displayed different loop compositions. In **HLHP5** four arginine residues were exchanged for lysine resulting in identical loop length compared to **HLHP4**. The hydrophilic segment was extended by one unit in **HLHP6** incorporating five arginine residues. The characterization of these peptides revealed sequence-dependent differences in the characteristics of the peptide particles with **HLHP4** being the most stable.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen.....	2
2.1	Definition der Begriffe Selbstassemblierung und Selbstorganisation	2
2.2	Aufbau der Lipide	3
2.3	Struktur sphärischer Assemblate.....	5
2.3.1	Membranen und Vesikel.....	5
2.3.2	Bicellen	8
2.3.3	Flüssig-Flüssig-Phasentrennung	9
2.4	Klassen amphiphiler Peptide.....	12
2.4.1	Lineare Amphiphile	12
2.4.2	Bolaamphiphile Peptide.....	14
2.4.3	Geminiamphiphile Peptide	16
2.4.4	Elastin-ähnliche Peptide.....	18
3	Zielsetzung	20
4	Ergebnisse und Diskussion.....	22
4.1	Designkonzept der Helix-Loop-Helix-Peptide	22
4.2	Synthese und Aufreinigung der Monomere	25
4.2.1	Syntheseplanung	25
4.2.2	Löslichkeit des Rohpeptids und Aufreinigung	27
4.3	Charakterisierung der Alanin Helix-Loop-Helix-Peptide	30
4.4	Charakterisierung der Leucin Helix-Loop-Helix-Peptide	31
4.4.1	Vorbereitung der Partikelpräparation.....	31
4.4.2	Partikelpräparation	32
4.4.3	Größenbestimmung der Partikel von HLHP4 in Lösung	32
4.4.4	Bestimmung der Sekundärstruktur von HLHP4	34
4.4.5	Visualisierung der Peptidpartikel von HLHP4 durch Elektronenmikroskopie.....	35
4.4.6	Zusammenfassung.....	40
4.5	Untersuchungen zur Langzeitstabilität der Partikel von α -helikalem HLHP4.....	41
4.5.1	Stabilitätsuntersuchungen mit DLS.....	41

4.5.2	Visualisierung der Partikelstabilität mit Elektronenmikroskopie.....	43
4.5.3	Weitere Stabilitätsmessungen.....	46
4.5.4	Gezielte Umwandlung der Sekundärstruktur.....	48
4.5.5	Zusammenfassung.....	50
4.6	Charakterisierung der β -Faltblatt-Konformere.....	51
4.6.1	Präparation der Konformere.....	51
4.6.2	Charakterisierung der β -Faltblatt-Partikel von HLHP4	52
4.6.3	Partikelstabilität der β -Faltblatt-Konformere.....	58
4.6.4	Zusammenfassung.....	62
4.7	Wechselwirkungen der Peptidpartikel mit Gast-Molekülen.....	63
4.7.1	Wechselwirkung mit Gast-Molekülen.....	63
4.7.2	Vorversuche des Amplex® Red Assay.....	64
4.7.3	Ergebnisse des Amplex® Red Assay.....	67
4.7.4	Zusammenfassung.....	69
4.8	Änderung der Membranfluidität der HLHP4-Partikel.....	70
4.9	Modifikationen der Loop-Sequenz.....	72
4.9.1	Grundlegende Charakterisierung.....	72
4.9.2	Stabilitätsexperimente.....	74
4.9.3	Schlussfolgerungen.....	78
4.9.4	Innere Struktur der HLH-Peptidpartikel.....	79
4.9.5	Zusammenfassung.....	80
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	81
6	Experimenteller Teil.....	89
6.1	Reagenzien und Lösungsmittel.....	89
6.2	Software für Datenanalyse und Visualisierung.....	90
6.3	Peptid-Synthese und Aufreinigung.....	90
6.3.1	Festphasenpeptidsynthese (SPPS).....	90
6.3.2	Abspaltung der Peptide.....	91
6.3.3	Aufreinigung der Peptide.....	91
6.3.4	Massenanalyse.....	93

6.4 Biophysikalische Analyse	94
6.4.1 Herstellung der Peptidfilme	94
6.4.2 Puffer Herstellung	95
6.4.3 Präparation der Peptidpartikel.....	96
6.4.4 Dynamische Lichtstreuung.....	96
6.4.5 Zeta-Potential Messungen	97
6.4.6 Circular dichroismus-Spektroskopie	98
6.4.7 Elektronenmikroskopie	100
6.4.8 Fluoreszenzmikroskopie.....	100
6.4.9 Fluoreszenzspektroskopie.....	100
6.4.10 Rasterkraftmikroskopie.....	101
6.4.11 Amplex® Red Assay	102
6.4.12 Einstellungen des Peptidsynthesizers	103
7 Literaturverzeichnis.....	105
8 Abkürzungsverzeichnis	115
9 Anhang	119
9.1 Übersicht der Peptide.....	119
9.1.1 HLHP1	119
9.1.2 HLHP1.1	120
9.1.3 HLHP2	121
9.1.4 HLHP2.1	122
9.1.5 HLHP3	123
9.1.6 HLHP3.1	124
9.1.7 HLHP4	125
9.1.8 HLHP4.1	126
9.1.9 HLHP5	127
9.1.10 HLHP6	128
9.2 Synthese und Aufreinigung der Monomere	129
9.3 Charakterisierung der Leucin Helix-Loop-Helix-Peptide	131
9.4 Untersuchungen zur Langzeitstabilität der Partikel von α -helikalem HLHP4.....	133

9.5 Charakterisierung der β -Faltblatt-Konformere	136
9.6 Wechselwirkung der Peptidpartikel mit Gast-Molekülen	138
9.7 Änderung der Membranfluidität der HLHP4-Partikel.....	141
9.8 Modifikationen der Loop-Sequenz.....	142
Danksagung	145
Publikationen.....	147
Publikationen als Hauptautor:	147
Publikationen als Co-Autor:.....	147
Posterpräsentationen	147
Eidesstattliche Versicherung.....	148

1 Einleitung

Lipide gehören neben Nucleinsäuren, Peptiden und Kohlenhydraten zu den fundamentalen Bausteinen des Lebens. Neben der Energiespeicherung und der Verwendung als Botenstoff ist ihre wichtigste Aufgabe die Bildung von Zellmembranen. Diese Membranen sind für alle Organismen unerlässlich, da sie Signalmoleküle transportieren, intrazellulären Transport regeln, sowie Zellen und Kompartimente definieren. Die Membranstruktur ist aus einer Doppelschicht an Lipiden aufgebaut, die sich durch den Prozess der Selbstassemblierung bilden. Triebkraft des Prozesses sind die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Fettsäureketten, die sich parallel zueinander orientieren, um die hydrophilen Kopfgruppen zu präsentieren und das umgebende Wasser aus dem Inneren auszuschließen. Grundlage der Selbstassemblierung sind die amphiphilen Eigenschaften der Lipide, die sich aus einem Aufbau mit mehreren hydrophoben Ketten und einer hydrophilen Kopfgruppe unterschiedlicher Funktionalität ergeben.^[1-4]

In vitro Studien von Lipiden werden bis heute mit Interesse durchgeführt, um den Aufbau und die Funktionsweise von Membransystemen zu verstehen und lipidische Strukturen für eigene Zwecke zu verwenden.^[4-7] Dazu gehören unter anderem der Aufbau künstlicher Zellen^[8-10] oder Transportsysteme für Pharmazeutika^[11-14]. Die *in vitro* Synthese von Lipiden umfasst allerdings einen vielschrittigen Prozess unter Verwendung mehrerer Enzyme, wodurch die Darstellung von Lipiden vergleichsweise komplex ist. Darüber hinaus kann die Stabilität von Liposomen durch verschiedene Faktoren, wie etwa Hydrolyse der Esterbindungen oder Oxidation ungesättigter Fettsäureketten, negativ beeinflusst werden. Aus diesen Einschränkungen folgen gleichermaßen Probleme bei der breiten und kostengünstigen Anwendung von Liposomen.^[12, 14, 15]

Um diese Limitierungen zu umgehen, wurden Lipidmimetika entwickelt, die sich über andere Synthesewege einfacher darstellen lassen. Diese verfügen ebenso über amphiphile Eigenschaften, sodass komplexe dreidimensionale Strukturen durch Selbstassemblierung aufgebaut werden können. Beispiele für solche Lipidmimetika sind unter anderem Blockpolymere^[16-21], Lipid/Peptid-Chimären^[21-27] und amphiphile Peptide.^[21, 28-34]

Besonders interessant sind dabei amphiphile Peptide, die ausschließlich aus Aminosäuren aufgebaut sind. Zum einen sind sie durch Festphasenpeptidsynthese sehr leicht zugänglich. Zum anderen zeichnen sich Peptide durch eine gute Biokompatibilität, hohe Stabilität und umfassende Modifizierbarkeit durch den Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren aus. Aufgrund der Vielfalt an komplexen Sekundär- und Tertiärstrukturen, verfügen Peptide über die wahrscheinlich größte strukturelle Diversität aller Biomoleküle.^[14, 35-39] Daher eignen sich amphiphile Peptide besonders gut als Baustein für selbstassemblierende Systeme und finden bereits Anwendung in verschiedenen Bereichen wie etwa der Medizin, Sensorik oder der Herstellung metallischer Nanomaterialien.^[14, 37, 39-41]

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Definition der Begriffe Selbstassemblierung und Selbstorganisation

Die Bildung supramolekularer Strukturen durch spontane Assoziation der Bausteine ist in der Natur weit verbreitet. Allerdings existieren zwei verschiedene Prozesse, die für die Bildung dieser Strukturen verantwortlich sind. Diese sind Selbstassemblierung und Selbstorganisation und werden oft unspezifisch für die Beschreibung ähnlicher Prozesse verwendet. Versuche, einen Unterschied zwischen den beiden Begriffen zu definieren, können von den thermodynamischen Grundlagen beider Prozesse ausgehen.^[36, 42, 43]

Selbstorganisation ist auf die Zufuhr externer Energie angewiesen. Bei Fehlen dieser Energiezufuhr beginnt das selbstorganisierte System zu zerfallen. Daher sind selbstorganisierte Systeme auf die Umgebung angewiesen und existieren in einem Nicht-Gleichgewichtszustand. Durch diese Offenheit zur Umgebung sind selbstorganisierte Systeme durch externe Muster beeinflussbar oder eingeschränkt.^[42, 44] Im Gegensatz dazu streben selbstassemblierte Systeme in Richtung eines Energieminimums und stehen im Gleichgewicht mit den Komponenten aus denen die Strukturen gebildet werden. Dieses Gleichgewicht wird dadurch ermöglicht, dass diese Strukturen über eine Vielzahl nicht-kovalenter Wechselwirkungen stabilisiert werden. Zu diesen gehören ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, π - π -Wechselwirkungen, Metall-Ligand-Interaktionen und van-der-Waals-Kräfte. Diese Wechselwirkungen sind, im Gegensatz zu kovalenten Bindungen, reversibel und lassen daher einen Austausch der einzelnen Komponenten zu. Zugleich besitzen selbstassemblierte Systeme dadurch eine intrinsische Fähigkeit zur Fehlerkorrektur.^[14, 35, 36, 42, 43]

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Prozessen ist die Art und Weise wie Strukturinformationen der Monomere in die Architektur der komplexen Struktur einfließen. Bei selbstassemblierenden Strukturen sind der Assemblierungsprozess in den Eigenschaften der Monomere kodiert (Spezifität) und die Wechselwirkungen zielgerichtet (Direktionalität). Diese haben Auswirkungen auf die dreidimensionale Struktur der resultierenden Assemblate. So ziehen sich etwa entgegengesetzt geladene Gruppen an, während sich gleich geladene Gruppen abstoßen. Auch können beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen zwischen bestimmten Gruppen stärker sein, als zwischen anderen und somit eine Ausrichtung der Monomere festlegen. Selbstorganisierte System hingegen bilden spontane Muster aus einem vorher homogenen System.^[36, 42, 43]

Viele selbstassemblierte Strukturen sind hoch symmetrisch, woraus sich einige Vorteile ergeben. Zum einen sind die Strukturinformationen eines Monomers für die Konstruktion des gesamten Gebildes ausreichend. Damit wird gleichzeitig das Problem umgangen, dass eine Ansammlung an identischen Bausteinen eine beschränkte Informationsdichte besitzt. Zudem kann die Fehlerkorrektur durch Austausch einer der identischen Untereinheiten einfach

durchgeführt werden. Ein Fehler in einer Untereinheit führt nicht direkt zum Verlust der Struktur des gesamten Komplexes. Zudem wird jede Untereinheit von benachbarten Einheiten beeinflusst (Kooperativität).^[36, 45]

Eine klare Abgrenzung zwischen den beiden Prozessen ist jedoch nicht immer möglich. Besonders *in vivo* findet Selbstassemblierung nicht im thermodynamischen Gleichgewicht statt. Die gebildeten Strukturen sind daher metastabil und teilweise auf die Zufuhr externer Energie angewiesen. Ein Beispiel hierfür ist die Assemblierung von Microtubuli. Diese selbstassemblieren unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen in Zellen und können ebenso wieder deassemblieren. Noch während des Aufbaus wird durch Hydrolyse von GTP durch β -Tubulin Energie freigesetzt. Die Energiezufuhr destabilisiert die Microtubuli, bis sie schließlich zerfallen. Damit unterliegt das gesamte System einer dynamischen Instabilität, in der Microtubuli ständig auf- und wieder abgebaut werden. Daher kann der gesamte Prozess als eine selbstassemblierungsvermittelte Selbstorganisation beschrieben werden.^[42, 43, 46-48]

2.2 Aufbau der Lipide

Lipide sind lineare Moleküle, die aus einer hydrophoben und einer hydrophilen Komponente aufgebaut sind. Die hydrophobe Komponente umfasst im Allgemeinen mehrere Fettsäuren, die sowohl gesättigt als auch ungesättigt sein können. In biologischen Systemen haben Fettsäuren immer eine gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen zwischen 14 und 24 Einheiten. Fettsäuren mit 16 oder 18 Kohlenstoffatomen sind dabei am häufigsten. Die hydrophile Komponente wird aus einer polaren Gruppe, z.B. Phosphatidylcholin, gebildet (Abbildung 1). *In vivo* existieren mehrere tausend verschiedene Lipide, die sich in der Zusammensetzung der Fettsäuren und Kopfgruppen unterscheiden. Dabei beeinflussen sowohl Kopfgruppe als auch hydrophobe Ketten die Eigenschaften der Lipide und sind auf die jeweilige Aufgabe abgestimmt. So bilden beispielsweise Phospholipide die Hauptkomponente in Zellmembranen von Eukaryoten.^[1-3, 11]

Das gleichzeitige Vorliegen hydrophiler und hydrophober Gruppen im gleichen Molekül auf gegenüber liegenden Seiten wird als Amphiphilie bezeichnet und bildet die wichtigste Charakteristik der Lipide. Dadurch wird ihnen ermöglicht in wässriger Umgebung zu komplexen Biomembranen zu assemblieren (s. Abschnitt 2.3.1).^[1, 3, 4]

Die meisten Lipide können unter physiologischen Bedingungen in mindestens zwei Phasen vorliegen. Dabei sind die feste Phase (*solid-gel*, L_{β}) und die flüssige Phase (*liquid-disordered*, L_{α}) die wichtigsten Zustände. In der festen Phase verhalten sich die Lipide wie ein Festkörper mit dicht gepackten Fettsäureketten. In der flüssigen Phase sind die Monomere deutlich ungeordneter und weisen eine höhere Beweglichkeit auf. Die Fluidität des Ensembles hängt direkt mit der Phasenübergangstemperatur der Lipide zusammen. Die Phasenübergangstemperatur eines einzelnen Lipids wird von der Länge der Fettsäurekette

und dem Sättigungsgrad der Fettsäuren beeinflusst und beschreibt die Temperatur, bei der 50 % der Lipide in der Suspension von der festen, in die flüssige Phase übergegangen sind. Gesättigte Fettsäuren erhöhen die Phasenübergangstemperatur, da die geraden Kohlenwasserstoffketten gut miteinander wechselwirken können. Eine *cis*-Doppelbindung, wie sie in ungesättigten Fettsäuren vorkommt, verursacht hingegen einen Knick in der Kette und senkt damit die Phasenübergangstemperatur, da die Dichte der Packung herabgesetzt wird.^[1, 3, 49, 50]

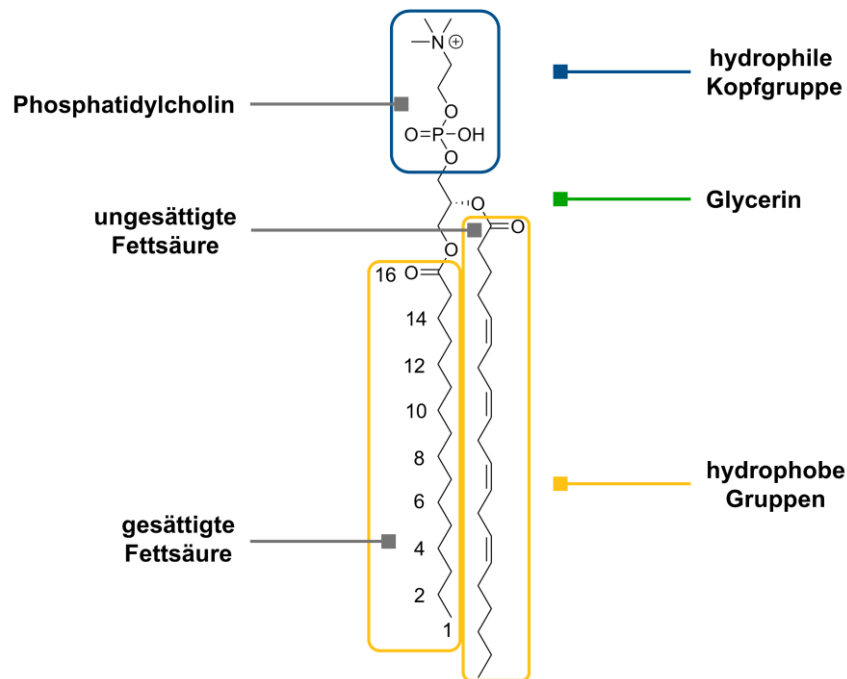


Abbildung 1. Struktur eines membranbildenden Phosphatidylcholin-Lipids mit je einer gesättigten und ungesättigten Fettsäurekette.^[3]

Alternativ wird die Fluidität einer Membran bei Säugetieren über die Interkalation von Cholesterin geregelt. Cholesterin wird ebenfalls zu den Lipiden gezählt, besitzt aber ein Steroidgerüst. Die Amphiphilie wird durch eine Hydroxylgruppe am Ende des Gerüsts vermittelt (Abbildung 2). Dadurch kann sich Cholesterin parallel zu den Fettsäureketten in die Membran einlagern, wobei die Hydroxylgruppe mit der Kopfgruppe der Phospholipide in Wechselwirkung tritt. Folglich verringern sich die Wechselwirkungen zwischen den Lipidmolekülen, sodass die Fluidität zunimmt.^[1, 11, 51]

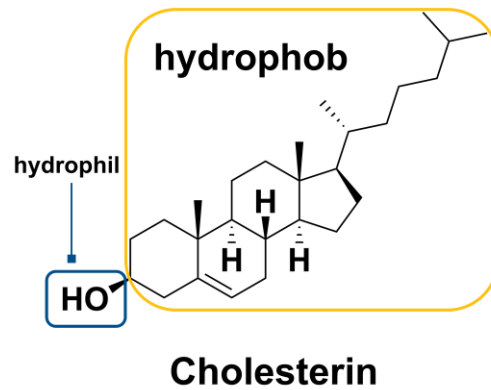


Abbildung 2. Struktur von Cholesterin.^[3] Die hydrophilen (blau) und hydrophoben Anteile (gelb) sind farblich markiert.

2.3 Struktur sphärischer Assemblate

Die Existenz von Kompartimenten ist entscheidend für den Metabolismus von Zellen, in denen verschiedene biochemische Reaktionen ohne gegenseitige Beeinflussung parallel ablaufen müssen. Dazu werden die Reaktionspartner in lokalisierten Umgebungen, den sogenannten Kompartimenten, eingeschlossen.^[1, 3, 52]

Die Kompartimentierung in Zellen kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Viele klassische Organellen, wie der Golgi-Apparat oder das endoplasmatische Retikulum, sind von einer Lipid-Doppelschicht umgeben, die ein Kompartiment bildet. Es wurden aber ebenso einige Kompartimente entdeckt, die nicht von einer Membran umschlossen sind. Diese werden oft als biomolekulare Kondensate beschrieben und bilden sich durch den Prozess der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (*liquid-liquid phase separation*, LLPS).^[1, 3, 53, 54] Im Folgenden werden die Grundlagen beider Prozesse beleuchtet.

2.3.1 Membranen und Vesikel

Die Struktur amphiphiler Moleküle legt im wässrigen Medium die Richtung der Wechselwirkungen eindeutig fest (Direktionalität). Polare Gruppen orientieren sich in Richtung des wässrigen Lösungsmittels, während sich unpolare Gruppen vom Wasser abwenden und sich durch hydrophobe Wechselwirkungen gegenseitig stabilisieren. Damit ist die Struktur in den Eigenschaften der Monomere angelegt (Spezifität). Vor allem hydrophobe Kräfte bilden die Triebkraft dieser Selbstassemblierung.^[1, 3, 4, 11]

Die Micelle ist die einfachste Struktur, die sich unter diesen Voraussetzungen im wässrigen Medium bilden kann. Die polaren Gruppen zeigen nach außen und führen zu einer Zusammenlagerung der hydrophoben Teile in der Mitte der Struktur unter Ausschluss von Wasser (Abbildung 4). Daher sind Micellen vergleichsweise klein und haben Durchmesser von nicht mehr als 20 nm. Die sogenannte kritische Micellenkonzentration (*critical micelle concentration*, CMC) gibt Aufschluss über die minimale Konzentration an Amphiphil, die für die Bildung von Micellen benötigt wird.^[1, 14, 55]

Alternativ können die Eigenschaften amphiphiler Moleküle auch zur Bildung einer Membran führen. Dabei lagern sich zwei Lagen der Amphiphilen zu einer Doppelschicht zusammen, in der die hydrophoben Regionen in einer inneren Schicht wechselwirken, während die hydrophilen Gruppen oberhalb und unterhalb mit dem Lösungsmittel interagieren (Abbildung 3). Doppelschichten können Partikel bilden, die deutlich größer als Micellen sind und, wie z.B. in Zellen, makroskopische Dimensionen erreichen. In der Mitte der Membran bildet sich ein hydrophober Innenraum, der die Diffusion wasserlöslicher Moleküle erschwert. So durchqueren Moleküle die Membran umso langsamer, je polarer sie sind. Ein beschleunigter Transport durch die Membran erfolgt in biologischen Systemen über Membranproteine in der Doppelschicht.^[1, 3, 14]

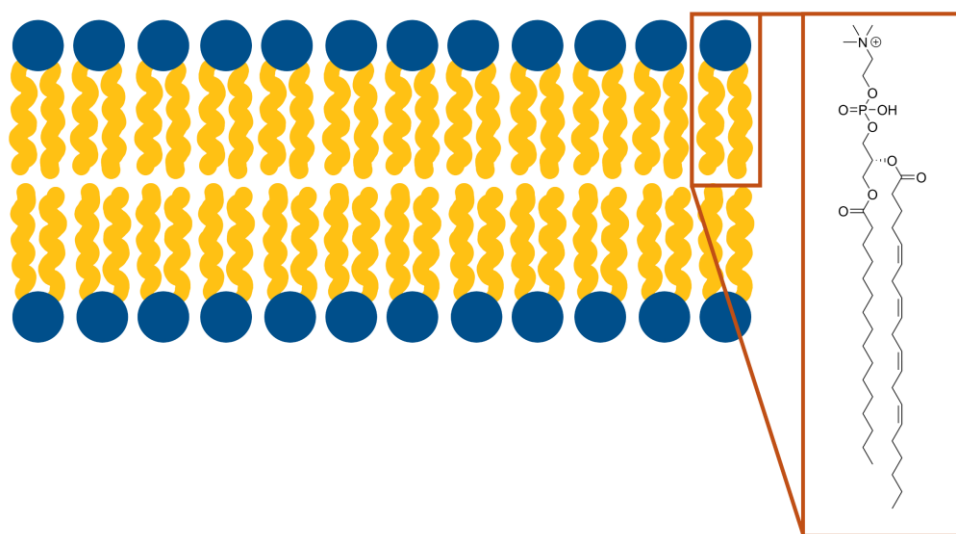


Abbildung 3. Schematischer Längsschnitt durch eine Membran am Beispiel einer Lipid-Doppelschicht. Die hydrophoben Regionen sind gelb und die hydrophilen Segmente blau dargestellt. In der Box ist beispielhaft die chemische Struktur eines Membranlipids gezeigt.^[3] Schematische Zeichnung © Morten Mosbach, M.Sc. wurde für die Arbeit zur Verfügung gestellt.

Bei Lipiden entscheidet der sterische Anspruch der hydrophoben Ketten über die Bildung einer Doppelschicht oder einer Micelle. Normalerweise sind die beiden Fettsäureketten der Lipide sterisch zu anspruchsvoll, um eine Micelle zu bilden. Daher entstehen hier Doppelschichten. Salze der Fettsäuren und andere Tenside sind hingegen sterisch weniger anspruchsvoll und bilden Micellen.^[1, 17, 56]

Aus amphiphilen Molekülen lassen sich *in vitro* Vesikel herstellen. Dabei handelt es sich um wässrige Kompartimente, die von einer Doppelschicht umgeben sind (Abbildung 4). Um an den Rändern der Membran den Kontakt der hydrophoben Regionen mit dem umliegenden Wasser zu vermeiden, bilden sich kugelförmige Strukturen. Im inneren Hohlraum bleiben die Vesikel mit wässrigem Medium gefüllt. Sind bei der Herstellung der Vesikel weitere Moleküle in der Lösung vorhanden, lassen sich diese in die Vesikel einschließen. Im Anschluss können die umgebenden Moleküle beispielsweise mittels Dialyse oder Gelfiltration abgetrennt werden. Hydrophobere Moleküle können in die Membran eingeschlossen werden, sodass ein

gleichzeitiger Transport von hydrophoben und hydrophilen Molekülen möglich ist. Lipidvesikel, sogenannte Liposomen, werden zur Untersuchung von Membraneigenschaften und zum Transport von Arzneistoffen in der Medizin eingesetzt. Die Eigenschaften der Liposomen können dabei an die vorgesehene Anwendung angepasst werden. Beispielsweise lassen sich durch Verwendung von Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) pH-sensitive Liposome herstellen. Kationische Lipide wie etwa *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) eignen sich zum Transport von und an DNS, da die negative geladene DNS an die Liposomen bindet. Durch Dekoration von Vesikeln mit Erkennungsmotiven können gewünschte Zellrezeptoren gezielt angesteuert werden.^[1, 4, 11, 14, 52, 57, 58]

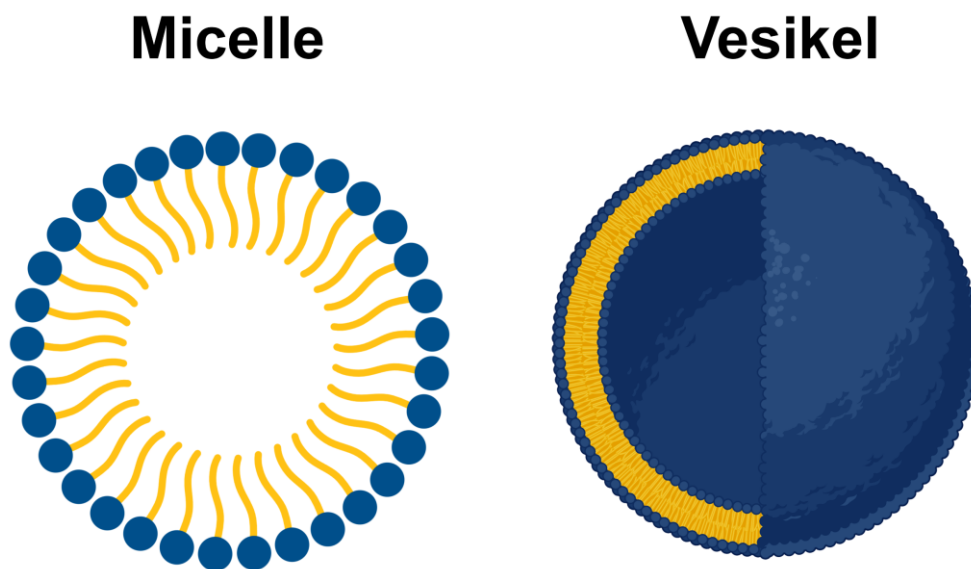


Abbildung 4. Schematische Darstellungen einer Micelle und eines Vesikels. Die hydrophoben Segmente sind gelb markiert und die hydrophilen Regionen blau. Die Abbildung wurde mit *BioRender.com* erstellt.

Vesikel können, je nach Präparationsmethode, in unterschiedlichen Größen erhalten werden, für die eine feste Nomenklatur existiert. Es wird zunächst zwischen multilamellaren Vesikeln (MLV) und unilamellaren Vesikeln (ULV) unterschieden, die sich in der Anzahl an Doppelmembranen (Lamellen) unterscheiden. MLV bilden sich im Falle von Lipiden meist spontan bei Rehydratisierung der getrockneten Substanz. Aus diesen müssen unilamellare Vesikel zur Zufuhr von Energie erhalten werden, da diese Systeme eine höhere freie Energie besitzen als MLV. Diese Energie kann beispielsweise über Ultraschall oder Extrusion zugeführt werden. Für ULV existiert zusätzlich eine Einteilung nach Partikelgröße, in der kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUV) im Größenbereich unter 100 nm, große unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles*, MLV) im Bereich zwischen 100 nm und 1 µm und gigantische unilamellare Vesikel (*giant unilamellar vesicles*, GUV) bei Größen über 1 µm verortet sind.^[52, 58] Liposomen bestimmter Größe lassen sich mittels unterschiedlicher Methoden gezielt herstellen.^[52, 59]

2.3.2 Bicellen

Eine weitere membranartige Struktur sind die sogenannten Bicellen. Das Wort Bicelle setzt sich aus den englischen Begriffen *Bilayered Micelle* zusammen und deutet damit die Struktur der Bicellen an. Die häufigste Topologie von Bicellen sind flache Scheiben mit einem Durchmesser von 20 nm bis 50 nm, die auch als flach gepresste Micellen interpretiert werden können. Aufgrund der Größe und der einfachen Handhabung eignen sich diese scheibenförmigen Doppelschichten beispielsweise sehr gut als Modellsysteme zur Untersuchung und Kristallisation von Membranproteinen. Neben der Verwendung gesättigter Fettsäuren, ist auch die Selbstassemblierung mit Lipiden mit ungesättigten Fettsäureketten und Cholesterol möglich, wobei die Auswirkungen auf die Membranfluidität vergleichbar mit der in Vesikeln sind.^[6, 7, 56, 60]

Im Falle von Lipiden lassen sich Bicellen, bei Wahl der richtigen Bedingungen, aus einer Mischung eines membranbildenden Lipids und einer kleineren Komponente (Lipid oder Tensid) erhalten, wobei sich die Zusammensetzungen und die relevanten externen Parameter für jedes Gemisch unterscheiden können. Die scheibenförmige Doppelschicht wird durch das länger-kettige Molekül gebildet, während sich die kleinere Komponente am Rand der Scheibe anlagert (Abbildung 5).^[6, 7, 56, 60]

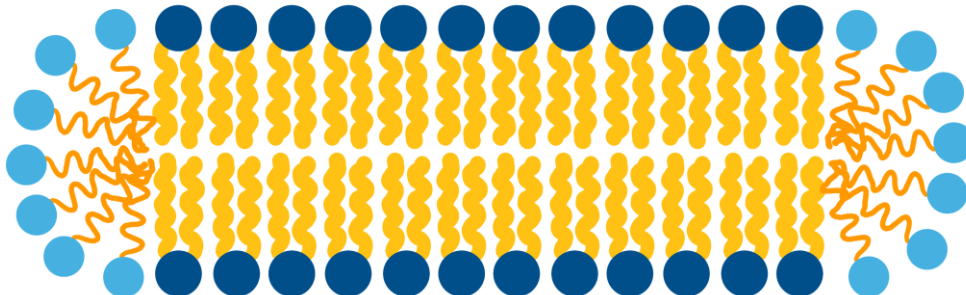


Abbildung 5. Schematischer Längsschnitt durch eine Bicelle nach Ref. [6, 60]. Die membranbildende Komponente ist in gelb/dunkelblau in der Mitte der Struktur dargestellt. Das Tensid (orange/hellblau) ist an der Seite der Scheibe angelagert, um den Kontakt der hydrophoben Regionen mit dem wässrigen Medium an der Seite zu verhindern. Schematische Zeichnung © *Morten Mosbach, M.Sc.* wurde für die Arbeit zur Verfügung gestellt.

So existiert beispielsweise für das Lipidgemisch Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)/Dicaprylphosphatidylcholin (DCPC) die Möglichkeit zur Bildung von Bicellen. Diese hängt von der Temperatur der Präparation ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $45\text{ }^{\circ}\text{C}$), dem Verhältnis der Lipide in der Mischung ($\sim 87\text{ mol-}\%$ bis $65\text{ mol-}\%$ DMPC zu DCPC, beschrieben als molares Verhältnis der langkettigen zur kurzkettigen Komponente q) und dem Ausmaß der Hydratation ($\sim 65\text{ }\%$ bis $95\text{ }\%$) ab. Die Bedingungen beeinflussen sich gegenseitig, sodass bei einer gewählten Temperatur nur gewisse Werte des Mischungsverhältnisses und der Hydratation möglich sind. Außerhalb dieses Fensters liegen verschiedene Mischungen beider Komponenten vor, ohne dabei eine Bicellen-Struktur zu bilden.^[6, 7, 56, 60]

Um Bedingungen für die Bildung von Bicellen zu finden, werden Röntgen- und Neutronenbeugung, Elektronenspinresonanz oder Kernresonanzspektroskopie (NMR) verwendet, um „Phasen“diagramme des Gemisches aufzustellen. Dabei handelt es sich allerdings nicht um Phasendiagramme im klassischen Sinn, da keine Umwandlungsenthalpie gemessen werden kann. Auch computerstützte Berechnungen zur Ermittlung der optimalen Bedingungen sind möglich.^[6, 56]

2.3.3 Flüssig-Flüssig-Phasentrennung

In vivo finden sich auch Kompartimente, die nicht von einer Membran umgeben sind. Diese sogenannten membranlosen Kompartimente (*membraneless compartments*) oder biomolekularen Kondensate werden durch den Prozess der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (*liquid-liquid phase separation*, LLPS) gebildet. Im Allgemeinen bezeichnet LLPS einen Prozess, bei dem sich ein homogenes Gemisch verschiedener Komponenten spontan in zwei flüssige Phasen trennt. Die erhaltenen Phasen unterscheiden sich drastisch in der Konzentration der Bestandteile. Wird beispielsweise ein Gemisch aus Wasser und Peptid betrachtet, so führt die LLPS zu einer Phase, die eine hohe Konzentration an Peptid aufweist, während die Peptidkonzentration in der verbleibenden wässrigen Phase deutlich geringer ist. Triebkraft der LLPS ist die Minimierung der Gibbs-Energie des Systems beim Austausch der Peptid-Wasser-Wechselwirkungen gegen Peptid-Peptid- und Wasser-Wasser-Wechselwirkungen. Das Auftreten einer Phasentrennung ist abhängig von mehreren Faktoren, wie etwa der Konzentration und den Eigenschaften der beteiligten Komponenten und externen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentration. Daher lassen sich für Systeme, die einer LLPS unterliegen, experimentell Phasendiagramme definieren, in denen die Rahmenbedingungen für eine Phasentrennung aufgezeigt sind. Außerhalb dieser Bedingungen (z.B. bei zu geringer Konzentration der einen oder anderen Komponente) liegt eine homogene Lösung vor (Abbildung 6).^[53, 61-65]

Die Initiation und Aufrechterhaltung biomolekularer Kondensate wird häufig mit dem Gerüst-Klient (*scaffold and client*) -Modell beschrieben. Dabei bilden Gerüstproteine durch viele verschiedene Wechselwirkungsdomänen ein strukturelles Netzwerk. In diese Netzwerke können sich verschiedene Klienten begeben, die ohne Gerüst keine Phasentrennung eingehen würden. Während der Phasentrennung der Gerüstproteine werden die Klienten in die kondensierte Phase eingeschlossen. Die Struktur der Gerüstproteine umfasst im Allgemeinen entweder viele gefaltete Domänen, die mit kurzen Motiven anderer Proteine interagieren oder häufig sogenannte intrinsisch-ungeordnete Regionen. Diese sind ungefaltete Proteindomänen mit vielen Angriffspunkten für intermolekulare Wechselwirkungen. Obwohl diese Regionen eine hohe Diversität in der Sequenz aufweisen, sind sie oft durch eine überproportional hohe Anreicherung bestimmter Aminosäuren charakterisiert, die die

Wechselwirkungen zur LLPS vermitteln. Die Art der Wechselwirkungen und die vermittelnden Aminosäuren sind in Abbildung 7 dargestellt. Diese ungeordneten Regionen dienen als „Sticker“, die den Kondensationsprozess vermitteln und sind durch geordnete Regionen („*spacer*“) unterbrochen. Intrinsisch-ungeordnete Regionen verkörpern das für LLPS wichtige Prinzip der Multivalenz. Dem entsprechend enthalten die kondensierenden Proteine viele verschiedene Domänen oder Motive (Valenzen), mit denen sie Interaktionen eingehen können. Intrinsisch-ungeordnete Proteine spielen eine Rolle in pathologischer Proteinaggregation und werden mit der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht.^[53, 61, 62, 64, 66]

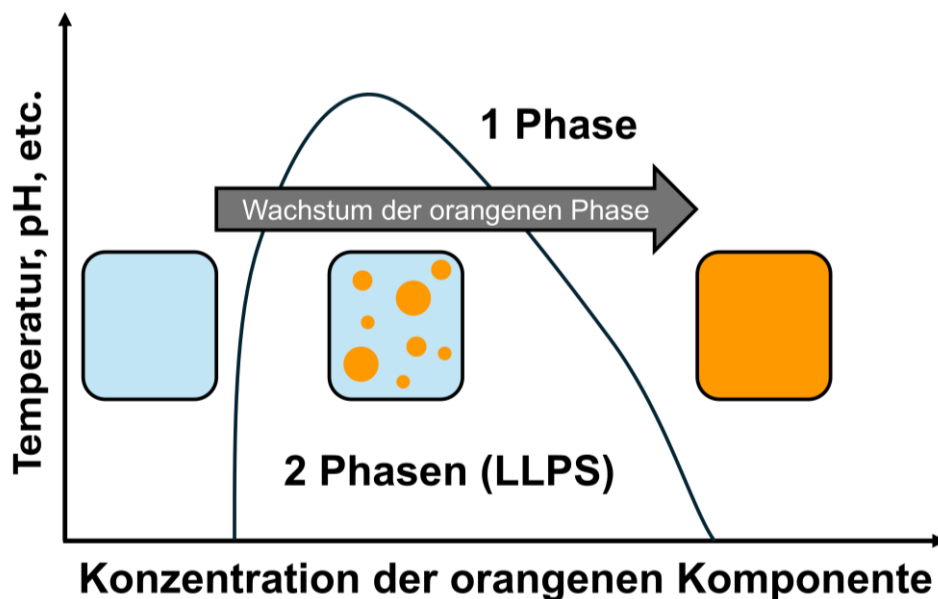


Abbildung 6. Beispiel eines Phasendiagramms für die LLPS eines Gemisches einer hellblauen und orangenen Komponente nach Ref. [61]. Eine Phasentrennung liegt nur in dem Bereich unterhalb der Kurve vor. Bei einer Erhöhung der Konzentration der orangenen Komponente kommt es zunächst zu einer Phasentrennung. Bei zunehmender Konzentration fusionieren die orangenen Tröpfchen bis eine homogene Lösung der orangenen Komponente vorliegt.

Aufgrund des Entstehungsprozesses und dem Fehlen einer Fernordnung der Moleküle ähnelt das Verhalten der Kondensate einer LLPS dem von Flüssigkeiten. Sie fusionieren und weisen eine Oberflächenspannung auf. Die Kombination dieser Eigenschaften mit dem Fehlen einer Barriere in Form einer Membran, erleichtert den Austausch von Molekülen mit der Umgebung im Vergleich zu Vesikeln. Da bei der Bildung der Kondensate eine große Menge Wasser eingeschlossen wird, können auch in diesen Kompartimenten isolierte Enzymreaktionen stattfinden. Die Bildung der kondensierten Phasen ist oft reversibel. Die Kondensate können aber auch einem Reifungsprozess unterliegen, in Folge dessen sie ihren flüssigen Charakter verlieren. Die Dauer des Reifungsprozesses hängt von der Sequenz des Peptids ab und kann bei natürlichen aggregationsneigenden Proteinen bereits innerhalb einer Stunde ablaufen. Der Übergang vom flüssigen in den festen Zustand kann auch zur Bildung Amyloid-artiger Fasern führen, deren Bildungsprozess nicht reversibel ist.^[53, 61-65]

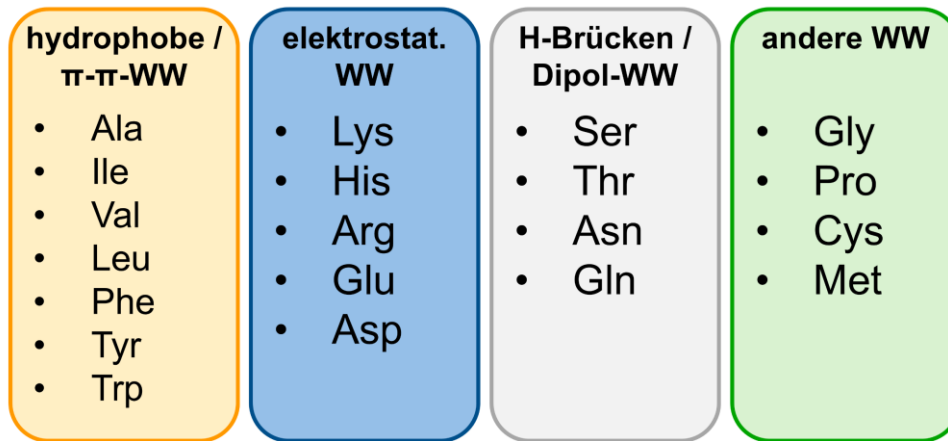


Abbildung 7. Übersicht der Wechselwirkungen (WW) nach Ref. [66], die eine LLPS vermitteln können. Die Wechselwirkungen sind in vier Klassen aufgeteilt und die vermittelnden Aminosäuren jeder Klasse mit ihrem Dreibuchstabencode aufgeführt.

Experimentell kann der Nachweis einer LLPS mit verschiedenen Methoden erfolgen. Flüssige Phasen mit Durchmesser im Bereich einiger hundert Nanometer lassen sich mittels Lichtstreuung nachweisen und analysieren. Größere Kondensate, im Bereich einiger Mikrometer, können durch Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.^[61, 63-68] Mittels Fluoreszenzmikroskopie lässt sich zudem ein Unterschied zwischen Kondensaten und Vesikeln feststellen. Letztere weisen im Unterschied zu Kondensaten nur eine Fluoreszenz im Bereich der Doppelmembran auf, während das Innere dunkel erscheint.^[8, 67] Ein konstantes Partikelwachstum ist ein weiterer Hinweis auf Kondensate. Ein Wachstum wird allerdings durch einen Übergang in die feste Phase verhindert. Zuletzt können auch Verdünnungsexperimente eine LLPS nachweisen, da die Kondensate nur unter bestimmten Konzentrationsverhältnissen auftreten.^[61, 65, 68]

Ein Minimalmodell für die Phasentrennung eines Peptids wurde unter anderem von Abbas *et al.* beschrieben. Sie synthetisierten basierend auf dem *sticker-spacer*-Modell verschiedene Kombinationen eines Dipeptids unter der Verwendung von Phenylalanin, Tryptophan oder Leucin und verbanden zwei Dipeptide mit Disulfidbrücken verschiedener Länge. Dabei beobachteten sie je nach Dipeptid und Brückenlänge entweder Aggregation oder Phasentrennung. Die Phasentrennung wurde durch Änderung des pH-Werts initiiert. Neben pH-Wert-Änderungen waren Temperatur und organische Lösungsmittel Einflussfaktoren der Phasentrennung. Durch den redoxaktiven Charakter des Disulfids ließen sich die Kondensate ebenso unter reduktiven Bedingungen auflösen und reversibel durch Oxidation wieder bilden. Die Kondensate waren einige Mikrometer groß und ließen sich somit im Fluoreszenzmikroskop nachweisen. Zudem konnte Partikelfusion gezeigt werden. Neben der Aufnahme verschiedener Farbstoffe, konnten die Partikel auch für isolierte chemische Reaktionen verwendet werden. Da im Inneren des Kompartiments Molekülkonzentrationen lokal erhöht sind, verbesserten sich Reaktionsraten im Vergleich zur wässrigen Lösung deutlich. Eine

Aufnahme von *p*-Nitrobenzaldehyd und Cyclohexanon in die Partikel führte beispielsweise zu einer beschleunigten Aldolreaktion in den Kondensaten, dessen Rate je nach Sequenz der Dipeptide etwa 44- bis 300-fach höher war als in Lösung.^[63]

2.4 Klassen amphiphiler Peptide

Wie bereits zuvor gezeigt wurde, ist die Amphiphilie der Lipide der Schlüssel zu ihrer Selbstassemblierung in wässriger Lösung.^[1, 3, 4] Allerdings können Membranen auch durch andere amphiphile Bausteine gebildet werden. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche amphiphile Moleküle entwickelt und deren Selbstassemblierungsprozesse untersucht. Dabei wurden auch einige Peptidamphiphile entwickelt. Aufgrund der einfachen und gut entwickelten Synthese, der Vielfalt an möglichen natürlichen und künstlichen Aminosäuren und der Vielzahl an intermolekularen Wechselwirkungen, eignen sich Peptide hervorragend für die Selbstassemblierung in komplexe dreidimensionale Strukturen und ermöglichen zudem anwendungsspezifische Anpassungen der molekularen Eigenschaften.^[14, 16, 21, 39, 69-71]

Im Rahmen dieser Arbeit sollen im Folgenden lediglich die Amphiphilen betrachtet werden, die vollständig aus Aminosäuren aufgebaut sind. Zur besseren Übersicht werden diese in verschiedene Klassen basierend auf der Struktur der Monomere eingeteilt (Abbildung 8).

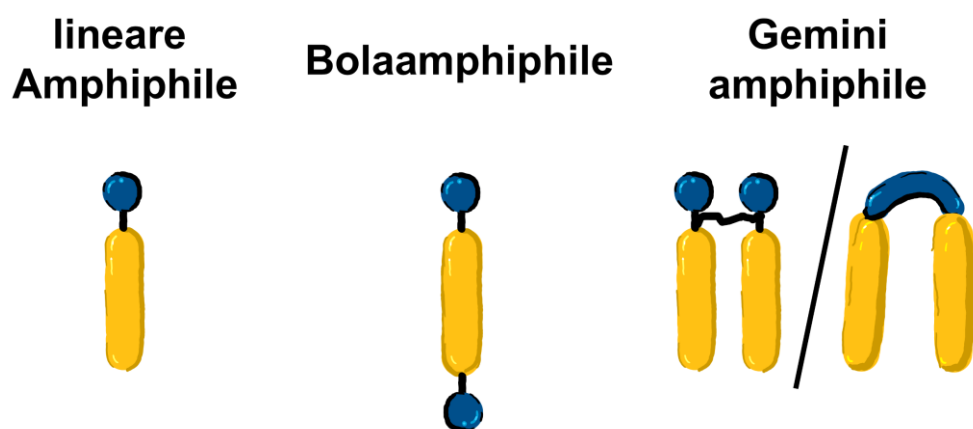


Abbildung 8. Schematische Darstellung verschiedener peptidbasierter Amphiphile. Die hydrophoben Regionen sind gelb dargestellt und die hydrophilen Regionen blau. Schematische Zeichnung © Morten Mosbach, M.Sc. wurden für die Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.4.1 Lineare Amphiphile

Die vermutlich größte Gruppe amphiphiler Peptide bilden die linearen Amphiphile. Diese besitzen eine einfache lineare Struktur, die aus einer repetitiven Sequenz hydrophober Aminosäuren mit einer geringeren Anzahl hydrophiler Aminosäuren als Kopfgruppe besteht. Durch ihre lineare Struktur ähneln diese Peptide zudem waschaktiven Substanzen, weshalb sie auch als *surfactant-like peptides* bezeichnet werden. Im Allgemeinen werden nur zwei Aminosäuren für den Aufbau des Amphiphils benötigt (je eine hydrophobe und eine hydrophile). Als hydrophobe Aminosäuren werden meist Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin und

Glycin verwendet. Die Kopfgruppe wird meist aus Arginin, Histidin, Lysin, Aspartat oder Glutamat gebildet. Im Allgemeinen assemblieren diese Peptide in fibrilläre, tubuläre oder partikuläre Strukturen. Triebkräfte für die Strukturbildung sind neben der Assoziation hydrophober Bereiche auch Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen und, falls möglich, Metallkoordination.^[28, 31, 72-80]

Aufgrund der Vielzahl an untersuchten Sequenzen konnten einige Sequenz-Struktur-Beziehungen für lineare Amphiphile gezeigt werden. So wurde beispielsweise der Einfluss der Länge der hydrophoben Kette auf die Nanostrukturen im Vergleich der Peptide A₃K, A₆K und A₉K untersucht. Während A₃K gestapelte Doppelmembranen bildete, formten sich bei A₆K Nanoröhren und bei A₉K Nanostäbe. Triebkraft der Strukturänderung war vor allem der Energiegewinn bei der Assoziation hydrophober Bereiche, der mit der Länge der hydrophoben Einheit zunimmt.^[74] Beim Vergleich von I₆K₂, L₆K₂ und V₆K₂ zeigten sich unterschiedliche Strukturen in Abhängigkeit der hydrophoben Aminosäure. Während I₆K₂ zu Bändern selbstassemblierte, zeigten sich bei V₆K₂ elongierte, stabartige Strukturen. Für L₆K₂ bildeten sich bei höheren Konzentrationen ebenfalls stabartige Strukturen. Die morphologischen Unterschiede wurden auf die Wechselwirkungen der hydrophoben Aminosäuren zurückgeführt. Während bei der Verwendung von Valin und Leucin das Peptid ungefaltet vorlag, zeigte sich bei der Isoleucin-Variante eine β -Faltblatt-Sekundärstruktur. Daher wurde gemutmaßt, dass der Selbstassemblierungsprozess bei der Isoleucin-Variante nicht nur durch hydrophobe Wechselwirkungen, sondern auch durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen beeinflusst wird.^[79]

Die gebildeten Strukturen werden ebenfalls durch die hydrophile Kopfgruppe beeinflusst, wie ein Vergleich von A₆H und A₆R zeigte. Während ersteres Nanobänder bildete, formten sich bei A₆R zunächst dünne Peptidlagen und bei höherer Konzentration helikale Bänder und Nanoröhren. Die Strukturbildung wird hier durch die verschiedenen intermolekularen Wechselwirkungen der Kopfgruppen beeinflusst. Durch die Imidazolgruppe der Histidin-Seitenkette war A₆H zudem in der Lage Zn²⁺-Ionen zu koordinieren. Die Koordination des Metallions führte zur Änderung der Morphologie der Strukturen, die sich dann zu helikalen Bändern zusammenlagerten.^[76, 77]

Eine Acetylierung des *N*-Terminus oder Amidierung des *C*-Terminus kann ebenfalls einen Einfluss auf die assemblierten Strukturen haben, da dadurch Ladungen maskiert werden können.^[73]

Eine Beeinflussung der Morphologie und Eigenschaften der Assemblate ist auch durch externe Faktoren wie Peptidkonzentration, pH-Wert oder Salzkonzentration möglich, da dadurch Packungsdichte, Ausrichtung und Stärke der intermolekularen Wechselwirkungen beeinflusst werden.^[73, 76, 77, 79, 80]

Trotz der vergleichsweise einfachen Struktur finden lineare Amphiphile in vielen Bereichen Anwendung. Da amphiphile Peptide eine intrinsische Biokompatibilität aufweisen, werden lineare Amphiphile beispielsweise zur Stabilisierung von Membranproteinen und als Wirkstofftransporter verwendet. Manche dieser Peptide weisen antimikrobielle Eigenschaften auf und werden daher bezüglich einer Anwendung als Antibiotika untersucht.^[28, 73, 74, 77, 80, 81]

Die Gruppe der peptidischen Amphiphile (PA), oder auch *lipidated peptides*, beschreibt eine weitere Klasse amphiphiler Verbindungen, deren Aufbau jedoch im Allgemeinen eine Hybridstruktur aus Lipid und Peptid ist. Dabei werden die hydrophoben Wechselwirkungen über eine Kohlenwasserstoffkette vermittelt, während nur die hydrophile Kopfgruppe aus Aminosäuren besteht. Somit sind die PA keine vollständig peptidischen Amphiphile.^[21-27]

2.4.2 Bolaamphiphile Peptide

Neben den einfachen linearen Peptiden wurden bereits komplexere Ansätze im Peptiddesign untersucht. Daraus ergab sich unter anderem die Klasse der bolaamphiphilen Peptide. Diese besitzen zwei hydrophile Kopfgruppen, die durch eine hydrophobe Region verbunden sind. Dabei kann die Struktur teilweise oder vollständig aus Aminosäuren aufgebaut sein.^[40, 41, 78, 82-90]

Als hydrophile Kopfgruppen werden beispielsweise Glutamat oder Aspartat verwendet. Positiv geladene Kopfgruppen lassen sich mit Histidin, Arginin oder Lysin erhalten. Die hydrophoben Segmente können z.B. Polyleucin-, Polyalanin- oder Polyisoleucin-Sequenzen enthalten.^[78, 82, 84-88, 90]

Aufgrund ihres Aufbaus bilden bolaamphiphile Moleküle keine Doppelschichten. Stattdessen ordnen sich die hydrophoben Segmente in der Mitte der Membran parallel zueinander an, während die Kopfgruppen des gleichen Moleküls oberhalb und unterhalb herausstehen (Abbildung 9). Dadurch ergeben sich weitere Möglichkeiten zur Modifizierung. Beispielsweise schaffen asymmetrische Bolaamphiphile mit verschiedenen Kopfgruppen Strukturen, deren innere und äußere Oberfläche sich unterscheiden. Bei unterschiedlich großen Kopfgruppen werden meist polymorphe Strukturen erhalten.^[40, 41, 78, 82, 83, 85, 88]

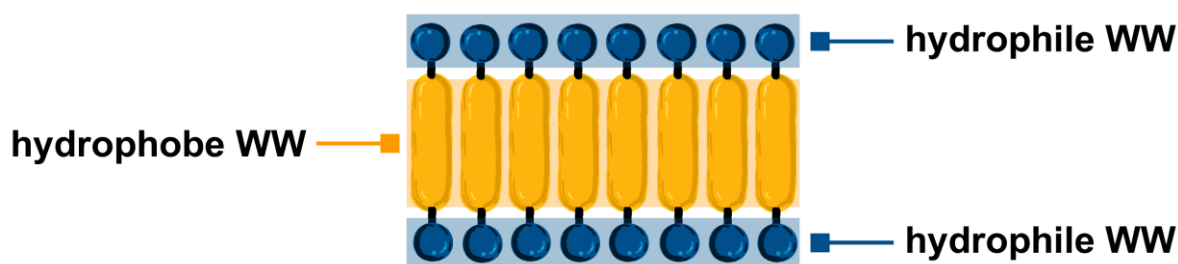


Abbildung 9. Schematischer Längsschnitt einer Membran aus bolaamphiphilen Peptiden. In der Mitte wird die Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen (WW) stabilisiert, während an den Rändern hydrophile Wechselwirkungen mit dem wässrigen Medium eingegangen werden. Schematische Zeichnung © Morten Mosbach, M.Sc. wurden für die Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die parallele Anordnung der Monomere ähnelt der β -Amyloid-Struktur, wodurch sich in den Assemblaten eine Schichtstruktur ergibt. Daher selbstassemblieren Bolaamphiphile in wässriger Umgebung in lamellare oder fibrilläre Strukturen. Rollen sich die Lamellen zylindrisch auf, ergeben sich daraus Nanoröhren.^[40, 41, 78, 82, 84-88]

Die Morphologie der resultierenden Strukturen lässt sich beispielsweise über die Wahl der Kopfgruppe steuern. Im Vergleich von KI_4K , RI_4R und HI_4H konnte gefunden werden, dass KI_4K in Nanoröhren assemblierte, während RI_4R sich zunächst in Doppelschichten zusammenlagerte und dann verdrehte Fasern bildete. HI_4H bildete Multilagennetze und assemblierte in flache Bänder. Während die Bildung der Strukturen in der horizontalen Ebene vor allem über Wechselwirkungen der hydrophoben Segmente vermittelt wurde, führten die Wechselwirkungen zwischen benachbarten Arginin- und Histidin-Paaren auch zu einem vertikalen Wachstum der Strukturen.^[90] Die Länge des hydrophoben Segments kann die Dimensionen der Fasern steuern. So nahm beispielsweise im Vergleich von KA_4K über KA_6K zu KA_8K die Länge der Fasern mit der Länge des hydrophoben Segments zu. Verantwortlich dafür war die Stärkung der hydrophoben Wechselwirkungen mit zunehmender Kettenlänge, die ein längeres Faserwachstum erlaubte.^[88] Eine Asymmetrie in den hydrophoben Segmenten beeinflusst die Bildung von Nanoröhren. So wurde beispielsweise im Vergleich der Peptide $Ac-KIIIIK-NH_2$ und $Ac-KIILK-NH_2$ beobachtet, dass letzteres Nanoröhren mit deutlich geringerem Durchmesser formte. Im Gegensatz dazu vergrößern β -verzweigte Aminosäuren den Durchmesser.^[85, 87]

Bolaamphiphile Peptide zeigen eine gute Biokompatibilität^[41, 89] und können, je nach Ladung, verschiedene entgegengesetzt geladene oder neutrale Moleküle enkapsulieren.^[82-84] Bei Arginin-haltigen Peptiden kann es bei höheren Konzentrationen zu einer Zerstörung von Zellmembranen durch die starken Wasserstoffbrückendonator-Eigenschaften der Guanidiniumgruppe kommen. Dadurch können diese Peptide antimikrobiell wirken.^[84, 89]

Die Kombination aus guter Biokompatibilität und dem Vermögen zur Enkapsulierung erlaubt Anwendungen als Gentransporter. Durch gezielte Modifikation der Peptide lassen sich zudem gewünschte Zellerkennungsmotive hinzufügen oder die Effizienz der Transfektion erhöhen.^[40, 41, 91, 92]

Durch Dekoration der Peptide mit verschiedenen (Bio)Molekülen lassen sich die Anwendungsmöglichkeiten der bolaamphiphilen Peptide erweitern.^[41] So konnten beispielsweise Antikörper-dekorierte Bolaamphiphile zu spezifischen Antigenen gesteuert werden, die auf einer Oberfläche immobilisiert waren.^[41, 93] Durch Dekoration mit Azabenzen ließen sich wiederum photosensitive Bolaamphiphile herstellen.^[41, 94] Es finden sich weitere Anwendungen für bolaamphiphile Peptide im Bereich der templatvermittelten Synthese von metallischen Nanomaterialien, Sensorik, Elektronik, metallvermittelten Katalyse und der Herstellung funktionaler Hydrogele.^[40, 41]

2.4.3 Geminiamphiphile Peptide

Eine weitere Klasse amphiphiler Verbindungen umfasst die Geminiamphiphilen. Diese sind aus zwei linearen Amphiphilen aufgebaut, die über einen Linker an den Kopfgruppen verbunden sind. Das Interesse an dieser Klasse begründet sich vor allem in der größeren Ähnlichkeit zur lipidischen Struktur und an der vergleichsweise großen Zahl an Modifikationsmöglichkeiten. Die Eigenschaften lassen sich hier durch Änderungen an den beiden hydrophoben und hydrophilen Regionen, sowie durch Änderungen des Linkers steuern. Diese Möglichkeiten wurden in einer Vielzahl an Experimenten untersucht. Dabei wurden die Kopfgruppen variiert, die Zusammensetzung und Länge des Linkers verändert, der Effekt der Länge der hydrophoben Einheiten untersucht und auch asymmetrische Amphiphile hergestellt. Viele Geminiamphiphile sind von Tensiden inspiriert und tragen entsprechend typische Kopfgruppen, wie etwa quartäre Ammonium- oder Acetylgruppen.^[70, 71, 81, 95-105]

In der Literatur finden sich allerdings einige Geminiamphiphile, die als eine Mischung aus hydrophiler Aminosäure und zwei aliphatischen Kohlenwasserstoffketten beschrieben werden können.^[95, 96, 100, 104]

Es sind wenige Varianten bekannt, die ausschließlich aus Aminosäuren aufgebaut sind. Ein Beispiel hierfür wäre Ac-AAAAAA-PKKP-AAAAAA-NH₂ (APK). Die beiden hydrophoben Segmente sind hier nicht über einen Linker, sondern über die Kopfgruppe selbst miteinander verbunden. Im Vergleich zum linearen Gegenstück A₆K (Ac-AAAAAAK-NH₂) zeigte APK ein deutlich größeres Vermögen zur Selbstassemblierung. Dies äußerte sich in deutlich geringeren Minimalkonzentrationen für die Assemblierung und der Bildung signifikant stabilerer Strukturen. Bei Peptidkonzentrationen um etwa 1 mM formte APK Nanofasern. Bei geringeren Konzentrationen um 0,1 mM bildete sich ein Gemisch aus Lagern und Fasern. Die Einkapsulierung hydrophober Moleküle gelang durch Micellenbildung um das Zielmolekül. Zusätzlich zeigte das Peptid antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli*, *S. aureus* und *C. albicans*.^[81]

In Anlehnung an APK entwickelten Gao *et al.* das Peptid GNNQQNY-PKKP-GNNQQNY (G7PK). Durch die Verwendung einer β -Faltblatt bildenden Sequenz im hydrophoben Segment, soll eine unspezifische Bindung hydrophober Moleküle an eine rein hydrophobe Polyaminosäuresequenz (wie z.B. bei APK) verhindert werden. Bei einer Peptidkonzentration von etwa 1 mM formten sich Nanokäfige mit micellenartiger Struktur. Ähnlich wie bei APK erfolgte die Einkapsulierung hydrophober Moleküle durch Anlagerung einer Monolage des Peptids an das Zielmolekül. Dadurch stieg beispielsweise die Wirksamkeit des Antikrebsmedikaments Paclitaxel nach der Einkapsulierung deutlich, da die Löslichkeit und die Zytotoxizität des Medikaments anstiegen. Das Peptid selbst zeigte keine Toxizität.^[70]

Cao *et al.* entwickelten ein Geminiamphiphil basierend auf einer linearen Kette aus drei hydrophoben Aminosäuren und einem Cystein als Kopfgruppe. Unter oxidativen Bedingungen

ließen sich, unter Ausbildung einer Disulfidbindung, zwei Monomere zu einem Homodimer mit geminiamphiphiler Struktur verbinden. Die Hydrophobizität ließ sich durch die Auswahl an Aminosäuren steuern. Dies hatte direkte Auswirkungen auf Assemblierungsvermögen, das proportional zur Hydrophobizität anstieg. Ebenso wie bei APK, ließen sich beim Dimer signifikant bessere Selbstassemblierungseigenschaften feststellen, als bei der linearen Verbindung. Die Monomere bildeten sphärische Strukturen, während die Homodimere alle fibrilläre Strukturen formten.^[71]

Neben der Vielzahl an möglichen Stellschrauben zur Feinabstimmung der Selbstassemblierung und der biologischen Stabilität, weisen geminiamphiphile Peptide in Anwendungen weitere Vorteile gegenüber linearen Amphiphilen auf. Durch zwei hydrophile Gruppen sind Geminiamphiphile deutlich effizienter in der Wirkung, da geringere Mengen an Substanz benötigt werden, um die gleiche Wirkung wie bei linearen Amphiphilen zu erzielen. Daher sind Geminiamphiphile gute Optionen für pharmazeutische und biomedizinische Anwendungen, da die Wirkstoffmenge signifikant verringert werden kann. Die Verwendung von Aminosäuren trägt zusätzlich zu einer geringen Zelltoxizität und guten Umweltverträglichkeit bei, da die Verbindungen biologisch abbaubar sind.^[71, 95, 97, 98, 100, 102, 104, 105] Geminiamphiphile Peptide finden oft Anwendung als Vektor in der Transfektion von Genen.^[95, 97, 98, 100, 102]

In ihrer Rolle als Tensid können Geminiamphiphile verschiedene Proteine durch Assoziation stabilisieren. Außerdem weisen sie äußerst effiziente Gelbildung auf. Dabei können thermoresponsive Gele von geminiamphiphilen Peptiden bei Peptidkonzentration von etwa einem tausendstel der Konzentration gebildet werden, die beim Einsatz linearer Amphiphile notwendig wäre.^[95] Einige Aminosäure/Alkyl-Hybride bildeten zudem stabile Partikel, die für den Transport von Pharmazeutika eingesetzt werden könnten.^[95, 104, 105] Ebenso kommen für diese Anwendung APK und G7PK in Frage.^[70, 81]

Viele Geminiamphiphile weisen zudem antimikrobielle Aktivität auf, sodass sie als Biozid, Herbizid oder Fungizid verwendet werden können.^[81, 97, 101, 105]

2.4.4 Elastin-ähnliche Peptide

Eine weitere Klasse peptidischer Amphiphile sind die Elastin-ähnlichen Peptide (*elastin-like peptides*, ELP). Aufgrund der Länge und der blockweisen Anordnung der Elemente, ähneln diese Strukturen Blockpolymeren, die ebenfalls als Lipidmimetika eingesetzt werden können (Abbildung 10).^[16, 17, 106-108]

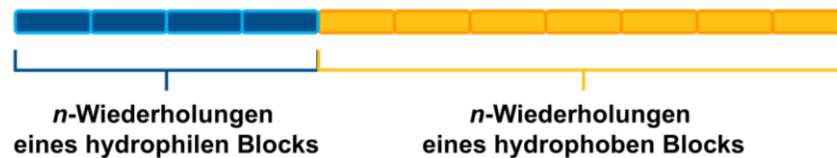


Abbildung 10. Aufbau eines Elastin-ähnlichen Peptids (ELP). Das Peptid besteht aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Block. In jedem Block wird die Pentapeptid-Sequenz [VPGXG] n -mal wiederholt. Über die Aminosäure X wird die Hydrophobizität des Blocks gesteuert.

Die Sequenz Elastin-ähnlicher Peptide ist von der hydrophoben Domäne des natürlichen Proteins Tropoelastin abgeleitet, die das [VPGXG] $_n$ -Sequenzmotiv beinhaltet. Dabei kann X jegliche Aminosäure, außer Prolin, oder eine Kombination von Aminosäuren sein und sich das Motiv n -mal wiederholen. Eine Amphiphile lässt sich in das Motiv durch verschiedene Aminosäuren X einführen. Für einen hydrophilen Block können beispielsweise Arginin oder Glutamat verwendet werden, während hydrophobe Blöcke Valin oder Phenylalanin enthalten. ELPs sind Stimuli-responsiv und lassen sich durch Temperatur beeinflussen. Dabei gehen sie beim Überschreiten einer spezifischen Übergangstemperatur reversibel von einem hydrophilen in einen hydrophoben Zustand über. Parallel dazu verschlechtert sich die Löslichkeit des Peptids drastisch, wodurch es zur Gelbildung kommt. Die Übergangstemperatur hängt dabei von Faktoren wie der Aminosäure X, der Kettenlänge, der Peptid- und Salzkonzentration und dem pH-Wert ab. Für den Fall der Gastaminosäure X lässt die Verwendung einer hydrophoben Aminosäure die Phasenübergangstemperatur fallen, während die Verwendung hydrophiler Aminosäuren einen Anstieg bewirkt. Die Verwendung von Prolin an der Stelle X führt zum Verlust der thermoresponsiven Eigenschaften. Die Anwesenheit weiterer Moleküle wie etwa Pharmazeutika oder Liganden hat allerdings keinen Einfluss auf dieses Verhalten. Die thermoresponsiven Eigenschaften bleiben ebenso bei Konjugation an ein weiteres Peptid erhalten. Wie auch andere Peptide, sind ELP biokompatibel.^[16, 17, 106-112]

Die Modifizierbarkeit der ELP ist auf Änderungen der Aminosäure an der vierten Position, den Termini und Positionen zwischen den Pentapeptid-Sequenzen beschränkt. Die resultierenden Strukturen lassen sich beispielsweise über die Sequenz, Länge und das Verhältnis der hydrophilen und hydrophoben Blöcke beeinflussen.^[17, 110]

Für ELP wurde bereits die Möglichkeit zum Aufbau von Kompartimenten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen. Dazu wurde die zur Aminosäuresequenz korrespondierende DNS-

Sequenz hergestellt. Im Anschluss konnte sowohl über ein zellfreies Transkription/Translation (TX-TL)-System, als auch direkt in *E. coli*, das Peptid exprimiert werden.^[16, 17, 109]

Für die zellfreien Experimente wurden die Gensequenz und das TX-TL-System in Vesikeln aus Elastin-ähnlichem Peptid enkapsuliert. Bei Anwesenheit der notwendigen Enzyme und der Nucleotide konnte die Expression des Peptids und der Einbau der Monomere in die Membran gezeigt werden (Abbildung 11). Bei der Bildung großer ELP-Partikel konnte Membranfusion beobachtet werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass innerhalb der ELP-Vesikel sowohl die Transkription eines RNA-Aptamers, als auch die Translation eines fluoreszenten Proteins möglich waren.^[16, 109]

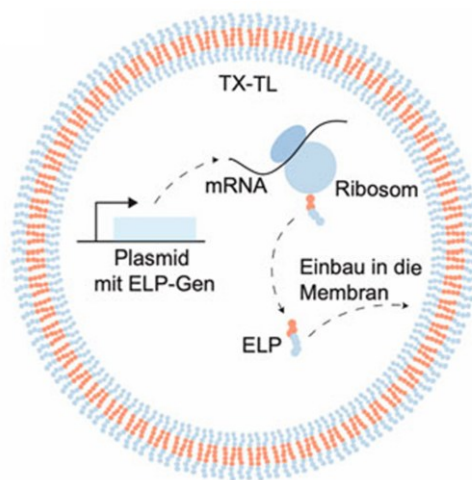


Abbildung 11. Darstellung der Expression eines Elastin-ähnlichen Peptids innerhalb eines ELP-Vesikels. Zur Transkription und Translation wurde das TX-TL-System verwendet und alle notwendigen Bausteine zur Lösung zugegeben. Das exprimierte Peptid lagert sich im Anschluss in die Membran ein. Unverändert übernommen aus Ref. [113] gemäß CC BY 4.0; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Für die Expression in *E. coli* wurde ein Plasmid mit der DNS-Sequenz in das Bakterium eingeführt. Nach der Expression des Plasmids ließ sich die Bildung von Kompartimenten in den Bakterien elektronenmikroskopisch nachweisen. Die Überlebensrate der Bakterien wurde durch die Expression des Peptids nicht beeinflusst.^[17]

Weitere Anwendungen für Elastin-ähnliche Peptide liegen im Bereich des Transports von Pharmazeutika und dem Gewebe-Engineering (*tissue engineering*). Für diese Anwendungen ist von Vorteil, dass die Peptide in großen Mengen exprimiert werden können.^[106, 108, 110, 111]

Der Transport von Pharmazeutika gelingt durch die Bildung von Nanopartikeln. Für die Einkapsulierung ist eine Kenntnis der Phasenübergangstemperaturen der einzelnen Blöcke wichtig. Die Temperatur der Lösung muss so eingestellt werden, dass der hydrophile Block unter seiner Phasenübergangstemperatur bleibt, aber der hydrophobe Block in die hydrophobe Phase übergeht. Dadurch wird eine gezielte Aggregation des hydrophoben Blocks und eine Einkapsulierung des Wirkstoffs erreicht, während der hydrophile Teil in Lösung bleibt. Durch eine Funktionalisierung des Peptids mit Erkennungssequenzen, können die Partikel zudem zuvor bestimmte Zellen anvisieren.^[16, 107, 110, 112]

3 Zielsetzung

Das Feld der peptidbasierten Lipidmimetika wurde in den letzten Jahrzehnten immer weiter ausgedehnt und zeigte Möglichkeiten zur Selbstassemblierung von amphiphilen Peptiden auf. Mittlerweile wurden eine ganze Reihe an Kombinationen von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren getestet und verschiedenste dreidimensionale Strukturen von Vesikeln bis hin zu Nanoröhren durch Selbstassemblierung erhalten.^[21, 28, 31, 39, 114, 115]

Allerdings weisen viele dieser amphiphilen Peptide eine einfache lineare Struktur auf und können deshalb nur begrenzt modifiziert werden. Um das Feld der amphiphilen Peptide um komplexere Bausteine zu erweitern und dabei Sequenz-Funktion-Beziehungen der Partikelbildenden Peptide zu untersuchen, sollen in dieser Arbeit mehrere amphiphile Peptide basierend auf dem Helix-Loop-Helix (HLH)-Motiv designt und analysiert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu zeigen, dass auch längere amphiphile Peptidsequenzen in der Lage sind, zu komplexen Strukturen höherer Ordnung zu assemblieren. Ein detaillierter Vergleich der Responsivität der Peptid-Monomere, aber auch der Assemblate, gegenüber äußeren Stimuli soll dabei helfen, die Sequenz-Funktion-Beziehungen im Helix-Loop-Helix-Motiv zu beleuchten. Die zu Grunde liegende Struktur dieser Dissertationsarbeit ist in Abbildung 12 dargestellt.

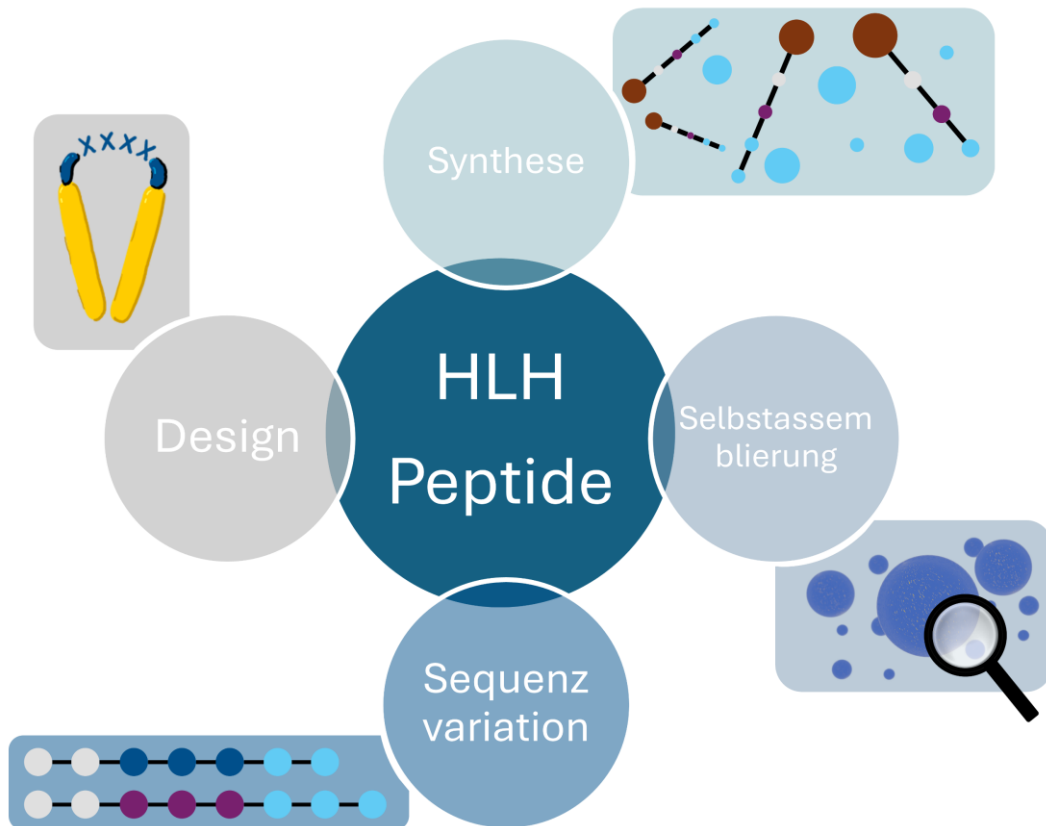


Abbildung 12. Schematische Darstellung der Gliederung der Dissertationsarbeit. Diese umfasst das Design der Peptide basierend auf dem Helix-Loop-Helix-Motiv, die Synthese der designten Sequenzen, Charakterisierung der daraus entstandenen makromolekularen Strukturen und die Variation der Sequenzen zur Untersuchung von Sequenz-Funktion-Beziehungen. Schematische Zeichnungen © *Morten Mosbach, M.Sc.* wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Schematische 3D-Renderings der Partikel wurden mit *Blender* erstellt.

Das Helix-Loop-Helix-Motiv kann aufgrund seiner vergleichsweise komplexen Struktur durch Sequenzvariation in den drei Segmenten in seiner Morphologie verändert werden. Ziel ist es, zunächst einige Basis-Sequenzen zu erarbeiten, anhand derer die notwendige Methodik erarbeitet und die Machbarkeit des Projekts gezeigt werden sollen.

Anschließend sollen diese Basis-Sequenzen mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisiert werden. Neben der Entwicklung eines erfolgreichen Syntheseprotokolls soll auch eine möglichst einfache und quantitative Aufreinigungsmethode für die Rohpeptide gefunden werden. Da hydrophobe und repetitive Sequenzen anfälliger für Synthese- und Aufreinigungsprobleme sind,^[116-119] ist es wichtig zu zeigen, dass diese Probleme hier nicht auftreten oder ihnen effektiv entgegengewirkt werden kann.

Die Charakterisierung der Peptidstrukturen umfasst die Entwicklung von Protokollen zur Selbstassemblierung der Peptide und die Analyse der erwarteten Strukturen. In der Literatur sind einige geeignete biophysikalische Methoden, darunter Dynamische Lichtstreuung (DLS), Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie, elektronenmikroskopische Methoden und Rasterkraftmikroskopie aufgezählt.^[39] Dem Beweis der Machbarkeit soll eine detaillierte Charakterisierung nachfolgen, um ein möglichst umfassendes Verständnis des Verhaltens der erwarteten Assemblate zu erhalten.

Nach der Charakterisierung der ersten Sequenzen werden Sequenzmodifikationen betrachtet, die basierend auf den ersten Strukturen entwickelt werden sollen. Dazu sollen die Erkenntnisse aus bereits charakterisierten HLH-Peptiden in das Design neuer Sequenzen einfließen. Diese neuen Peptide sollen die Bibliothek der Helix-Loop-Helix-Peptide erweitern, um eine möglichst umfassende Analyse der Sequenz-Funktion-Beziehungen der Peptidpartikel zu erlauben.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Designkonzept der Helix-Loop-Helix-Peptide

Die Auswahl des Designmotivs war von zwei Überlegungen geprägt. Zum einen war es wichtig, einen amphiphilen Grundbaustein herzustellen, der sich in wässriger Lösung spontan assembliert, indem er die Struktur natürlicher Lipide möglichst stark nachahmt.^[1, 3, 14, 28, 81] Zum anderen sollte das Feld der amphiphilen Peptide durch neuartige Sequenzen erweitert werden, die die bisher bekannten Motive in Komplexität übertreffen und damit auch mehr Möglichkeiten für potentielle Modifizierungen bieten.

Folglich fiel die Wahl auf das Helix-Loop-Helix (HLH)-Motiv. Dieses Motiv ist gekennzeichnet durch zwei hydrophobe α -helikale Segmente, die über eine hydrophile Schleife (Loop) zu einer hufeisenförmigen Struktur verbunden sind. Dieses Motiv ahmt die Struktur der Membranlipide nach, die in der Regel über zwei hydrophobe C_n -Ketten und eine hydrophile Kopfgruppe verfügen,^[3] sodass sich eine spontane Selbstassemblierung in partikuläre Strukturen erwarten lässt (siehe Abbildung 13).

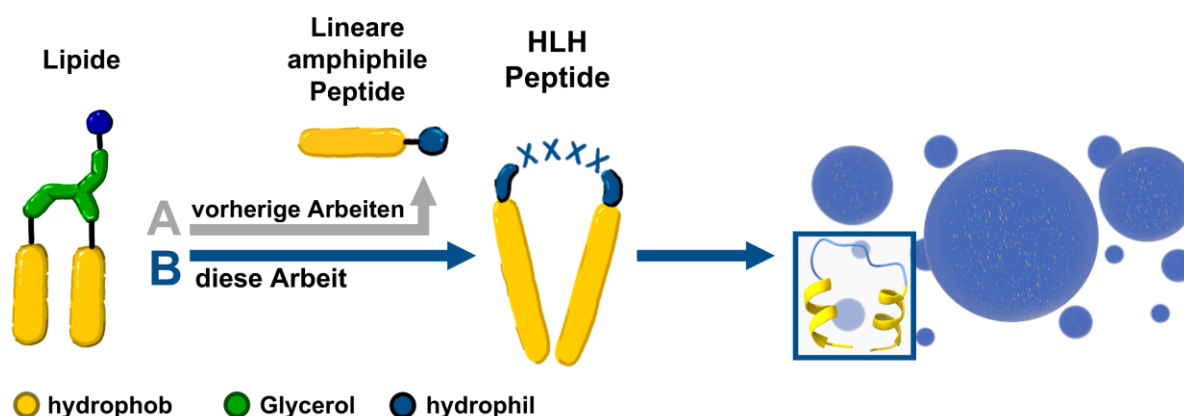


Abbildung 13. Schematische Darstellung des allgemeinen Aufbaus von Membranlipiden^[3] (links) und deren Peptid-Mimetika. Eine Klasse bilden die literaturbekanntesten linearen amphiphilen Peptide^[28, 29, 31, 34, 72, 73] (A), die nur aus einer hydrophoben Peptidkette mit hydrophiler Kopfgruppe bestehen. Eine komplexere Struktur bilden die Helix-Loop-Helix (HLH)-Peptide in dieser Arbeit (B). Die Ähnlichkeit zwischen HLH-Peptiden und Lipiden lässt sich aus dem Schema entnehmen. (Schematische Zeichnungen © *Morten Mosbach, M.Sc.* wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Schematische dreidimensionale Darstellungen der Partikel wurden mit *Blender* erstellt. Das dreidimensionale Schema des Helix-Loop-Helix-Peptids wurde als Vorhersage der Peptidfaltung von *AlphaFold2* nach Angabe der Sequenz von **HLHP4** erstellt und in *ChimeraX* bearbeitet.)

Das HLH-Motiv wurde bisher nur selten als Grundlage für die Selbstassemblierung von Proteinstrukturen im Bereich der Lipidmimetika verwendet. Amphiphile Helices mit dem Sequenzmuster (phpphp)₂ wurden von *Ho* und *de Grado* über eine GPRRG-Schleife verbunden und in der Selbstassemblierung von 4-Helixbündeln untersucht.^[120, 121] Das HLH-Motiv kommt auch in der Natur, beispielsweise in Transkriptionsfaktoren, vor.^[122-124] *Liedberg* und *Aili* publizierten Arbeiten zur Selbstassemblierung von HLH-Strukturen.^[125, 126] Diese basierten auf Peptiden der J2R-Familie^[127] und waren durch Disulfidbrücken zu Dimeren verknüpft. Durch *de novo* Design ließen sich basierend auf *tandem repeat proteins* (TRP)^[128] ebenfalls dreidimensionale selbstassemblierende Strukturen erzeugen. Zum Beispiel führten

Arbeiten von *Hughes et al.* zu Filamenten mit helikaler Monomerstruktur.^[129] *Doyle et al.* untersuchten toroidale Strukturen, die aus mehreren kovalent verknüpften Helix-Loop-Helix-Strukturen bestanden.^[130] Die Sequenzen der HLH-Peptide dieser Arbeit sind allerdings im Gegensatz zu den bisherigen Beispielen vollständig *de novo*, basierend auf rein rationalen Überlegungen konstruiert und nicht von natürlichen Sequenzen abgeleitet.

Im Vergleich zu linearen Amphiphilen hat das HLH-Motiv den Vorteil, dass nicht nur die Länge und die Zusammensetzung der linearen Kette und die Kopfgruppe verändert werden können. Beide hydrophoben Segmente können unabhängig voneinander modifiziert werden. Änderungen im sterischen Anspruch der verwendeten Aminosäuren und die Länge des hydrophoben Segments sollten direkte Auswirkungen auf den Selbstassemblierungsprozess und die Stabilität der erwarteten Peptidpartikel haben. Durch das Ersetzen einer hydrophoben Aminosäure mit einem Prolin kann ein Knick im hydrophoben Segment erzeugt werden, der das Verhalten ungesättigter Fettsäuren nachahmen soll.^[3] Damit besteht die Möglichkeit, Einfluss auf die Packung und die Membranfluidität der potentiell gebildeten Partikel zu nehmen. Die Länge der hydrophilen Einheit und deren Zusammensetzung sollten die Packung und den Platzbedarf der Monomere und damit die Größe der daraus resultierenden Partikel beeinflussen. Auch hier können verschiedene hydrophile Aminosäuren verwendet werden, die sowohl Anpassungen bei der Stärke der Wechselwirkungen mit externen Stimuli, als auch der Steuerung der Gesamtladung des Moleküls erlauben. Eine Dekoration der entsprechenden Aminosäuren mit verschiedenen Endgruppen könnte zudem zusätzlich Auswirkungen auf die Wechselwirkungen gegenüber externen Stimuli, wie etwa Änderungen im pH-Wert oder der Salzkonzentration, haben. Durch den komplexen Aufbau des HLH-Motivs besteht daher die Möglichkeit einer Feinabstimmung der resultierenden Strukturen auf verschiedene Anwendungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polyalanin- oder Poly-leucinsequenzen mit einer Länge von jeweils neun Aminosäuren für die Konstruktion der beiden α -helikalen hydrophoben Segmente des jeweiligen Monomers verwendet. Neben dem hydrophoben Charakter weisen diese Aminosäuren eine hohe Neigung zur Bildung α -helikaler Sekundärstrukturen auf.^[131] Für die verknüpfende hydrophile Schleife wurde die allgemeine Sequenz GP(X)₂₋₅G gewählt, wie sie auch schon bei *Ho* und *de Grado* erfolgreich verwendet wurde.^[120, 121] Die Glycine dienen zur Unterbrechung der helikalen Strukturen.^[121] Prolin induziert einen Knick in der Struktur, der die Bildung der hufeisenförmigen Form erleichtern soll.^[81, 121] Darüber hinaus wurde eine variable Anzahl an hydrophilen Aminosäuren in die Schleife eingebaut. Dabei wurden Längen der hydrophilen Segmente zwischen fünf und acht Aminosäuren untersucht. Zudem wurden Varianten mit sowohl Arginin als auch Lysin designt. Die beiden Aminosäuren unterscheiden sich im sterischen Anspruch der Seitenkette und in der Art, wie sie Wasserstoffbrückenbindungen bilden.^[132, 133] Beide Termini des Peptids sind mit Acetyl bzw.

als Amid blockiert, um endständige Ladungen zu vermeiden, die dem amphiphilen Charakter entgegenwirken würden. Außerdem stabilisiert eine Acetylierung des *N*-Terminus die α -helikale Sekundärstruktur.^[81, 121, 134, 135]

Eine Übersicht der verschiedenen Peptide, die in dieser Arbeit synthetisiert wurden, ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1. Übersicht der Peptidsequenzen, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Peptid	Sequenz							
HLHP1	Ac-AAA	AAA	AAA	GPRR	G	AAA	AAA	AAA-NH ₂
HLHP1.1	Ac-AAA	P AA	AAA	GPRR	G	AAA	AAA	AAA-NH ₂
HLHP2	Ac-AAA	AAA	AAA	GPRRR	G	AAA	AAA	AAA-NH ₂
HLHP2.1	Ac-AAA	P AA	AAA	GPRRR	G	AAA	AAA	AAA-NH ₂
HLHP3	Ac-AAA	AAA	AAA	GPRRRR	G	AAA	AAA	AAA-NH ₂
HLHP3.1	Ac-AAA	P AA	AAA	GPRRRR	G	AAA	AAA	AAA-NH ₂
HLHP4	Ac-LLL	LLL	LLL	GPRRRR	G	LLL	LLL	LLL-NH ₂
HLHP4.1	Ac-LLL	P LL	LLL	GPRRRR	G	LLL	LLL	LLL-NH ₂
HLHP5	Ac-LLL	LLL	LLL	GPKKKK	G	LLL	LLL	LLL-NH ₂
HLHP6	Ac-LLL	LLL	LLL	GPRRRRRG	LLL	LLL	LLL	LLL-NH ₂

Bei Betrachtung der Sequenzen zeigen sich Ähnlichkeiten zu den in Abschnitt 2.4.3 diskutierten peptidbasierten geminiamphiphilen Peptiden. Allerdings bestehen auch signifikante Unterschiede. Strukturell ähnlich scheint das von *Peng et al.* untersuchte Peptid APK, das von dem linearen Amphiphil A₆K abgeleitet wurde und ebenfalls über zwei hydrophobe Polyalanin-Segmente und eine hydrophile Schleife verfügt. Allerdings sind sowohl die hydrophoben als auch die hydrophilen Segmente kürzer als bei den HLH-Peptiden. Zudem weist APK keine gefaltete Sekundärstruktur auf. Die Schleife enthält zudem zwei Proline, aber keine Glycine. Die dreidimensionale Struktur des APK ist aufgrund der kürzeren Sequenz eher V-förmig und unterscheidet sich damit von der hufeisenförmigen Struktur der HLH-Peptide.^[81] Die Arbeiten von *Gao et al.* sind stark an APK angelehnt und unterscheiden sich damit ebenfalls von den HLH-Peptiden.^[70] In den Arbeiten von *Cao et al.* sind zwei Monomere über Disulfidbrücken verknüpft, sodass sich die dreidimensionale Struktur dieser Geminiamphiphilen deutlich von den HLH-Peptiden unterscheidet.^[71]

4.2 Synthese und Aufreinigung der Monomere

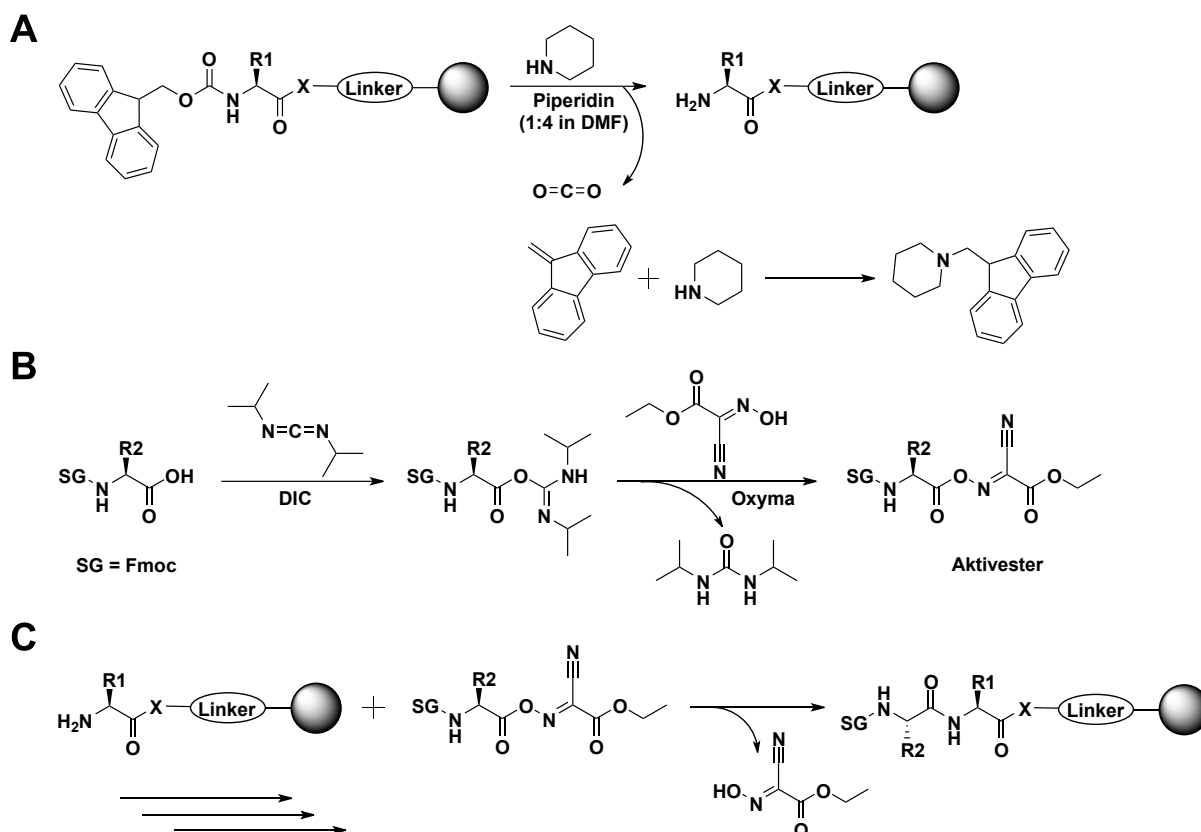
Probleme der Synthese und Aufreinigung der Monomere wurden bereits größtenteils während der Masterarbeit^[136] zu diesem Thema betrachtet.

4.2.1 Syntheseplanung

Die Repetitivität der Peptidsequenzen und der hohe Anteil an hydrophoben Aminosäuren sind typische Merkmale sogenannter „schwieriger Peptide“ („*difficult peptides*“).^[116] Dabei handelt es sich um ein Konzept, das von *Kent* in den 1980er Jahren postuliert wurde und für bestimmte Merkmale von Peptidsequenzen eine erschwerte Handhabung voraussagt. Daher waren für diese Peptide Probleme bei der Synthese zu erwarten. Typischerweise tritt bei schwierigen Peptiden eine Aggregation der Peptidkette auf dem Harz auf und führt zu einer Abnahme der Ausbeute und Reinheit des Rohpeptids.^[117-119, 137] Bei der Synthese repetitiver Sequenzen mit hydrophoben Aminosäuren wird zudem oft das Fehlen einzelner Aminosäuren bei der Synthese (*deletion*) beobachtet.^[118, 138] Um möglichen Problemen entgegenzuwirken, wurde bereits zu Beginn der Arbeiten eine Synthesestrategie entwickelt, die im Anschluss auf alle Peptide angewendet wurde. Um Aggregation zu minimieren, wurde Fmoc-basierte Mikrowellen-unterstützte Festphasenpeptidsynthese (SPPS) verwendet.^[117-119] Als feste Phase wurde zunächst ChemMatrix®-Harz verwendet. Nach dessen Produktionsstopp, konnte auch TentaGel®-Harz problemlos genutzt werden, ohne dabei Mengen und Methoden zu verändern. Allerdings musste aufgrund der geringeren Beladungsdichte dieses Harzes eine Verringerung der Ausbeute hingenommen werden. Die Kupplungen erfolgten grundsätzlich nach dem Standard-Syntheseprotokoll von **CEM** auf einem *Liberty Blue* Peptidsynthesizer. Dabei wurde die basenlabile *N*-terminale Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe zunächst mit einem Gemisch aus Piperidin in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) (1:4, *v/v*) abgespalten. Die Aktivierung der nächsten Aminosäure erfolgte mit einem Gemisch aus *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) als Aktivator und Ethylcyano(hydroxyimino)acetate (OxymaPure®) als Aktivatorbase (Schema 1).

Allerdings wurden, zur Verbesserung der Synthesequalität und zur Verhinderung von Kettenabbrüchen, einige Modifikationen an den Kupplungsprotokollen vorgenommen. Diese sind im Folgenden erläutert. Zunächst wurde entschieden, jede einzelne Aminosäure doppelt zu koppeln, um das Risiko von Kettenabbrüchen zu verringern. Aminosäuren ohne Schutzgruppe (alle außer Arginin und Lysin) wurden bei 105 °C gekuppelt, um die Kupplungsgeschwindigkeit und Ausbeute zu erhöhen und damit Nebenreaktionen zu verhindern.^[139, 140] Zudem sollte eine erhöhte Temperatur dabei helfen, die Aggregation auf dem Harz zu verhindern.^[116-118, 137] Für die Kupplung von Arginin und Lysin wurde von einer erhöhten Temperatur abgesehen, um die Stabilität der Seitenkettenschutzgruppen nicht zu

kompromittieren. Es wurde zusätzlich ein weiterer Waschschritt zwischen den Kupplungen eingebaut.



Nach der Synthese wurden die Peptide nach in der Arbeitsgruppe etablierten Standardprotokollen unter der Verwendung eines Gemisches aus Trifluoressigsäure (TFA), Triisopropylsilan (TIPS) und Wasser (85:10:5, v/v/v) vom Harz abgespalten. Um eine vollständige Abspaltung der sterisch anspruchsvollen 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)-Schutzgruppe des Arginins zu ermöglichen, wurde die Mischung im Allgemeinen für vier Stunden inkubiert und diese Zeit auch bei Abwesenheit einer Pbf-Gruppe nicht mehr verändert. Die Rohpeptide konnten im Anschluss mit kaltem Diethylether ausgefällt werden. Manche Varianten zeigten eine gewisse Löslichkeit im Ether, was beim Dekantieren zu geringen Verlusten führte. Allerdings wurden aufgrund des geringen Ausmaßes keine Anstrengungen hinsichtlich einer Veränderung des Protokolls unternommen.

Durch die genannten Anpassungen des Syntheseprotokolls konnten die Rohpeptide in guter Reinheit erhalten werden. Dies zeigte sich sowohl in der Massenanalyse, als auch den HPLC-Spuren der Rohpeptide. Die Massenspektren wurden von den Massen der Zielpeptide

dominiert. Neben dem eindeutigen Produktpeak waren in den Chromatogrammen die Peaks einer Aminosäure-Addition und ein weiterer Peak unbekannter Identität zu erkennen. Beide Peaks wiesen bei allen Rohpeptiden deutlich geringere Intensitäten als das Hauptprodukt auf. In Abbildung 14 sind Massensanalyse und Chromatogramm eines Rohpeptids beispielhaft anhand von **HLHP4** gezeigt.

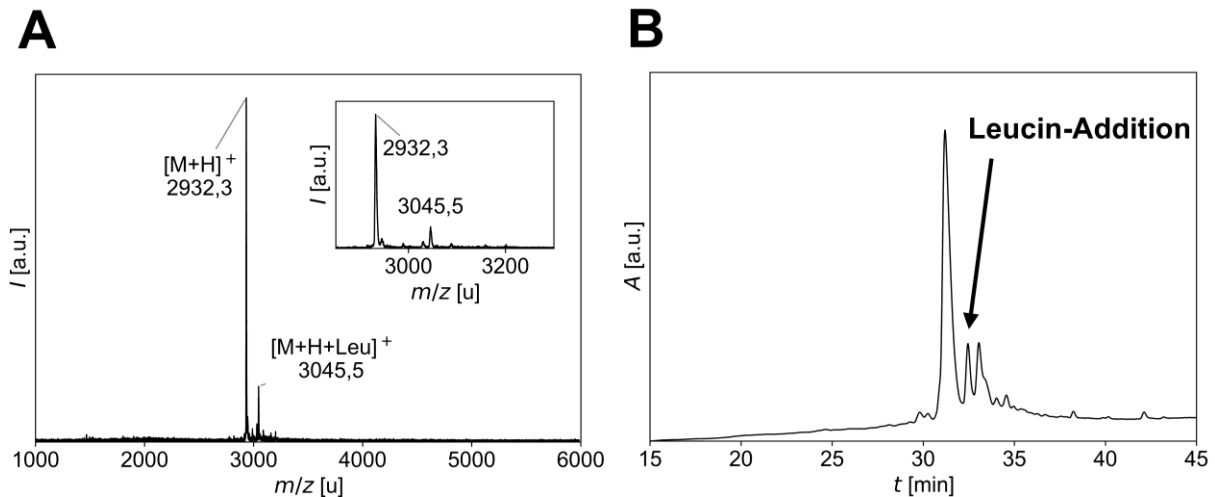


Abbildung 14. **A** Massenspektrum von **HLHP4** vor der Aufreinigung. Neben dem Molekülpeak des Hauptprodukts ist die größte Verunreinigung eine Leucin-Addition bei $m/z = 3045,5$ u. (Messmodus: LP_600-6000). **B** HPLC-Chromatogramm von **HLHP4** vor der Aufreinigung. Der höchste Peak entspricht dem Hauptprodukt. Daneben sind zwei weitere Verunreinigungen vorhanden. Der markierte Peak entspricht der Leucin-Addition. Die zweite Verunreinigung hat eine unbekannte Zusammensetzung.

4.2.2 Löslichkeit des Rohpeptids und Aufreinigung

Probleme traten bei der Löslichkeit der Rohpeptide auf. Versuche, das Rohpeptidpellet in einer Mischung aus Wasser und Acetonitril zu lösen, scheiterten zu Beginn. Eine langwierige Löslichkeitsstudie konnte allerdings umgangen werden, da durch vorherige Arbeiten von Dr. Vanessa Reusche zu aggregationsempfindlichen Peptiden im Arbeitskreis bereits ein Protokoll zur Handhabung und Aufreinigung solcher Peptide vorhanden war.^[139] Daher wurden die Peptidpellets nach anfänglichen Fehlversuchen direkt in 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP) gelöst. HFIP ist ein starker Wasserstoffbrückendonator und wirkt denaturierend auf Peptide und Proteine, wodurch deren Löslichkeit erhöht wird.^[139, 141, 142] Für die anschließende Gefriertrocknung des Peptides wurde eine mindestens vierfache Menge an Wasser zugegeben, da aufgrund des geringen Siedepunkts des fluorierten Alkohols eine Gefriertrocknung in reinem HFIP nicht möglich ist.^[141]

Auch die anschließende Aufreinigung der Peptide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde von den Arbeiten von Dr. Reusche inspiriert.^[139] Dabei wurde das Rohpeptid nach der Gefriertrocknung in 2 – 3 mg Portionen eingewogen und erneut in HFIP (100 μ L) angelöst. Eine Inkubation in HFIP über Nacht war dabei gegenüber kürzeren Zeiten vorteilhafter, um das Rohpeptid vollständig zu deaggregieren. Die weitere Vorgehensweise unterschied sich grundsätzlich zwischen den Alanin- und Leucin-Varianten.

Die im Allgemeinen bessere Wasserlöslichkeit der Alanin-Varianten erlaubte eine einfachere Herangehensweise bei der Aufreinigung. Nach Inkubation in HFIP wurde die Lösung mit Reinstwasser (520 µL), Essigsäure (380 µL) und Reinstwasser (1000 µL) verdünnt. Bei Zugabe der Wassermenge in einem Schritt wurde in manchen Fällen ein Ausfallen der Peptide beobachtet. Durch die Aufteilung der Wassermenge konnte eine Präzipitation verhindert werden. Die Zugabe von Essigsäure bei der Aufreinigung, von in HFIP gelösten Peptiden, wurde schon in der Arbeit von Dr. Reusche und weiteren Literaturquellen beschrieben und zeigte sich auch in diesem Fall als notwendig.^[139, 143] Durch die Zugabe der Säure zu der Mischung konnte zum einen die Löslichkeit des Rohpeptids sichtbar erhöht werden. Wurde die Essigsäure bewusst weggelassen, führte dies in den Chromatogrammen zu einer geringen Signalintensität und schlechteren Auftrennung (Abbildung 62).

Nach Filtration der Lösung wurde das Peptid über eine C18-Umkehrphasensäule aufgereinigt. Für alle Peptide in dieser Arbeit wurden nur Säulen mit einer Porengröße von 300 Å verwendet, da dies in den Arbeiten von Dr. Reusche zu einer besseren Auftrennung führte, als Säulen mit 100 Å Porengröße unter vergleichbaren Bedingungen.^[139] Als Laufmittel wurden zunächst Wasser und Acetonitril mit jeweils 0,1 % TFA verwendet. Nach dem Wechsel auf eine C4-Umkehrphasensäule aufgrund der Schwierigkeiten mit den Leucin-Varianten (s. unten) konnten auch die meisten Alanin-haltigen Peptide ohne Probleme auf der weniger hydrophoben Säule aufgereinigt werden. Das injizierte Lösungsmittelgemisch blieb unverändert. Als Laufmittel wurden allerdings Wasser und Methanol mit je 0,1 % TFA verwendet. Folglich änderten sich die Gradientenzusammensetzungen. Eine Übersicht der Gradienten ist in Tabelle 2 gezeigt.

Die Leucin-Varianten waren deutlich hydrophober. Dies äußerte sich darin, dass das in HFIP und Essigsäure gelöste Rohpeptid nach Zugabe von geringen Mengen Wasser irreversibel ausfiel. Daher wurde nach alternativen Präparationsmethoden gesucht. Es wurde die gute Löslichkeit der Peptide in Methanol genutzt, um das Peptid durch Zugabe von Methanol in Anwesenheit von Wasser in Lösung zu halten. Der Anteil an Wasser im Gemisch wurde schrittweise verringert, bis bei einem Anteil von < 20 % Wasser kein Ausfallen der Rohpeptide mehr beobachtet werden konnte. Folglich enthielt das injizierte Gemisch HFIP (100 µL), Essigsäure (190 µL), Methanol (1360 µL) und Wasser (350 µL). Entsprechend wurden Wasser und Methanol (jeweils mit 0,1 % TFA) als Eluenten für die HPLC verwendet. Die verwendete C18-Säule war für diese Peptide allerdings zu unpolar und damit die Wechselwirkungen mit dem Peptid zu stark. Dies äußerte sich in einer Elution der Peptide bei 100 % Methanol und einem Anstieg des Säulendrucks nach jedem Durchlauf.

Daher wurde ein optimiertes Protokoll für die Aufreinigung der Leucin-Varianten entwickelt. Zunächst wurde die Polarität der Säule durch Wechsel auf eine C4-Umkehrphasensäule verringert, wodurch Rückstände auf der Säule verhindert werden konnten. Anschließend

konnten die Leucin-Varianten durchweg bei einem Anteil von etwa 85 % Methanol im Laufmittel eluiert werden. Die Zusammensetzung der Injektionslösung wurde ebenfalls optimiert. Es wurde der Anteil an Essigsäure (190 μ L \rightarrow 320 μ L) erhöht und folglich die Volumina an Wasser und Methanol angepasst. Dadurch ergab sich folgende finale Zusammensetzung der Injektionslösung: HFiP (100 μ L), Wasser (380 μ L), Essigsäure (320 μ L) und Methanol (1200 μ L). Durch die angegebene Reihenfolge der Lösungsmittel konnte gewährleistet werden, dass während der Wasserzugabe ausgefallenes Peptid durch Zugabe von Essigsäure und Methanol wieder in Lösung gebracht werden konnte.

Eine Übersicht der Zusammensetzung der Injektionslösungen und der Gradienten ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2. Übersicht der optimierten Lösungsmittelgemische und HPLC-Gradienten für die Aufreinigung der in dieser Arbeit präsentierten Peptide. A = ddH₂O + 0,1 % TFA, B = MeCN + 0,1 % TFA, C = MeOH + 0,1 % TFA.

Peptid	Lösungsmittelgemisch	HPLC-Gradient	Säulentyp
Alanin Varianten	HFiP + Wasser + Essigsäure + Wasser	10 % \rightarrow 40 % B in A in 40 Minuten	C18-SE, 300 Å
	<i>alternativ:</i> HFiP + Wasser + Essigsäure + Wasser	20 % \rightarrow 60 % C in A in 40 Minuten	C4-V-E, 300 Å
Leucin Varianten	HFiP + Essigsäure + Wasser + MeOH	60 % \rightarrow 100 % C in A in 40 Minuten	C4-V-E, 300 Å

Wie in Abbildung 52 bis Abbildung 61 gezeigt, konnten mit diesen Protokollen alle Peptide mit einer Reinheit von über 98 % erhalten werden.

Probleme bei der Aufreinigung gab es nur bei **HLHP1** und **HLHP6**. Letzteres zeigte trotz Inkubation über Nacht und Filtration vor Injektion eine Schulter im Hauptsignal. Da die Massenanalyse keine Verunreinigungen offenbarte und auch die restlichen Signale in der HPLC mit den Chromatogrammen der anderen Rohpeptide identisch waren, wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei entweder um eine aggregationsbedingte Signalverbreiterung oder ein Artefakt aufgrund der komplexen Interaktionen mit dem Säulenmaterial handelte (Abbildung 63, Abbildung 64).

HLHP1 konnte trotz optimierter Protokolle nicht in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden, da nur wenig Rohpeptid in Lösung gebracht werden konnte und dementsprechend die Signalintensität bei der Aufreinigung sehr gering war. Ein Massenspektrum der reinen Spezies konnte aufgenommen werden (Abbildung 52). Die geringe Ausbeute der Aufreinigung ließ aber keine weiteren Versuche zu. Ursache für die schlechte Löslichkeit war vermutlich der vergleichsweise hohe Anteil an hydrophoben Aminosäuren.

4.3 Charakterisierung der Alanin Helix-Loop-Helix-Peptide

Die Charakterisierung der Alanin-Varianten wurde bereits während der Masterarbeit^[136] zu diesem Thema angefangen und zu Beginn der Dissertationsarbeit fortgesetzt.

Aufgrund der einfacheren Handhabung durch den weniger hydrophoben Charakter dieser Peptide wurden die Alanin-Varianten zuerst untersucht. Wie in Tabelle 1 dargelegt, wurde eine Bibliothek aus sechs Peptiden erstellt, die sich in der Länge der hydrophilen Schleife unterschieden oder einseitig ein Alanin gegen ein Prolin ausgetauscht worden war, um das Verhalten ungesättigter Fettsäuren nachzuahmen. Es wurden Peptidfilme im Reagenzglas hergestellt und die getrockneten Filme anschließend mit wässriger Pufferlösung resolvatisiert. Anschließend wurde die Suspension im Ultraschallbad behandelt, um die Partikel zu assemblieren.

Untersuchungen zu diesen Peptiden führten zwar bei allen Varianten vermutlich zur Partikelbildung durch Selbstassemblierung. Allerdings waren diese Partikel in Lösung instabil und eine Beobachtung mittels Elektronenmikroskopie lieferte keine eindeutigen Nachweise für deren Existenz oder Morphologie. **HLHP1.1**, **HLHP2.1** und **HLHP3.1** wiesen durch das Prolin in der Seitenkette zwar eine gute Wasserlöslichkeit auf, bildeten aber keine stabilen Partikel in Lösung.

Auch wenn die Alanin Helix-Loop-Helix-Peptide nicht die gewünschte Selbstassemblierung zeigten, konnten die Präparationsansätze genutzt werden, um die Protokolle und Methoden zu erproben, die bei der anschließenden Analyse der Leucin-Varianten ebenfalls zum Einsatz kamen.

4.4 Charakterisierung der Leucin Helix-Loop-Helix-Peptide

Da die Alanin Helix-Loop-Helix-Peptide keine stabilen Partikel bildeten, rückten anschließend die deutlich hydrophoberen Leucin-Varianten **HLHP4** bis **HLHP6** in den Fokus. Durch die hydrophobere Seitenkette, die, bereits bestätigte, schlechtere Wasserlöslichkeit, und die größere Helix-Propensität der Leucin-Reste^[131], konnte hier die Selbstassemblierung in stabilere Partikel erwartet werden.

4.4.1 Vorbereitung der Partikelpräparation

Das aufgereinigte Peptid wurde in organischem Lösungsmittel gelöst, in Aliquots von 15 nmol in Reagenzgläser gegeben und durch Verdampfung des Lösungsmittels ein Peptidfilm hergestellt. Dieser Peptidfilm konnte dann anschließend nach mehreren Protokollen resolvasiert werden, um Peptidpartikel herzustellen. Die Methode der Filmbildung war bereits zuvor an den Alanin-Varianten erfolgreich erprobt worden und lieferte hier als erste Präparationsmethode zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse. Der Prozess ist angelehnt an die Vorgehensweise für Lipide, die häufig in ähnlicher Form zunächst in organischen Lösungsmitteln gelöst werden und dann beim Verdampfen der Lösungsmittel einen Film bilden. Die Lipidfilme können im Anschluss durch Zugabe von wässrigem Puffer hydratisiert werden, um nach weiterer Behandlung Lipidvesikel zu erhalten.^[8, 52, 58, 59, 144] In dieser Arbeit wurde HFIP als Lösungsmittel verwendet, das die Peptide sehr gut löst und deaggregierend wirkt.^[139, 141, 142]

Gegenüber Lipiden haben Peptide den Vorteil, dass sich ihre Konzentration über UV/Vis-Messungen bestimmen lässt. Daher konnte eine Charge Peptid komplett in HFIP gelöst und die Stoffmenge von je 15 nmol über die Absorption der Lösung bestimmt werden. Da die hier verwendeten Peptide keine aromatischen Aminosäuren enthielten, wurde die Konzentrationsbestimmung bei 214 nm durchgeführt, da bei dieser Wellenlänge die Peptidbindungen absorbieren. Verschiedene Aminosäuren haben zusätzlich zum Extinktionskoeffizienten des Peptidrückgrats eigene Extinktionskoeffizienten, die in einer Publikation von *Kuipers* und *Gruppen* zusammengefasst sind.^[145] Durch diese Methode selbst, sowie die Tatsache, dass die Peptide in HFIP gelöst und gehandhabt wurden, ergaben sich Ungenauigkeiten in der Konzentrationsbestimmung. Da allerdings das Präparationsprotokoll für alle Proben unverändert blieb, ließen sich diese Abweichungen als systematische Fehler zusammenfassen. Zusätzlich diente die Vorgabe von 15 nmol lediglich als Richtwert, um die notwendige Peptidmenge abzuschätzen. Nach der Präparation der Peptidpartikel wurde deren Konzentration, falls nötig, über die gleiche Methode nochmals in wässriger Lösung bestimmt.

4.4.2 Partikelpräparation

Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Leucin-Varianten konnte ein Film von **HLHP4** zunächst nicht in wässrigem Puffer hydratisiert werden. Daher wurde nach alternativen Lösungsmitteln gesucht. Es konnte festgestellt werden, dass sich **HLHP4** in einer Vielzahl organischer Lösungsmittel lösen ließ. Dazu zählten Alkohole von Methanol bis *n*-Butanol, Tetrahydrofuran, chlorierte Lösungsmittel und auch sehr unpolare Lösungsmittel wie *n*-Pentan. Aufgrund von Faktoren wie Mischbarkeit mit Wasser und Toxizität wurde schlussendlich Ethanol als beste Alternative gewählt. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass einige Experimente der Größencharakterisierung und auch Messungen der Sekundärstruktur zusätzlich in Methanol durchgeführt wurden, ohne dabei signifikante Unterschiede in den Ergebnissen zu erhalten. Da allerdings Methanol aufgrund seiner Toxizität nicht biokompatibel ist, wurden diese Ansätze nicht weiterverfolgt.

Für die Partikelpräparation wurde der Peptidfilm zunächst in einer kleinen Menge Ethanol (10 μL) gelöst und anschließend wässriger Puffer (190 μL) zugegeben. Die Pufferkonzentration der zugegebenen Lösung lag in den meisten Fällen bei 10 mM, da bei einer finalen Peptidkonzentration von 100 μM bis 150 μM ein nahezu 100-facher Überschuss ausreichend schien, um die Pufferkapazität der Lösung aufrechtzuerhalten. Zusätzlich konnte bei Experimenten mit höheren Pufferkonzentrationen festgestellt werden, dass ab etwa 50 mM ein Ausfallen der Peptide zu beobachten war. In Testreihen mit verschiedenen Puffersubstanzen wurde Zitronensäure als geeignetste Substanz identifiziert. Im Citratpuffer wurde die geringste Präzipitation bei Zugabe, sowie die beste Reproduzierbarkeit der Partikelgrößen erreicht. Daher wurde dieser Puffer für den Großteil der Experimente verwendet.

Eine Ausnahme bildete die Präparation bei neutralem pH-Wert. Hier konnte bei Zugabe von 10 mM Citratpuffer eine starke Präzipitation des Peptids festgestellt werden. Auch bei Reduktion der Pufferkonzentration auf 1 mM konnte ein Ausfallen nicht verhindert werden. Die Alternative bestand in der Verwendung von 1 mM Phosphatpuffer, in dessen Anwesenheit die Präzipitation minimiert werden konnte. Höhere Konzentrationen des Phosphatpuffers führten aber ebenfalls zur Präzipitation. Dieses Verhalten konnte zunächst nicht erklärt werden. Hinweise auf mögliche Ursachen lieferten spätere Untersuchungen zu **HLHP5** und **HLHP6** (s. Abschnitt 4.9.3).

4.4.3 Größenbestimmung der Partikel von **HLHP4** in Lösung

Das Lösen des Peptidfilms von **HLHP4** in Ethanol und anschließende Zugabe des Puffers führte zur spontanen Selbstassemblierung der Peptide, wie sich durch Dynamische Lichtstreuung (DLS) zeigen ließ. Bei dieser Methode wird ein Laser durch eine Probe dispergierter Partikel geleitet und ein Teil des Lichts an den Partikeln gestreut. Über die

Interferenzen des Streulichts und die Geschwindigkeit der Partikel in Lösung wird eine Größenverteilung errechnet. Für die Berechnung der Größenverteilung wird allerdings von einer punktförmigen Streuquelle ausgegangen. Daher wird bei der Berechnung zunächst eine hypothetische Kugel modelliert. Anschließend wird der Durchmesser der Kugel so lange variiert, bis sich die gemessenen Werte mit einem bestimmten Kugeldurchmesser korrelieren lassen. Daher werden bei der DLS-Messung keine Informationen über die dreidimensionale Struktur der dispergierten Teilchen erhalten. Für runde Partikel entspricht die gemessene Größe aber meist dem hydrodynamischen Durchmesser. Dieser ist definiert als der Durchmesser des Partikels mit eng gebundener Solvathülle.^[146] Für **HLHP4** sind repräsentative DLS-Messungen in Abbildung 15 gezeigt.

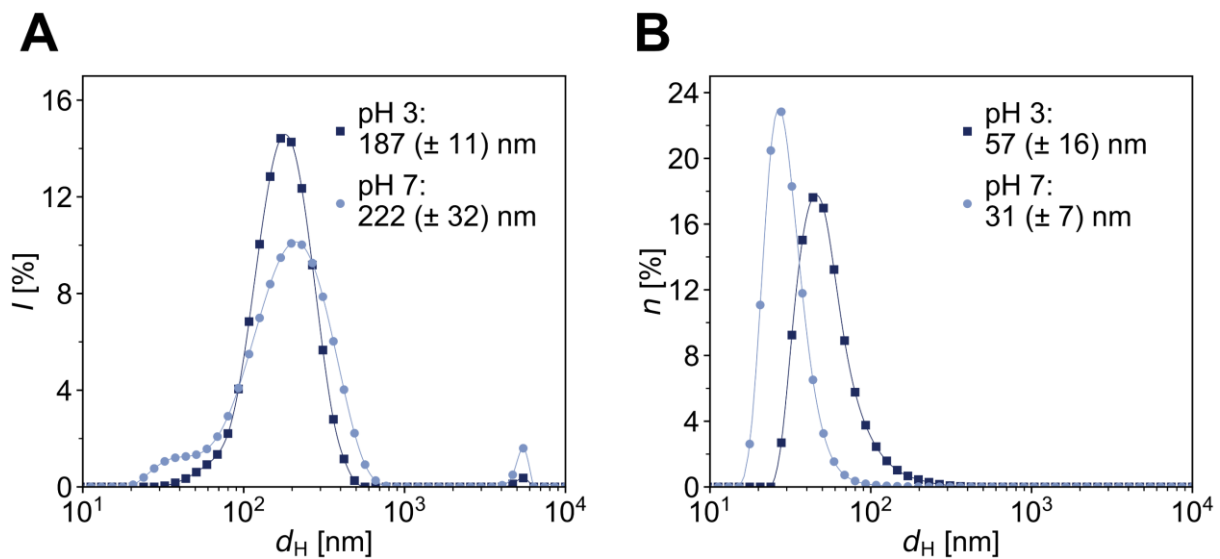


Abbildung 15. **A** Intensitäts-basierte Größenverteilung repräsentativer DLS-Messungen von α -helikalem **HLHP4** bei pH 3 (dunkelblau, 5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und pH 7 (hellblau, 5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). **B** Darstellung der gleichen Messungen als Größenverteilung nach Anzahl n . Alle Werte sind Mittelwerte einer Triplettmessung.

Durch den hohen pK_S -Wert der Arginine konnte eine positive Ladung der Partikel über einen weiten pH-Bereich angenommen werden.^[132] Durch den Zusammenhang zwischen Ladung und Amphiphilie des Helix-Loop-Helix-Motivs, galt diese Annahme ebenso für die Partikelstabilität. Daher wurden die Peptidpartikel sowohl bei pH 3 (Citratpuffer) als auch bei pH 7 (Phosphatpuffer) untersucht. Mit Hilfe der DLS konnten für beide Bedingungen hydrodynamische Durchmesser zwischen 20 nm und 700 nm bestimmt werden (Abbildung 15A).

Da die Streuintensität bei Verzehnfachung des Durchmessers, um etwa den Faktor 10^6 zunimmt,^[146] werden in der DLS die Signale größerer Partikel überschätzt. Entsprechend spiegelt die Verteilung nach Streuintensität (Abbildung 15A) nicht die tatsächlichen Verhältnisse in Lösung wider. Eine entsprechende Korrektur resultierte in der Größenverteilung nach Partikelzahl n (Abbildung 15B).^[146] Hier ließ sich erkennen, dass die Proben in beiden Fällen größtenteils Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser

kleiner 100 nm enthielten. Dabei schienen die Partikel im sauren Milieu etwas größer zu sein, obwohl sich in diesem Fall nicht zwingend von einem signifikanten Unterschied sprechen lässt, da die Partikelgrößen selbst bei Filmen aus der gleichen Charge einer minimalen Variation unterworfen waren.

An dieser Stelle soll noch angemerkt werden, dass auch Experimente im basischen Milieu durchgeführt wurden. Bei pH-Werten ab etwa pH 12 oder höher sollte keine positive Ladung an den Argininen mehr vorliegen und dies einen Verlust des amphiphilen Charakters nach sich ziehen. Tatsächlich wurde bei Zugabe von 1 M NaOH (pH 14) zu einer Lösung aus assemblierten Peptiden, Präzipitation beobachtet (Abbildung 65). Ebenfalls konnten keine Assemblate bei Zugabe von 1 M Natronlauge zu der ethanolischen Lösung erhalten werden.

4.4.4 Bestimmung der Sekundärstruktur von **HLHP4**

Die spezielle Wechselwirkung zwischen chiralen Molekülen, wie Peptiden oder Proteinen, und chiralen Medien kann sich bei Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptiden mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie zu Nutze gemacht werden. Dabei wird zirkular polarisiertes Licht (helikale Chiralität) verschiedener Wellenlängen durch eine Peptidprobe gestrahlt. Wenn abwechselnd links- und rechts-zirkularpolarisiertes Licht mit dem Peptid interagiert, lässt sich ein Unterschied in der Absorption durch das Peptid zwischen den Polarisationsrichtungen erkennen. Die Absorptionsdifferenzen bei verschiedenen Wellenlängen können als Spektrum dargestellt werden. Alle Sekundärstrukturen, die bei Peptiden auftreten können, lassen sich durch ein charakteristisches CD-Spektrum im UV-Bereich zwischen 190 nm und 260 nm unterscheiden. Ein Vergleich von CD-Spektren zwischen unterschiedlichen Peptiden ist durch die Berechnung der mittleren Restelliptizität (MRE, *mean residue ellipticity*, $[\Theta]$) möglich, bei der das CD-Signal auf Peptidkonzentration und Bindungszahl normiert wird.^[147-149]

Aufgrund der hohen Neigung von Leucin zur Bildung von α -helikalen Strukturen^[131] wurde folglich diese Sekundärstruktur auch in den Assemblaten erwartet. Die Proben aus der DLS-Messung wurden im Anschluss mittels CD-Spektroskopie untersucht. Wie in Abbildung 16 gezeigt, wurden tatsächlich unter beiden Bedingungen die charakteristischen CD-Spektren einer α -Helix erhalten. Diese zeichnen sich durch zwei Minima bei 222 nm und 208 nm, sowie ein Maximum bei 193 nm aus.^[147-149]

Liegen in einem Peptid mehrere Sekundärstrukturelemente vor, äußert sich dies im CD-Spektrum durch anteilige Überlagerung der jeweiligen Spektren.^[147-149] Daher wurden beide Datensätze in Abbildung 16A mit Hilfe des Analyseprogramms *BeStSel* auf ihre Sekundärstrukturelemente untersucht.^[150-152] Es wurde für beide Spektren kein weiteres Strukturelement außer der α -Helix gefunden (Abbildung 66 und Abbildung 67).

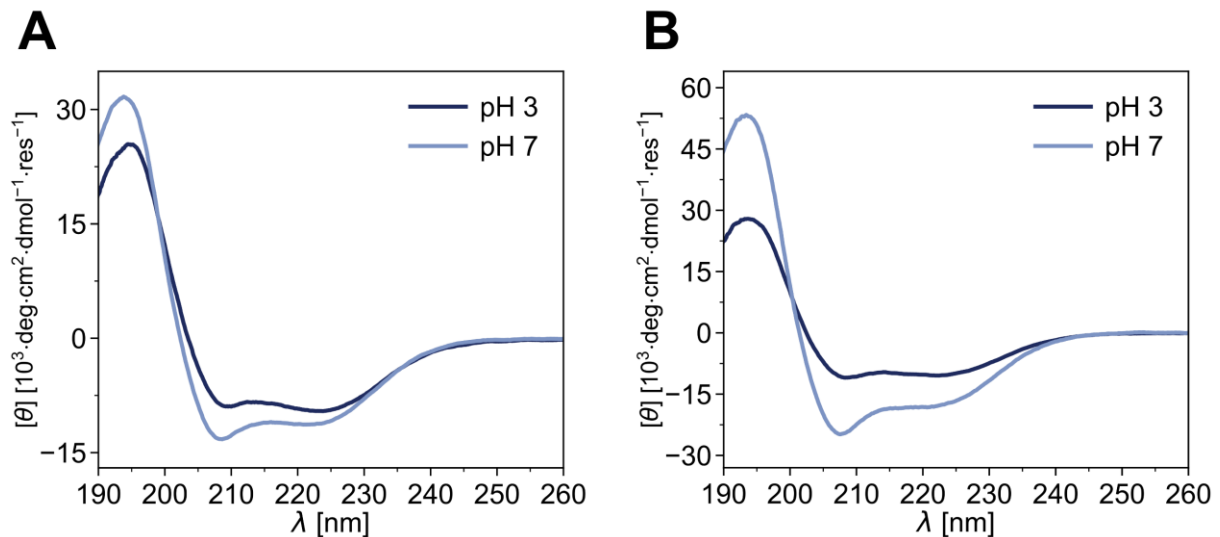


Abbildung 16. **A** CD-Spektrum von α -helikalen **HLHP4**-Partikeln nach Präparation bei pH 3 (dunkelblau, 5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und pH 7 (hellblau, 5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). **B** Duplikatmessung unter identischen Bedingungen. Unterschiede in der Intensität der Spektren im Vergleich zur ersten Messung unterstreichen die Probleme bei der genauen Bestimmung der Peptidkonzentration aufgrund der Lichtstreuung an den Partikeln.

Ein auffälliger Unterschied zwischen den beiden Spektren war das Verhältnis der jeweiligen Minima zueinander. Während der Kurvenverlauf charakteristisch für die Sekundärstruktur ist, lässt sich bei α -Helices das Ausmaß der Helix-Interaktion über das Verhältnis 222/208 nm der beiden Minima errechnen.^[153-155] Dies ergab eine stärkere Wechselwirkung der Helices bei pH 3 mit einem Wert von 1,13, während bei neutralem pH-Wert ein Wert von 0,85 errechnet wurde. Zusätzlich trat bei pH 7 eine Verschiebung des Maximums zu niedrigeren Werten auf. Obwohl die α -helikale Sekundärstruktur in allen Fällen reproduziert werden konnte, gab es doch Unterschiede in der Intensität der CD-Spektren (Abbildung 16B). Ursache dafür ist vermutlich die Lichtstreuung an den Partikeln, die eine genaue Bestimmung der Peptidkonzentration erschwerte.

4.4.5 Visualisierung der Peptidpartikel von **HLHP4** durch Elektronenmikroskopie

Da sich weder über DLS noch über CD-Spektroskopie Aussagen zur Morphologie der Partikel treffen ließen, wurden bildgebende Verfahren angewendet. Dabei wurde sowohl auf Elektronenmikroskopie als auch auf Rasterkraftmikroskopie (RKM, englisch *atomic force microscopy*, *AFM*) zurückgegriffen.

Erstere ist in der Funktionsweise vergleichbar mit Lichtmikroskopie. Allerdings werden in diesem Fall statt Licht Elektronen verwendet, die sowohl die Probe abrastern als auch durchdringen können. Nach der Interaktion der Elektronen mit der Probe lässt sich aus den erhaltenen Daten ein Bild generieren. Da die Wellenlänge von Elektronen nach der *deBroglie* Beziehung sehr klein ist, lassen sich damit deutlich höhere Auflösungen erreichen.^[156, 157]

Rasterkraftmikroskopie hingegen verwendet einen Cantilever mit einer Spitze aus einem leitenden Material, der in einigen Nanometer Entfernung über die Probe bewegt oder direkt in

Kontakt mit der Probe gebracht wird. Der Cantilever rastert die gesamte Probe ab und folgt dabei dessen Oberflächenstruktur. Die Bewegungen des Cantilevers als Reaktion auf die Topographie der Oberfläche werden über einen Laserstrahl ausgelesen, der auf den Cantilever gerichtet ist und dessen Bewegungen amplifiziert, sodass auch kleinere Höhenänderungen an der Probe zuverlässig ausgelesen werden können. Dadurch lässt sich die gesamte dreidimensionale Struktur der Probe vermessen, während man bei Elektronenmikroskopie nur eine zweidimensionale Aufnahme erhält. Allerdings ist die Auflösung der Rasterkraftmikroskopie durch Größe der Spitze und Justierbarkeit der Elektronik beschränkt, sodass zumindest mit den in dieser Arbeit verwendeten Geräten eine höhere laterale Auflösung durch Elektronenmikroskopie erhalten werden konnte.^[157, 158]

Die mit DLS und CD-Spektroskopie vermessenen Proben konnten nachfolgend auch für die Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie verwendet werden. Für die Elektronenmikroskopie wurde die Partikelsuspension auf ein sogenanntes Kupfergrid aufgetragen. Dieses enthält hexagonale Löcher, die mit einer dünnen Lage aus graphitbeschichtetem Kunststoff überzogen sind, sodass sowohl ein Abrastern der Probe als auch eine Messung der transmittierten Elektronen möglich sind (*scanning and transmission electron microscopy*, STEM). Eine vorherige Behandlung des Substrats im Plasmareiniger hilft dabei, den Kohlenstoff hydrophiler zu machen und damit eine bessere Verteilung der Probenlösung zu erreichen.^[159] Puffersalze wurden durch mehrmaliges Waschen der Probe mit Wasser entfernt. Hier war die schlechte Wasserlöslichkeit der Peptide von Vorteil, die ein Abwaschen der Probe vom Substrat verhinderte. Ein abschließendes *Staining* mit wässriger Uranylacetat-Lösung diente zur Kontrastierung der Partikel gegen den Hintergrund.^[159] Dadurch gelang eine Visualisierung der Peptidpartikel, wie in Abbildung 17A-B gezeigt, für beide pH-Werte.

Die Peptide assemblierten in sphärische Partikel. Ebenso ließ sich eine Vielzahl kleinerer Partikel unter 100 nm Durchmesser detektieren, wie es sich aus der Verteilung nach Partikelanzahl aus den DLS-Experimenten erwartbar war. Die STEM-Mikrographien gaben außerdem Aufschluss über die interpartikulären Wechselwirkungen. Unter beiden untersuchten Bedingungen bildeten die Partikel einzelne Gruppen (*Cluster*) und schienen aneinander zu haften. Es ließen sich aber auch einzelne Partikel beobachten (Abbildung 17C). Trotz der stärkeren Helix-Interaktion im sauren Milieu ließen sich in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine pH-spezifischen Unterschiede in der Morphologie erkennen.

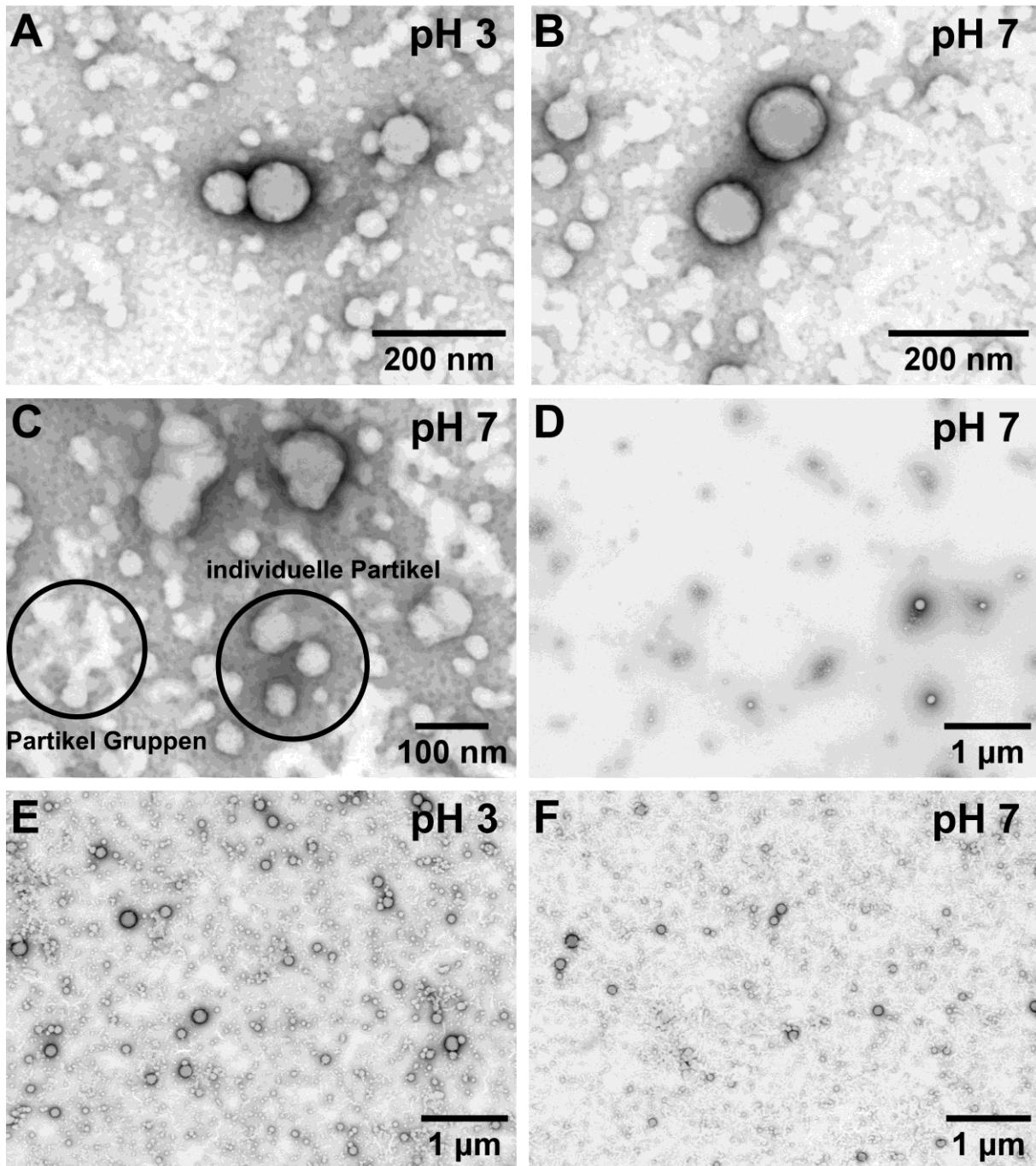


Abbildung 17. STEM-Mikrographien zur Charakterisierung von α -helikalen **HLHP4**-Partikeln. **A** Detaillierte Aufnahme der Partikel bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) direkt nach der Präparation. **B** Detaillierte Aufnahme der Partikel bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) direkt nach der Präparation. **C** Veranschaulichung der interpartikulären Wechselwirkungen anhand einer Detailaufnahme der **HLHP4**-Partikel bei pH 7. Es lassen sich sowohl Partikelgruppen als auch einzelne Partikel beobachten. **D** Verdünnte Probe von **HLHP4**-Partikeln in der Übersicht. Die Konzentration in dieser Probe betrug 20 % des Ausgangswertes. Neben einer reduzierten Gesamtzahl an Partikeln lässt sich eine Inselbildung erkennen. **E-F** Übersichtsaufnahmen der Proben bei pH 3 (**E**) und pH 7 (**F**) zur Veranschaulichung der Ausbeute der Assemblierung.

Die Tendenz der Partikel zur Gruppenbildung konnte durch Experimente in verdünnter Lösung bestätigt werden. Dabei wurde eine Probe von **HLHP4** auf 20 % der üblichen Konzentration verdünnt (Abbildung 17D). Während die Zahl der Partikel dadurch abnahm, führten die starken Wechselwirkungen zwischen den Partikeln zu einer Inselbildung.

Anhand der Übersichtsbilder ließ sich veranschaulichen, wie hoch die Ausbeute der Assemblierung unter beiden Bedingungen tatsächlich war (Abbildung 17E-F). Es konnte daher zum einen gezeigt werden, dass die erwartete Bildung sphärischer Assemblate tatsächlich stattfand und somit die grundlegenden Überlegungen zum Aufbau der Peptide korrekt waren. Zum anderen wurde auch die Vermutung bestätigt, dass Leucin zur Bildung stabiler Partikel besser geeignet war als Alanin.

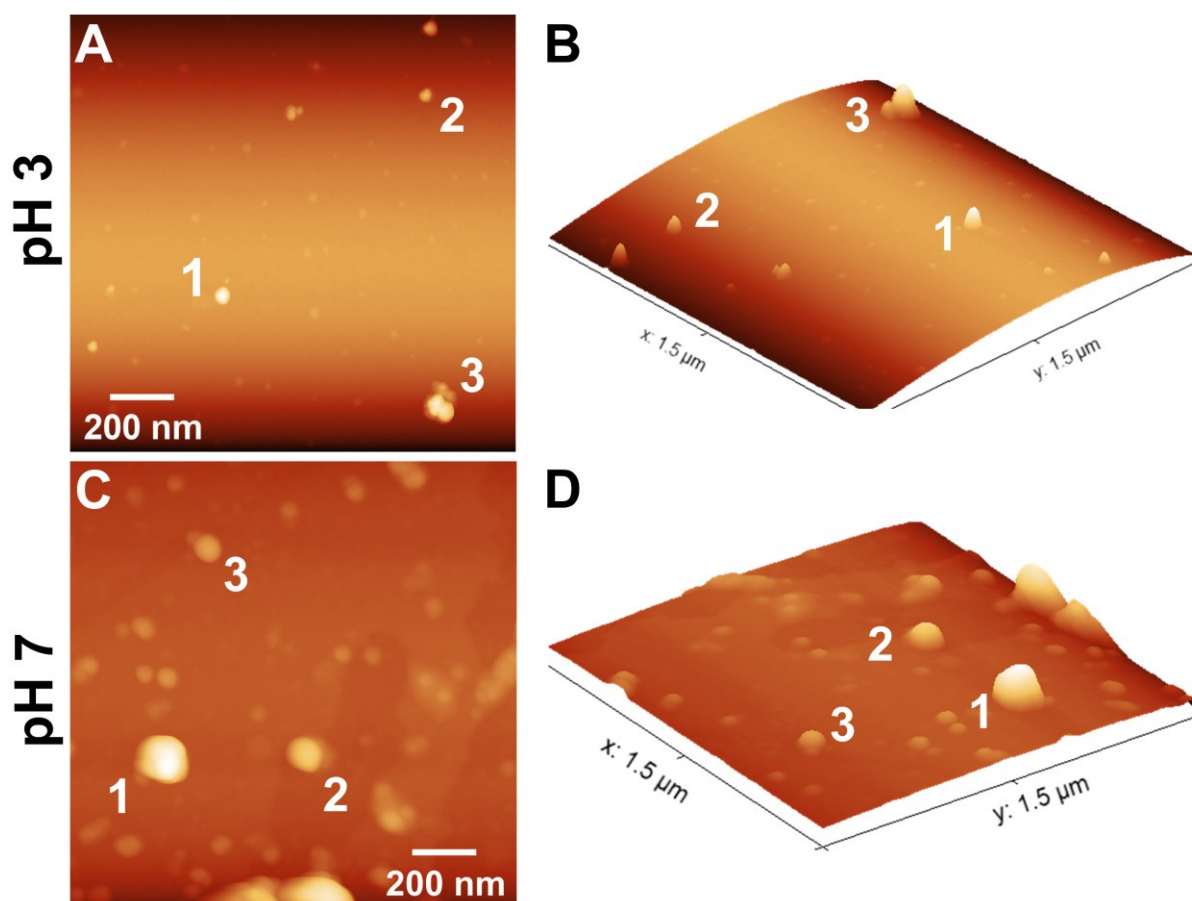


Abbildung 18. **A** Zweidimensionale RKM-Aufnahme (1,5 x 1,5 µm) α-helikaler **HLHP4**-Partikel bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) direkt nach Präparation und Lagerung über Nacht im Vakuum. Die Partikel, deren Höhenprofile ausgewertet wurden, sind mit Zahlen markiert. **B** Dreidimensionale Rekonstruktion der gleichen Aufnahme. **C** Zweidimensionale RKM-Aufnahme (1,5 x 1,5 µm) α-helikaler **HLHP4**-Partikel bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) direkt nach Präparation und Lagerung über Nacht im Vakuum. Die Partikel, deren Höhenprofile ausgewertet wurden, sind mit Zahlen markiert. **D** Dreidimensionale Rekonstruktion der gleichen Aufnahme.

Alle Aufnahmen wurden im intermittierenden Modus (*tapping mode*) aufgenommen. Übersichtsaufnahmen der Dimension 5 x 5 µm sind in Abbildung 68 gezeigt.

Die dreidimensionale Struktur der Peptidpartikel wurde über Rasterkraftmikroskopie aufgeklärt. Zu Beginn wurden die Proben identisch zur Elektronenmikroskopie auf einem Kupfergrid ohne Nachkontrastierung präpariert und unter Vakuum gelagert. Allerdings war die Oberfläche der Grids zu uneben und das Kupfergerüst zu anfällig für thermischen Drift, um detaillierte Aufnahmen mit langsamer Scanrate machen zu können. Daher wurden die Proben auf für die RKM üblichen *Mica* Substraten immobilisiert. Diese bestehen aus dünnen Scheiben

Muskovit. Die einzelnen Lagen des Muskovit-Kristalls lassen sich mit Klebeband abziehen, sodass extrem glatte Oberflächen erhalten werden.^[160, 161] Die zweidimensionalen Aufnahmen und 3D-Rekonstruktionen aus den RKM-Messungen sind in Abbildung 18 gezeigt.

Zum einen ließ sich feststellen, dass die Verteilung der Partikelgrößen auch bei Auftragung auf *Mica* Substrat nicht grundsätzlich von denen auf dem Kupfergrid abwich. Neben vielen kleinen Partikeln waren auch, ähnlich wie auf den STEM-Mikrographien, einige größere Strukturen vorhanden. Ebenso sind auch in den RKM-Aufnahmen keine signifikanten morphologischen Unterschiede zwischen den beiden pH-Werten zu erkennen. Die Höhen von je drei ausgewählten Partikeln wurden in *x*- und *y*- Richtung vermessen und sind in Abbildung 19 dargestellt.

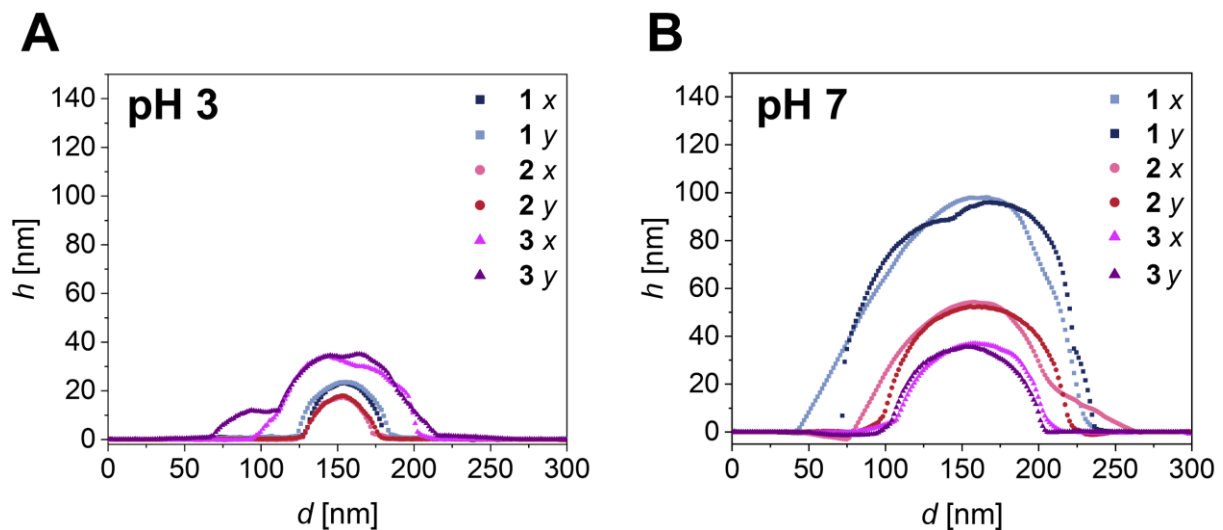


Abbildung 19. **A** Höhenprofile der Partikel 1 - 3 in *x*- und *y*-Richtung aus der RKM-Aufnahme bei pH 3 (Abbildung 18). **B** Höhenprofile dreier Partikel in *x*- und *y*-Richtung bei pH 7 aus der RKM-Aufnahme in Abbildung 18. In beiden Diagrammen sind die Datenpunkte folgendermaßen farblich markiert: Partikel 1 (*x*: dunkelblaue Quadrate, *y*: hellblaue Quadrate), Partikel 2 (*x*: hellrote Kreise, *y*: dunkelrote Kreise), Partikel 3 (*x*: hellviolette Dreiecke, *y*: violette Dreiecke).

Es zeigt sich ein Unterschied in den Höhen der Partikel zwischen den beiden pH-Werten. Dies lässt sich auf die Messung kleinerer Partikel bei pH 3 zurückführen.

Im Einklang mit den DLS-Messungen wiesen einzelne Partikel Durchmesser von 100 nm oder darunter auf. Ein Vergleich zwischen pH 3 und pH 7 lässt zunächst den Schluss zu, dass die Partikel bei pH 3 eine geringere Ausdehnung in *z*-Richtung haben. Allerdings muss beachtet werden, dass bei pH 3 auch Partikel mit kleinerem Durchmesser vermessen wurden. Da die Größe der Partikel mit ihrer Höhe korrelierte, erklärt dies den anscheinenden Unterschied. Vergleicht man Partikel gleichen Durchmessers, z.B. Partikel 3 bei pH 3 mit Partikel 3 bei pH 7, ergeben sich für beide Partikel vergleichbare Höhen. Aus den STEM-Mikrographien, sowie den Höhenprofilen lässt sich zudem erkennen, dass die Partikel trotz vorheriger Lagerung im Vakuum in beiden Fällen nicht kollabierten. Durch die Dehydratation während der Fixierung auf einen Träger und die Lagerung sowie Untersuchung im Vakuum, kommt es bei Lipidvesikeln oft zu einem Kollaps der Partikel, der becherförmige Strukturen entstehen lässt.^[159, 162, 163] Da diese Strukturen hier nicht beobachtet wurden, lässt dies entweder auf eine gewisse Rigidität

der Außenhülle oder das Fehlen eines großen inneren Hohlraums schließen, aus dem Wasser verdampfen könnte. In verschiedenen Literaturquellen wird beschrieben, dass Lipide auch scheibenförmige Bicellen bilden können.^[60, 159, 164, 165] Diese ähneln morphologisch den hier beobachteten Partikeln. Allerdings ist das Vorliegen von Bicellen hier unwahrscheinlich, da die Partikel alle eine Höhe von mehr als zwei Monomereinheiten (ca. 4 – 5 nm / HLH-Monomer) aufweisen, die für Bicellen typisch sind.^[6, 60]

Die Dimensionen in *x*-Richtung waren bei nahezu allen Partikeln mit denen in *y*-Richtung identisch, wodurch die runde Form der Partikel bestätigt wurde. Interessanterweise entsprach die Partikelhöhe in allen Fällen etwa 40 - 50 % des Durchmessers, wodurch die dreidimensionale Struktur einem abgeplatteten Rotationsellipsoid ähnelt. Allerdings könnte eine Abflachung der Strukturen auch ein Artefakt der Fixierung und Analyse der Probe durch die RKM sein.^[163, 166]

4.4.6 Zusammenfassung

Im Abschnitt 4.4 wurden Aspekte der grundlegenden Charakterisierung von **HLHP4** beleuchtet. Es wurde die Vorgehensweise zur Filmpräparation im Allgemeinen beschrieben, sowie die Partikelpräparation mit den einzelnen Komponenten rationalisiert. Des Weiteren wurden Ergebnisse der Größencharakterisierung der Partikel von **HLHP4** in Lösung und die Messung der α -helikalen Sekundärstrukturen beschrieben. Anschließend wurde gezeigt, wie die partikuläre Struktur der selbstassemblierten Peptide mittels Elektronenmikroskopie bestätigt werden konnte. Messungen mit Rasterkraftmikroskopie bekräftigten die bisherigen Ergebnisse und lieferten Einsichten in die dreidimensionale Struktur der Assemblate.

4.5 Untersuchungen zur Langzeitstabilität der Partikel von α -helikalem HLHP4

4.5.1 Stabilitätsuntersuchungen mit DLS

Nachdem die erfolgreiche Selbstassemblierung von **HLHP4** nachgewiesen werden konnte, stellte sich anschließend die Frage nach der Langzeitstabilität der Partikel. Dazu wurden Proben bei pH 3 und pH 7 für eine Woche jeweils bei 4 °C und bei Raumtemperatur gelagert und regelmäßig im DLS vermessen, sowie die Partikelmorphologie im STEM visualisiert. In Abbildung 20 sind zunächst die Größenverteilungen aus den DLS-Messungen dargestellt.

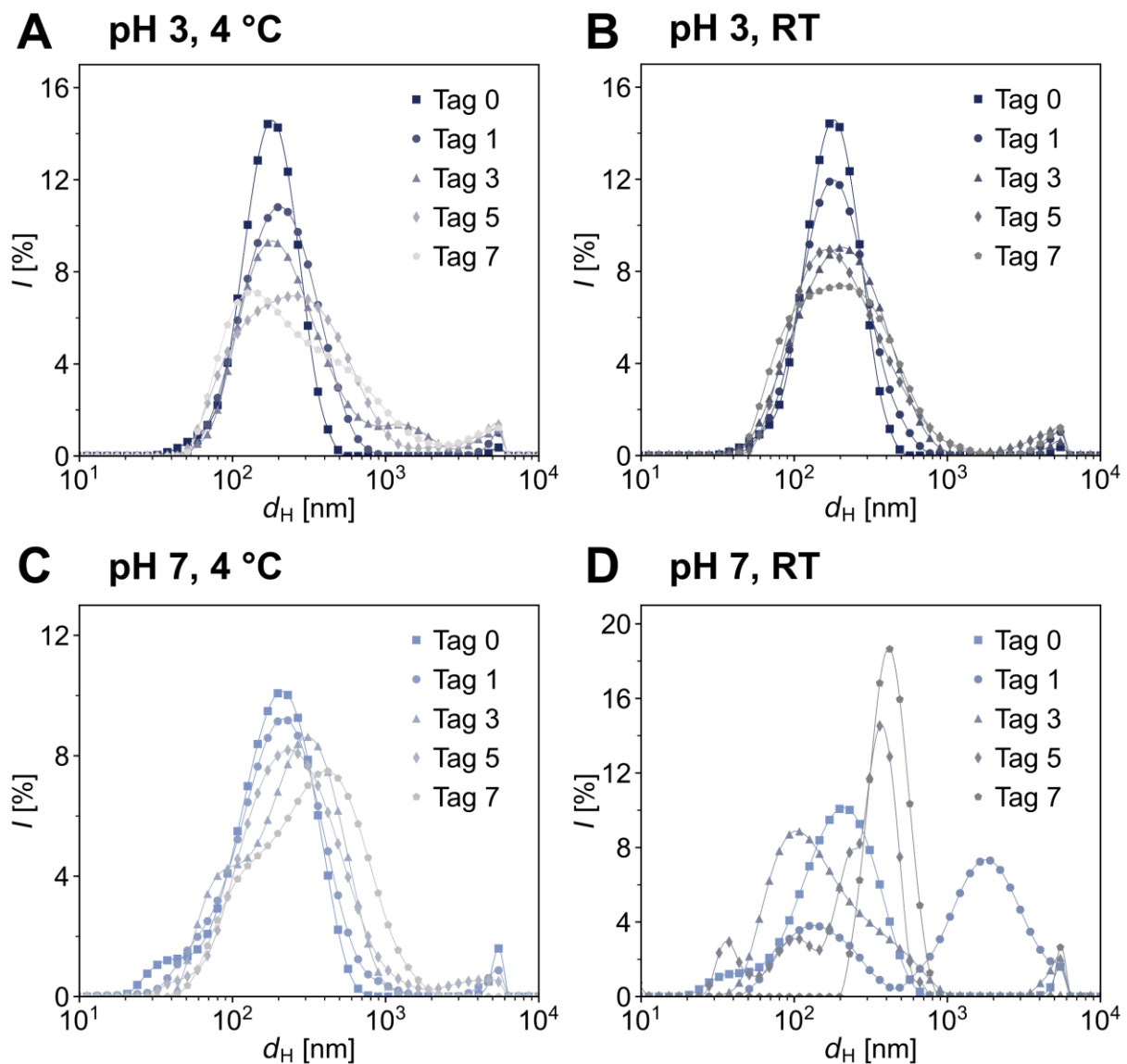


Abbildung 20. DLS-Größenverteilungen nach Intensität für Peptidpartikel von α -helikalem **HLHP4** gemessen über den Zeitraum von einer Woche unter verschiedenen Bedingungen. **A** Präparation bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und Lagerung bei 4 °C. **B** Präparation bei pH 3 und Lagerung bei Raumtemperatur. **C** Präparation bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) und Lagerung bei 4 °C. **D** Präparation bei pH 7 und Lagerung bei Raumtemperatur. Dargestellt sind Messungen nach Präparation (Tag 0), Tag 1, Tag 3, Tag 5 und Tag 7. Die Größenwerte der Hauptspezies sind tabellarisch in Tabelle 22 dargestellt. Alle gezeigten Werte sind Mittelwerte von Triplettmessungen. Eine Übersicht der Messungen an geraden Tagen, an denen keine STEM-Aufnahmen durchgeführt wurden, ist in Abbildung 69 dargestellt.

Im Allgemeinen waren die Suspensionen bei 4 °C stabiler als bei Raumtemperatur. Dies zeigt sich insbesondere beim Vergleich der Messungen bei pH 7 und lässt sich mit einer Abnahme der Aggregationsgeschwindigkeit der Partikel bei niedrigeren Temperaturen erklären. Dennoch nahmen auch bei 4 °C die hydrodynamischen Durchmesser im Lauf der Zeit zu, da sich größere Partikelcluster bildeten. Die Änderungen waren im sauren Milieu weniger ausgeprägt, was auf stabilere Partikel unter diesen Bedingungen hindeutete. Diese Tendenz war bereits in den zuvor gemessenen CD-Spektren (Abbildung 16) angedeutet, da hier eine stärkere Helix-Interaktion bei pH 3 beobachtet werden konnte.

Auch bei einer Lagerung bei Raumtemperatur wurde durch DLS ein langsames Partikelclustering bei pH 3 als bei pH 7 bestimmt. Es kam in beiden Fällen nach wenigen Tagen zu sichtbarer Aggregation der Proben, wie beispielhaft in Abbildung 70A gezeigt. In der elektronenmikroskopischen Aufnahme zeigen sich diese Aggregate als große Bereiche zusammenhaftender Partikel, die auch kurze fibrilläre Strukturen enthalten (Abbildung 70B,C). Allerdings wurden diese Aggregate aufgrund ihrer Größe nicht vom Messgerät wahrgenommen und äußerten sich daher nicht in den Messdaten. Dadurch lässt sich die scheinbare Konstanz der Größenmessungen bei pH 3 (Raumtemperatur) erklären. Bei pH 7 aggregierten und desintegrierten die Partikel so schnell, dass bereits nach 24 Stunden signifikante Änderungen in der Größenverteilung zu erkennen waren.

Über die Ursachen der Stabilitätsunterschiede kann nur gemutmaßt werden, da keine gezielten Untersuchungen zu dieser Fragestellung durchgeführt wurden. Da Unterschiede im Protonierungszustand der Arginine in diesem pH-Bereich aufgrund des hohen pK_S -Werts des Peptids keine Rolle spielen sollten,^[132] wäre eine Ursache in den intermolekularen Wechselwirkungen der Monomere oder den verschiedenen Puffersubstanzen zu suchen. Die Ergebnisse der CD-Messungen lieferten bereits einen Hinweis auf stärkere Wechselwirkungen zwischen den α -Helices bei pH 3 und könnten damit auf eine dichter gepackte Membran im sauren Milieu hindeuten. Ob sich dadurch die pH-spezifischen Unterschiede in den Stabilitäten vollständig erklären lassen, bleibt allerdings offen. Ein weiterer Faktor für die Partikelstabilität könnten die verschiedenen Puffersubstanzen sein, die für die Partikelpräparation verwendet wurden. Durch ihren multidentaten Charakter könnten die Citrationen bei pH 3 die positiv geladenen Partikel durch elektrostatische Wechselwirkungen besser stabilisieren als die Phosphationen bei pH 7 und damit die Stabilität der Assemblate unter sauren Bedingungen weiter erhöhen. Zusätzlich war die Pufferkonzentration bei pH 7 um ein Zehnfaches im Vergleich zu pH 3 verringert. Da aber eine Erhöhung der Pufferkonzentration sowie eine Änderung der Puffersubstanz im neutralen Milieu zum Ausfallen des Peptids führten, konnten dazu keine weiteren Untersuchungen durchgeführt werden.

4.5.2 Visualisierung der Partikelstabilität mit Elektronenmikroskopie

Parallel zu den DLS-Messungen wurde die Morphologie der Partikel im Elektronenmikroskop verfolgt. Im Allgemeinen wurden die Ergebnisse der DLS-Messungen durch die mikroskopischen Untersuchungen untermauert. Abbildung 21 zeigt eine Übersicht der Aufnahmen bei pH 3 und einer Lagerung bei 4 °C.

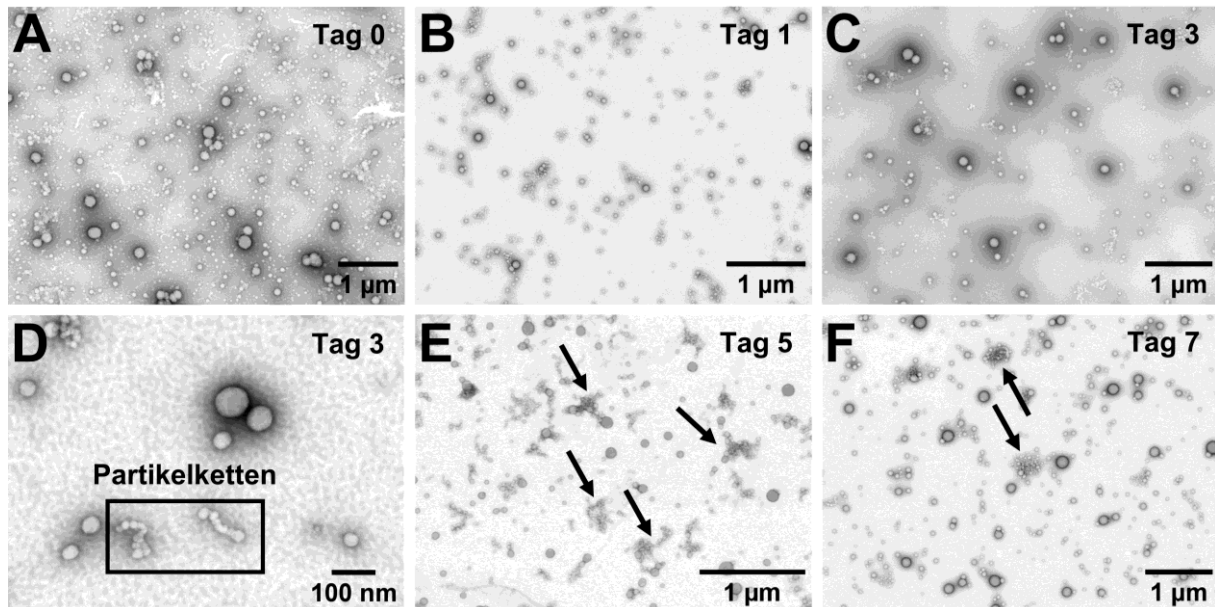


Abbildung 21. Übersicht der STEM-Mikrographien der Langzeitmessung von α -helikalem **HLHP4** bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und einer Lagerung bei 4 °C. Die Aufnahmen zeigen die Probe nach Präparation (**A**), nach 1 Tag (**B**), 3 Tagen (**C**, **D**), 5 Tagen (**E**) und 7 Tagen (**F**). **C** Detail einer Partikelkette wie sie als Teil des Aggregationsprozesses nach drei Tagen entstehen. Einige Aggregate sind beispielhaft mit Pfeilen markiert.

Zu Beginn der Messung (Tag 0) ähnelten die Morphologien der Partikel den im vorherigen Kapitel gezeigten Aufnahmen. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit des Selbstassemblierungsprozesses untermauert. Im Verlauf des Messzeitraums änderte sich die Morphologie der Probe kaum. Durch Aggregatbildung schien die Partikelzahl auf den Aufnahmen leicht abzunehmen. Es zeigte sich aber keine großflächige Aggregation. Somit waren die mikroskopischen Beobachtungen in einer Linie mit den DLS-Messungen. Anzeichen einer leichten Aggregation zeigten sich in den Partikelansammlungen, die in den Aufnahmen der Tage fünf und sieben markiert sind. Interessant war die Bildung kurzer Partikelketten, wie sie in Abbildung 21D gezeigt sind. Dabei hafteten die kleinsten Partikel zusammen, ohne zu aggregieren und bilden so elongierte Strukturen. Viele der scheinbar fibrillären Strukturen, die auf den Aufnahmen in dieser Arbeit zu sehen sind, bestanden aus diesen kurzen Partikelketten, die aber nur in detaillierten Nahaufnahmen als solche zu identifizieren sind. Ein ähnliches Bild ergab sich bei den Proben von α -helikalem **HLHP4** bei pH 7 und einer Lagerung bei 4 °C (Abbildung 22). Hier schritt die Aggregatbildung schneller voran und war schon nach drei Tagen sichtbar. Eine Nahaufnahme der Clusterregionen offenbarte eine Mischung aus einzelnen Partikeln und fibrillären Strukturen, deren Ursprung in der

Kettenbildung kleiner Peptidpartikel lag (Abbildung 21D). In Übereinstimmung mit den DLS-Ergebnissen war wie zuvor bei pH 3 keine signifikante Vergrößerung der Partikel im Laufe der Zeit zu beobachten. Die geringere Stabilität der Partikel äußerte sich aber in der Bildung größerer Cluster an Tag 7 im Vergleich zur Messung bei pH 3. Zudem war die Partikelzahl nach sieben Tagen im Vergleich zum Beginn deutlich erniedrigt und zeigt damit ebenfalls die schnellere Aggregation der Partikel im neutralen Milieu.

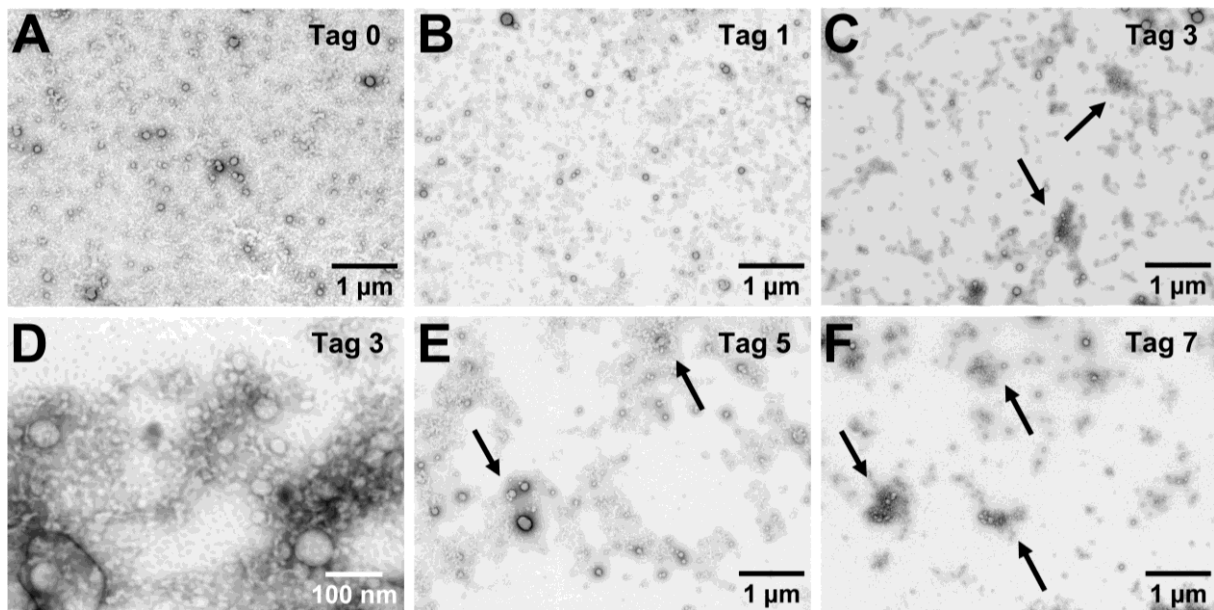


Abbildung 22. Übersicht der STEM-Mikrographien der Langzeitmessung von α -helikalem HLHP4 bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) und einer Lagerung bei 4 °C. Die Aufnahmen zeigen die Probe nach Präparation (A), nach 1 Tag (B), 3 Tagen (C, D), 5 Tagen (E) und 7 Tagen (F). D Nahaufnahme der Partikelaggregation nach 3 Tagen. Einige Aggregate sind beispielhaft mit Pfeilen markiert.

Für die Proben bei Raumtemperatur zeigte sich die Aggregation eindeutig in den STEM-Mikrographien. Abbildung 23 zeigt die Beobachtungen für die Probe bei pH 3. Nach einem Tag war die Aggregation der Probe klar zu erkennen. Dabei gruppierten sich die Partikel in einem Ausmaß wie es bei den vorherigen Messungen nicht beobachtet werden konnte. Die Aggregation nahm dann nach drei und fünf Tagen scheinbar ab, da sich die gebildeten Aggregate aus der Lösung ausfielen (s. oben). Anschließend nahm nach sieben Tagen auch die Aggregation in Lösung zu.

Die Aufnahmen in Abbildung 24 bestätigten erneut die erhöhte Instabilität der Assemblate in neutralem Milieu. Während keine grundlegenden morphologischen Unterschiede zu der Probe bei pH 3 erkennbar waren, zeigte sich hier ein beschleunigter Aggregationsprozess. Dieser spiegelte sich schon zuvor in den DLS-Messungen wider. Nach drei Tagen war die Probe bereits vollständig aggregiert. Interessant war hier eine Nahaufnahme nach drei Tagen (Abbildung 24D). Dieses Bild verdeutlicht die starke Tendenz der Partikel zur Clusterbildung. Es ließ sich dennoch keine Fusion der Partikel beobachten. Die höhere Instabilität der

Assemble führte zur nahezu vollständigen Präzipitation der Peptide innerhalb des Messzeitraums (Abbildung 24F).

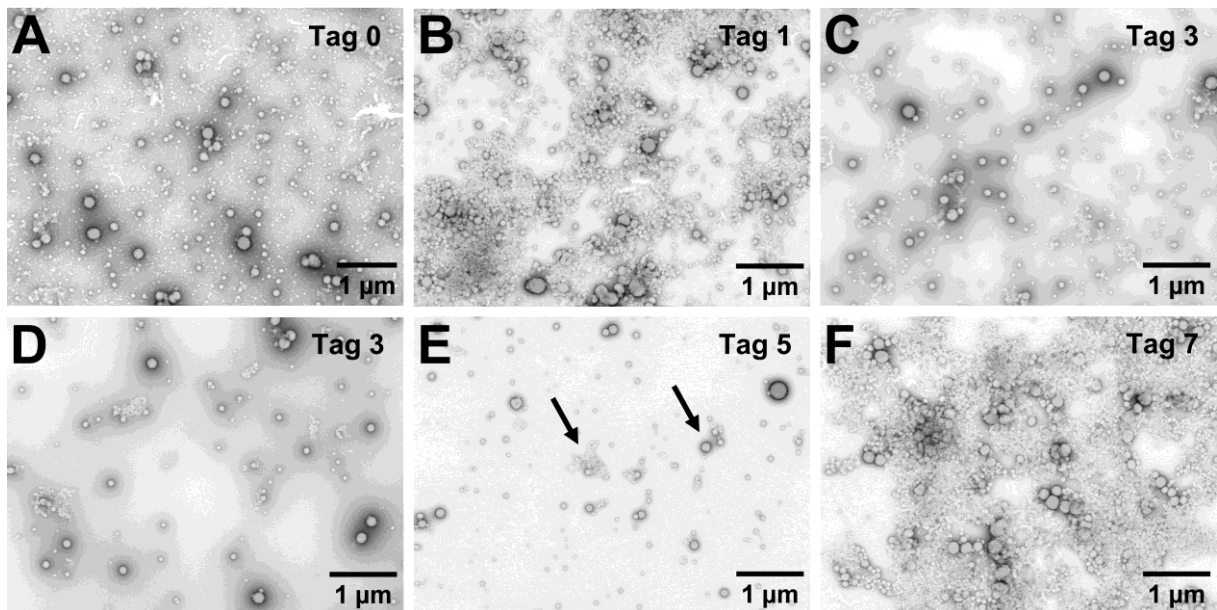


Abbildung 23. Übersicht der STEM-Mikrographien der Langzeitmessung von α -helikalem **HLHP4** bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und einer Lagerung bei Raumtemperatur. Die Aufnahmen zeigen die Probe nach Präparation (**A**), nach 1 Tag (**B**), 3 Tagen (**C**, **D**), 5 Tagen (**E**) und 7 Tagen (**F**). **D** weitere Aufnahme der Probe nach 3 Tagen. Einige Aggregate sind beispielhaft mit Pfeilen markiert. An Tag 1 und Tag 7 sind nur Aggregate zu erkennen.

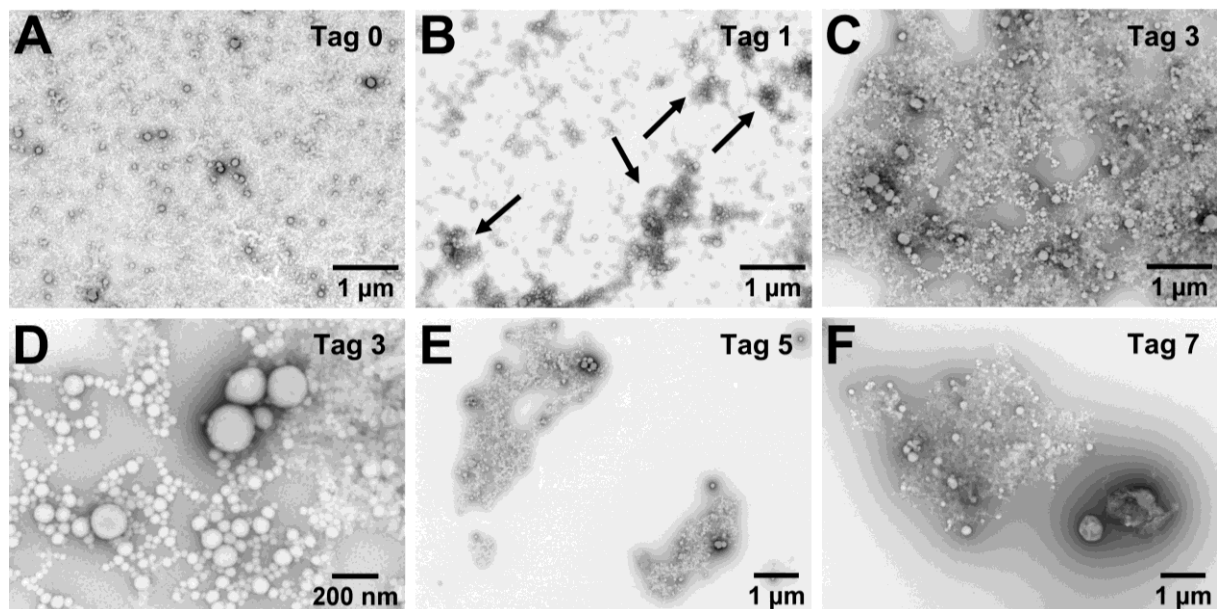


Abbildung 24. Übersicht der STEM-Mikrographien der Langzeitmessung von α -helikalem **HLHP4** bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) und einer Lagerung bei Raumtemperatur. Die Aufnahmen zeigen die Probe nach Präparation (**A**), nach 1 Tag (**B**), 3 Tagen (**C**, **D**), 5 Tagen (**E**) und 7 Tagen (**F**). **C** Illustration der Gruppenbildung ohne Fusion der einzelnen Partikel. Einige Aggregate sind beispielhaft mit Pfeilen markiert. Ab Tag 3 sind nur Aggregate zu erkennen.

4.5.3 Weitere Stabilitätsmessungen

Die bisherigen Ergebnisse zur Partikelstabilität sollten mit weiteren Experimenten validiert werden. Dazu wurde zunächst das Zeta-Potential der Partikel im sauren und neutralen Milieu bestimmt. Die Ladung eines Partikels in einer Suspension wird aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen durch Ionen gegenteiliger Ladung kompensiert. Dabei binden Gegenionen im direkten Kontakt stark an den Partikel (Stern-Schicht). Weitere Ionen lagern sich außerhalb der Stern-Schicht diffus an den Partikel an. Die Ausdehnung der diffusen Schicht hängt dabei von der Stärke des elektrostatischen Feldes des Teilchens ab und erstreckt sich im Allgemeinen bis einige Nanometer von der Partikeloberfläche. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes bewegen sich die Partikel zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Dabei bewegen sich einige Ionen innerhalb der diffusen Schicht, die noch stark genug gebunden sind, mit dem Partikel mit. Die Schicht, die diese Ionen von der umgebenden Lösung trennt, wird als Abscherschicht bezeichnet. Das Zeta-Potential ζ ist dabei das Potential, das an der Abscherschicht gemessen werden kann und ist damit zunächst eine Messgröße für die Partikelladung, kann aber auch als Maß für die Stabilität einer kolloidalen Lösung herangezogen werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass ein Zeta-Potential von über ± 30 mV auf eine stabile Suspension hindeutet. Das Zeta-Potential kann unter anderem indirekt über Lichtstreuung bestimmt werden. Dazu wird der Laser in einen Probenstrahl und einen Referenzstrahl geteilt. Durch die Lichtstreuung an den Partikeln erfährt der Probenstrahl eine Frequenzverschiebung, die proportional zur Geschwindigkeit der Partikel in Lösung ist. Nach dem Zusammenführen der beiden Strahlen lässt sich aus der Dopplerverschiebung des Probenstrahls die Partikelgeschwindigkeit bestimmen. Diese kann zur Berechnung der elektrophoretischen Mobilität und schließlich zur Berechnung des Zeta-Potentials herangezogen werden.^[167-169]

Ethanol/Wasser-Mischungen setzen aufgrund der verringerten Löslichkeit in der Mischung mikroskopische Gasbläschen frei, die in der Lösung festgehalten werden. Dies führt zu Artefakten bei der Größenmessung und der Bestimmung des Zeta-Potentials. Die Messung von Artefakten sollte durch das Entgasen der Lösungsmittel reduziert werden.^[170] Blindmessungen mit behandelten und unbehandelten Pufferlösungen bestätigten dies. Nach dem Entgasen der Lösungen verringerten sich die Einflüsse des Lösungsmittelgemisches sowohl auf die Größenmessung, wie auch auf den Wert des Zeta-Potentials, auf ein vernachlässigbares Minimum. Für die Größenmessungen reichte dabei ein Entgasen der Lösungsmittel aus, während ein zusätzlicher Entgasungsschritt im Ultraschallbad vor den Messungen des Zeta-Potentials notwendig war, um die Artefakte auf ein Minimum zu reduzieren.

Bei pH 3 wurde ein Zeta-Potential von $\zeta = + 30 (\pm 1)$ mV bestimmt. Im neutralen Milieu wurde ein Wert von $\zeta = + 22 (\pm 1)$ mV gemessen. Diese Ergebnisse bestätigten die erhöhte Stabilität

der Partikel-Suspensionen im sauren pH-Bereich. Im Regelfall ist das Vorzeichen des Zeta-Potentials im Vergleich zur Partikelladung umgekehrt, da sich gegensätzlich geladene Moleküle an den Partikeln anlagern. Da das Potential der angelagerten Moleküle gemessen wird, ergibt sich so ein umgekehrtes Vorzeichen. Allerdings wird das Vorzeichen des Zeta-Potentials durch viele Faktoren beeinflusst.^[167, 168] In diesem Fall waren die Vorzeichen nicht vertauscht. Einflüsse auf das Zeta-Potential durch Adhäsion verschiedenster Moleküle wurden bereits in der Vergangenheit untersucht.^[171-174] Zusätzlich zeigen Studien, dass Alkohole einen Einfluss auf die Eigenschaften von Membranen haben können und daher zu einer Vorzeicheninversion beitragen könnten.^[175] Da die Peptidpartikel aus einer ethanolischen Lösung präpariert wurden, wäre ein Einfluss des Alkohols zu erwarten. In einer weiteren Messung wurden die Partikel mit *n*-Butanol statt Ethanol bei pH 3 präpariert. Das Zeta-Potential der Partikel sank dadurch in etwa um die Hälfte auf $\zeta = + 14 (\pm 2)$ mV. Dieser Test bestätigte den Einfluss von Alkoholen auf den Wert des Zeta-Potentials.

Die Stabilität der Peptidpartikel wurde zudem über CD-Spektroskopie verfolgt, um Änderungen der Sekundärstruktur bei fortschreitender Aggregation der Partikel zu untersuchen. Abbildung 25 vergleicht unter allen vier Bedingungen die CD-Spektren zu Beginn der Langzeitmessung mit denen am Ende der Messzeit.

Während bei allen vier Proben zu Beginn die α -helikale Sekundärstruktur deutlich zu erkennen war, zeigte sich für Proben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, nach einer Woche ein Verlust der α -helikalen Struktur unabhängig vom pH-Wert. Dies äußerte sich in der Abschwächung der Intensität des helikalen Signals durch Aggregation und eine Verschiebung der Extrempunkte zu höheren Wellenlängen. Vor allem die Abschwächung des Signals bei 208 nm deutete aber auf einen erhöhten Anteil an β -Faltblatt-Sekundärstruktur hin. Erneut war die Stabilität bei pH 7 geringer als bei pH 3. Für die Lagerung bei 4 °C waren die Änderungen weniger deutlich. Die Intensität des α -helikalen Signals war in beiden Fällen lediglich durch Aggregation leicht verringert.

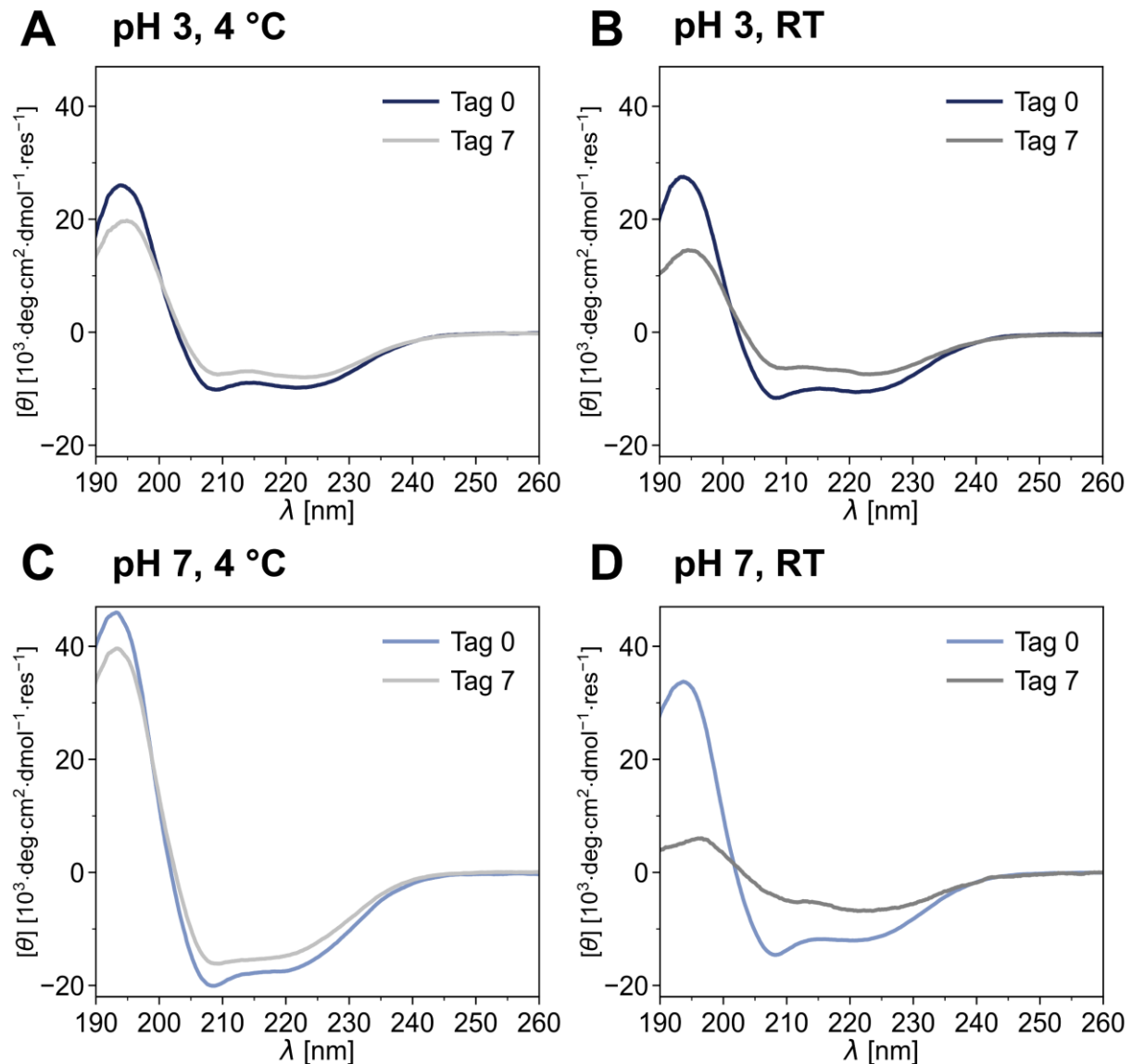


Abbildung 25. CD-Spektren der Peptidpartikel von α -helikalem HLHP4 bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) direkt nach der Präparation (Tag 0) und nach einer Woche bei Lagerung unter verschiedenen Bedingungen. **A** Messung bei pH 3 und anschließende Lagerung bei 4 °C. **B** Messung bei pH 3 und anschließende Lagerung bei Raumtemperatur. **C** Messung bei pH 7 und anschließende Lagerung bei 4 °C. **D** Messung bei pH 7 und anschließende Lagerung bei Raumtemperatur.

4.5.4 Gezielte Umwandlung der Sekundärstruktur

Da die Ergebnisse der Langzeit CD-Messung auf eine Labilität der Sekundärstruktur hindeuteten, wurde untersucht, ob sich auch eine gezielte und vollständige Umwandlung von α -helikaler zur β -Faltblatt-Sekundärstruktur ermöglichen ließ. Dazu wurden CD-Spektren in einem Temperaturbereich von 0 °C bis 80 °C bei einer Heizrate von 1 °C/min aufgenommen. Bei beiden pH-Werten ließ sich bei etwa 50 °C eine irreversible Umwandlung der Sekundärstruktur von α -Helix zu β -Faltblatt feststellen, die sich auch in einem zweiten Versuch reproduzieren ließ (Abbildung 26).

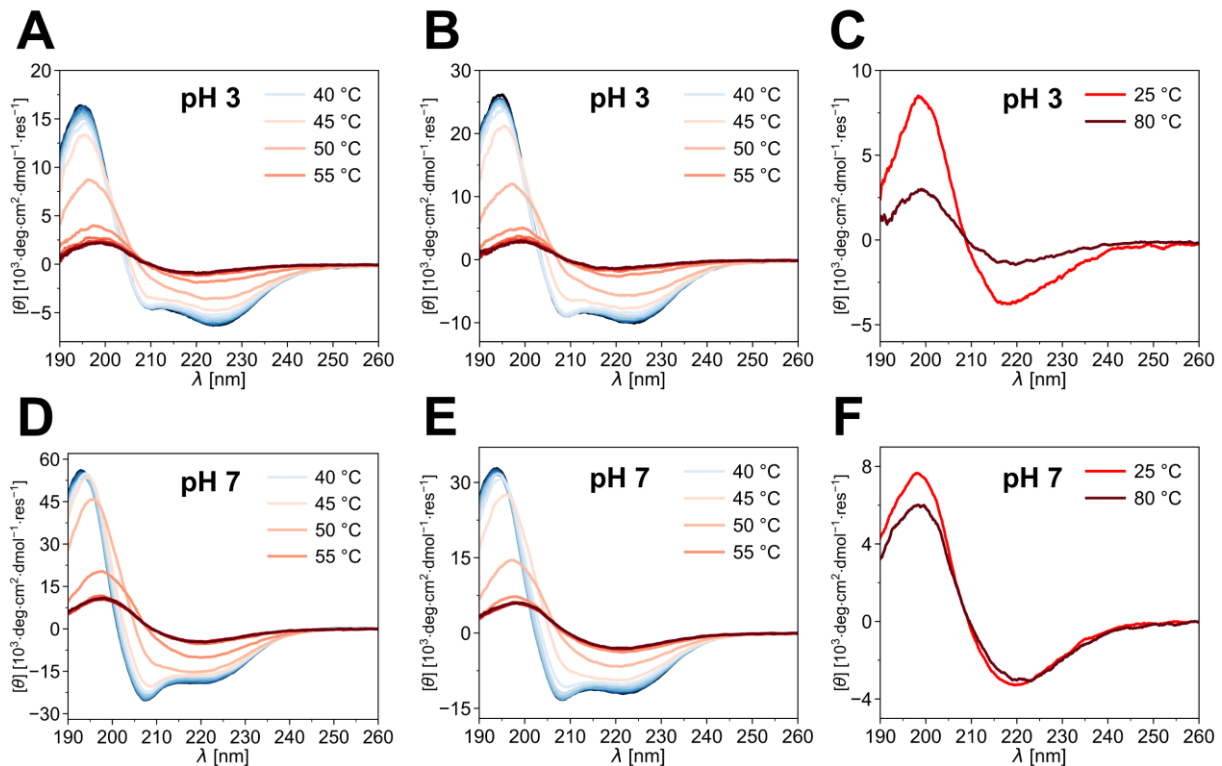


Abbildung 26. A-B CD-Umwandlungsspektren von α -helikalem HLHP4 bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) für einen Temperaturanstieg von 0 °C bis 80 °C in Schritten von 1 °C/min. Die ausgewiesenen Spektren zeigen den Bereich der signifikanten Änderung der Sekundärstruktur. C CD-Spektren von HLHP4 bei pH 3 nach Erhitzen auf 80 °C (dunkelrot) und anschließender Kühlung auf Raumtemperatur (rot) zeigen die Irreversibilität des Prozesses. D-E CD-Umwandlungsspektren von α -helikalem HLHP4 bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) nach dem identischen Protokoll. Die ausgewiesenen Spektren zeigen den Bereich der signifikanten Änderung der Sekundärstruktur. F Bestätigung der Irreversibilität des Vorgangs bei pH 7 durch CD-Spektren nach Erhitzen auf 80 °C (dunkelrot) und anschließender Kühlung auf Raumtemperatur (rot).

Die Umwandlung war auch optisch durch Präzipitation des Peptids sichtbar. Die Aggregate wurden mit STEM untersucht und zeigten erneut keine pH-spezifische Morphologie (Abbildung 71). Allerdings unterschieden sie sich morphologisch von den Aggregaten der Langzeitmessung. Die Partikel schienen hier eher aufgeplatzt und zu einem dünnen Peptidfilm fusioniert zu sein.

Die Ergebnisse der CD-Experimente legten nahe, dass für dieses Peptid zwei temperaturabhängige Vorzugskonformationen existierten, die sich bedingt ineinander umwandeln ließen. Ein Grund für diese Dualität könnte die Propensität von Leucin zur β -Faltblatt-Bildung sein. Während beispielsweise Alanin beinahe ausschließlich α -helikale Strukturen ausbildet, ist die mittlere Propensität von Leucin zur Bildung von α -helikalen Sekundärstrukturen gegenüber der β -Faltblatt-Sekundärstruktur nur leicht erhöht.^[131, 176] Daher liegt das Peptid unterhalb der Umwandlungstemperatur in der α -helikalen Konformation vor, während nach Zufuhr thermischer Energie die β -Faltblatt-Sekundärstruktur bevorzugt wird. Die anschließende Präzipitation lässt sich vermutlich auf die geringere Stabilität der β -Faltblatt-Partikel zurückführen. Es sollte angemerkt werden, dass die Möglichkeit von Peptiden, ihre Sekundärstruktur von α -Helix zu β -Faltblatt zu ändern, kein unbekanntes Phänomen ist und

auch in der Natur, z.B. im pathologischen Kontext bei der Bildung von Amyloiden beobachtet werden kann.^[139, 177-179]

4.5.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die Experimente zur Untersuchung der Langzeitstabilität der α -helikalen **HLHP4**-Partikel zusammengefasst. Analysen mit DLS und Elektronenmikroskopie zeigten eine höhere Stabilität der Partikel bei pH 3. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich eine Lagerung bei 4 °C positiv auf die Stabilität auswirkte. So konnten im besten Fall Proben über eine Woche im Kühlschrank ohne signifikante Änderungen der Partikelgrößen gelagert werden. Die Stabilitätstrends konnten durch Messung des Zeta-Potentials bestätigt werden.

Durch Messungen der Sekundärstruktur über den Verlauf einer Woche konnte gezeigt werden, dass die Aggregation der Proben bei Raumtemperatur mit einer Erhöhung des β -Faltblatt-Anteils einherging. Eine gezielte Erhöhung der Temperatur auf über 50 °C führte anschließend zu einer Umwandlung der ursprünglich α -helikalen Sekundärstruktur zu einer β -Faltblatt-Sekundärstruktur. Allerdings war diese Umwandlung nicht reversibel.

4.6 Charakterisierung der β -Faltblatt-Konformere

4.6.1 Präparation der Konformere

Im Anschluss an die temperaturinduzierte irreversible Umwandlung der Sekundärstruktur stellte sich die Frage nach der Darstellung der β -Faltblatt-Konformere von **HLHP4** ohne Präzipitation der Peptidassemblate aus der Lösung und die Möglichkeiten der Selbstassemblierung in diskrete Nanostrukturen. Da die nachträgliche Umwandlung des α -helikalen Konformers keine geeignete Methode darstellte, wurde nach Möglichkeiten gesucht, die gewünschte Konformation direkt bei der Präparation zu erhalten.

Aus den Experimenten zur Umwandlung der Sekundärstruktur der Peptidpartikel war bekannt, dass Hitze die β -Faltblatt-Bildung unterstütze. Daher wurden Partikelpräparationen unter erhöhter Temperatur durchgeführt. Es wurde schließlich eine geeignete Methode zur Präparation von β -Faltblatt-Partikeln von **HLHP4** gefunden, indem der Peptidfilm zunächst in 80 °C heißem Wasser angelöst, dann mit 10 x konzentriertem Puffer versetzt und die Monomere schließlich durch Ultraschall zur Selbstassemblierung gebracht wurden (Protokoll B). Die optimale Ultraschalldauer wurde bei etwa 35 Minuten erreicht. Geringere Ultraschallzeiten wirkten sich negativ auf die Stabilität der Partikel aus. Bei längerer Behandlung trat eine Aggregation der Partikel noch während des Ultraschallprozesses auf. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von **HLHP4** waren die Ausbeuten dieser Präparationsmethode deutlich geringer als zuvor. Die Wasserlöslichkeit des Peptids war durch die Aminosäuresequenz limitiert und konnte folglich nicht erhöht werden. Zusätze jeglicher organischer Lösungsmittel führten zwangsläufig zur Bildung des α -helikalen Konformers. Versuche, die gelöste Stoffmenge an Peptid anderweitig zu erhöhen, scheiterten ebenfalls. Einige Beispiele sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3. Übersicht der verschiedenen Ansätze zur Erhöhung der gelösten Peptidmenge bei Präparation der β -Faltblatt-Partikel von **HLHP4**.

Nr.	Lösungsansatz	Auswirkungen
1	Film bei der Zugabe von Wasser mit der Pipettenspitze ankratzen	Keine Erhöhung der Konzentration. Eher Bildung von unlöslichen Aggregaten.
2	Zusatz von Glasperlen (\varnothing 2 mm)	Keine Erhöhung der Konzentration. Eher Abrieb von unlöslichen Filmplättchen.
3	Längere Inkubation des Films mit Puffer (1 h)	Kein Einfluss
4	Erneute Zugabe von Puffer auf den Film	Zweite Lösung enthält kaum Peptid.
5	Erneute Inkubation über Nacht bei 40 °C	Zweite Lösung enthält kaum Peptid.

6	Zugabe von heißem Wasser und Puffer auf Film bei 50 °C	Fimlplättchen spalten sich ab. Lösung hat keine erhöhte Konzentration.
7	Zusatz von Tensiden	Kein Einfluss
8	Zentrifugation	Partikel lassen sich nicht abzentrifugieren.
9	Spin Concentrator	Partikel werden durch Scherkräfte an der Membran zerstört.

Trotz der geringeren Peptidkonzentration ließen sich auch die β -Faltblatt-Partikel mit DLS, CD-Spektroskopie, STEM und RKM charakterisieren.

4.6.2 Charakterisierung der β -Faltblatt-Partikel von **HLHP4**

Die Charakterisierung der β -Faltblatt-Peptidpartikel wurde auch hier im sauren sowie neutralen Milieu durchgeführt. Im Unterschied zum α -helikalen Konformer trat in diesem Fall das Problem der Peptidpräzipitation bei pH 7 nicht mehr auf, wenn die Präparation aus Citratpuffer erfolgte. Daher konnte in beiden Fällen 10 mM Citratpuffer verwendet werden.

Zum Nachweis der Partikelbildung wurden zunächst DLS-Messungen durchgeführt. Es wurde in beiden Fällen eine monomodale Größenverteilung erhalten (Abbildung 27A). Die Mittelwerte der hydrodynamischen Durchmesser waren mit 113 nm und 114 nm bei beiden pH-Werten nahezu identisch. Die Verteilung war bei pH 3 allerdings deutlich breiter. Die Korrektur nach Partikelanzahl verschob die Durchschnittswerte zu deutlich kleineren Größen (Abbildung 27B). Vergleichbar zu der α -helikalen **HLHP4**-Variante waren auch hier die meisten Partikel deutlich kleiner als 100 nm. Im Speziellen waren die Partikel bei pH 3 kleiner als bei pH 7. Aufgrund geringer Größenschwankungen innerhalb verschiedener Filme ließ sich aber erneut nicht von einer klaren Signifikanz sprechen.

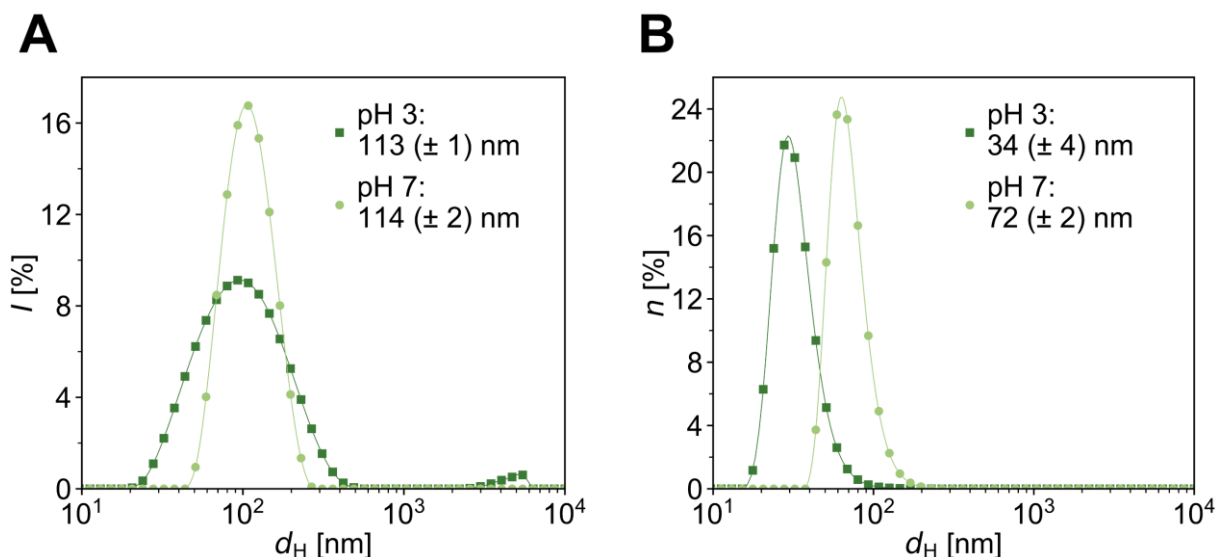


Abbildung 27. A Größenverteilungen nach Intensität repräsentativer DLS-Messungen der β -Faltblatt-Partikel von **HLHP4** bei pH 3 (dunkelgrün, 10 mM Citratpuffer) und pH 7 (hellgrün, 10 mM Citratpuffer) direkt nach der Präparation. **B** Darstellung der gleichen Messung als Größenverteilung nach Anzahl n . Alle gezeigten Werte sind Mittelwerte einer Triplettmessung.

CD-Spektroskopie wurde durchgeführt, um die β -Faltblatt-Sekundärstruktur der Monomere zu bestätigen. Aufgrund der geringen Peptidkonzentration von $< 15 \mu\text{M}$, musste auf Küvetten mit größerer Weglänge (5 mm statt 1 mm) zurückgegriffen werden. Dazu mussten die Pufferkonzentrationen auf 5 mM reduziert werden, um ein frühzeitiges Überladen des Detektors zu vermeiden. Durch die längere Weglänge der Küvette wurde aber der Einfluss der Lichtstreuung deutlich erhöht, sodass die Daten nur mit einem erheblichen Anteil an Rauschen erhalten werden konnten (Abbildung 28).

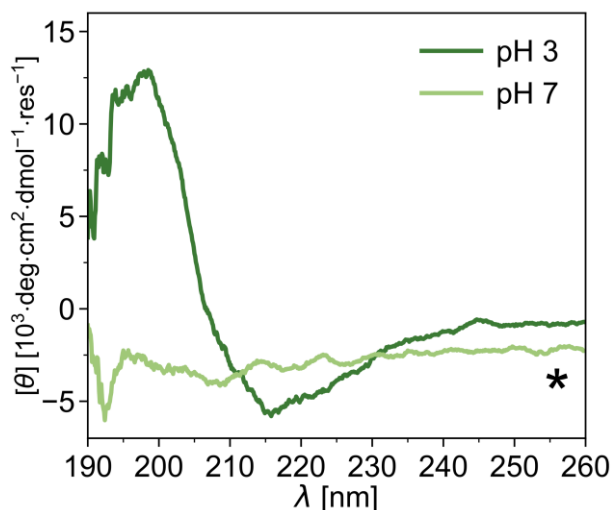


Abbildung 28. CD-Spektren von β -Faltblatt **HLHP4**-Partikeln nach Präparation bei pH 3 (dunkelgrün, 5 mM Citratpuffer) und pH 7 (hellgrün, 5 mM Citratpuffer). Beide Spektren konnten nur mit erheblichem Rauschen aufgenommen werden. * Das Spektrum bei pH 7 ist stark verrauscht, sodass sich keine klare Sekundärstruktur erkennen lässt.

So ließ sich lediglich bei pH 3 eine β -Faltblatt-Sekundärstruktur nachweisen. Diese zeichnet sich durch ein Minimum bei 218 nm und ein Maximum bei 195 nm aus.^[147-149] Durch das starke Rauschen bei der Messung waren die Banden in diesem Fall leicht verschoben. Der Kurvenverlauf bei pH 7 war durch noch stärkeres Rauschen als bei pH 3 geprägt und ermöglichte daher keine Zuordnung zu einer bestimmten Sekundärstruktur. Eine Verringerung der Pufferkonzentration auf 1 mM ergab einen identischen Kurvenverlauf. Alternative Methoden zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptiden umfassen Analysen mit Infrarotspektroskopie oder Kernspinresonanz (NMR). Für die Infrarotspektroskopie sind aber meist Peptidkonzentrationen weit über den erreichbaren Löslichkeitslimits für dieses Peptid von Nöten (normalerweise im Bereich mg/mL). NMR-Spektroskopie an Peptiden ist aufgrund der Vielzahl an Signalen nicht trivial.^[180]

Bei der Analyse der Partikelmorphologie mit STEM konnten mehrere Beobachtungen getroffen werden. Zum einen war die Anzahl der Partikel auf dem Substrat entsprechend der geringeren Peptidkonzentration deutlich niedriger als bei der α -helikalen Variante (Abbildung 29A,C). Die vorhandenen Partikel waren aber im sauren Milieu in ihrem Durchmesser größtenteils in dem von den DLS-Messungen andeuteten Größenbereich von unter 100 nm. Bei pH 7 schienen die Partikel etwas größer zu sein. Besonders interessant war hier allerdings die Beobachtung von Partikelfusion (Abbildung 29C, markiert). Dieses Verhalten stand diametral dem nicht-fusionierenden Charakter der α -helikalen Partikel gegenüber und deutete auf deutlich dynamischere Assemblate hin. Durch die instantan einsetzende Fusion ließe sich die Vergrößerung der Partikel im Vergleich zur DLS-Messung erklären.

Die Partikelmorphologien unterschieden sich in beiden Fällen deutlich von denen der α -helikalen Konformere. Da sich Unterschiede in der Sekundärstruktur auf die Packung der Monomere auswirken könnten, ließ sich ein Zusammenhang zwischen Sekundärstruktur und Partikelmorphologie erwarten. Interessant war jedoch zu beobachten, dass sich diese Unterschiede auch optisch deutlich ausdrückten.

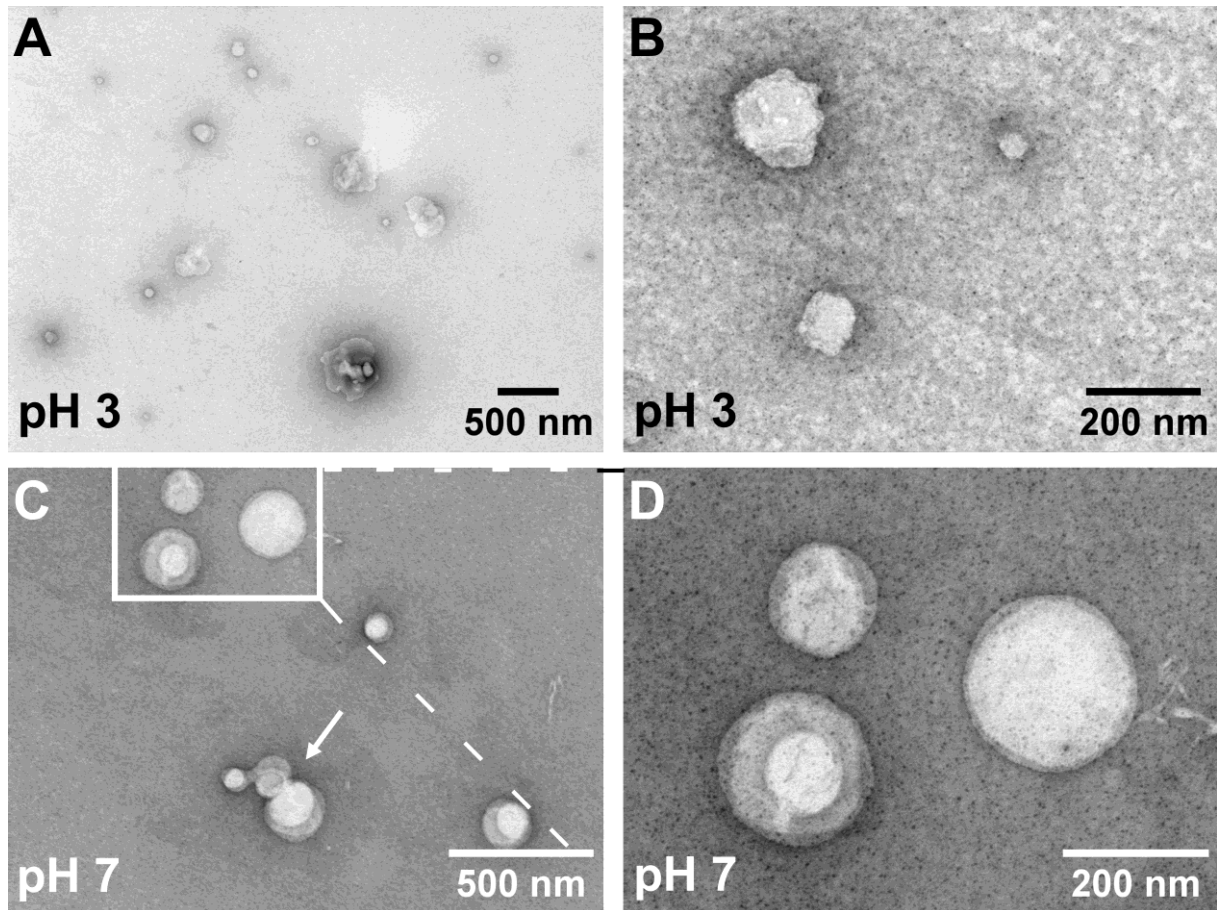


Abbildung 29. **A** STEM Übersichtsaufnahme von β -Faltblatt **HLHP4**-Partikeln direkt nach der Präparation bei pH 3 (10 mM Citratpuffer). **B** Detailaufnahme der Partikel bei pH 3. **C** Übersichtsbild der β -Faltblatt **HLHP4**-Partikel direkt nach der Präparation bei pH 7 (10 mM Citratpuffer). Im unteren Bereich des Bildes ist eine Partikelfusion zu erkennen (markiert). **D** Detailaufnahme der Dreiergruppe aus der Übersichtsaufnahme.

Außerdem unterschieden sich die β -Faltblatt-Partikel morphologisch zwischen pH 3 und pH 7. Während beim ersteren die Partikel unregelmäßige Formen aufwiesen (Abbildung 29B), waren die Partikel im neutralen Milieu rund und ließen eine Schichtstruktur erkennen (Abbildung 29D). Aufgrund der vorherigen Beobachtungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen Sekundärstruktur und Partikelmorphologie, ließe sich nun ein Unterschied in der Sekundärstruktur zwischen pH 3 und pH 7 erwarten. Durch die oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Sekundärstruktur im neutralen Milieu, konnte diese Annahme allerdings nicht bestätigt werden.

Die dreidimensionalen Strukturen der β -Faltblatt-Assemblate wurden mit RKM untersucht (Abbildung 30).

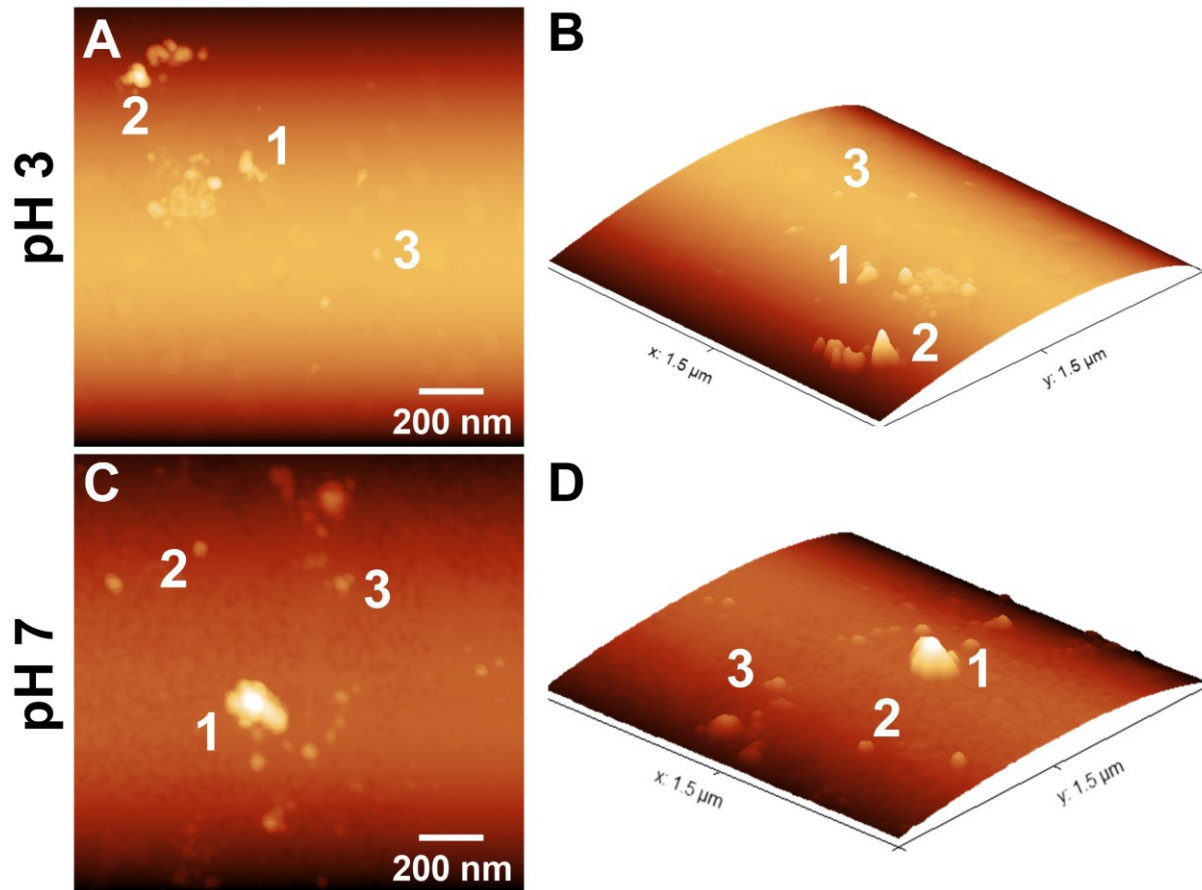


Abbildung 30. **A** Zweidimensionale RKM-Aufnahme ($1,5 \times 1,5 \mu\text{m}$) der Partikel von **HLHP4** vom β -Faltblatt-Typ bei pH 3 (10 mM Citratpuffer) direkt nach Präparation und Lagerung im Vakuum über Nacht. Die Zahlen markieren die Partikel, deren Höhenprofile ausgewertet wurden. **B** Dreidimensionale Darstellung der gleichen Aufnahme. **C** Zweidimensionale RKM-Aufnahme ($1,5 \times 1,5 \mu\text{m}$) der Partikel von **HLHP4** vom β -Faltblatt-Typ bei pH 7 (10 mM Citratpuffer) direkt nach Präparation und Lagerung im Vakuum über Nacht. Die Zahlen markieren die Partikel, deren Höhenprofile ausgewertet wurden. **D** Dreidimensionale Darstellung der gleichen Aufnahme. Alle Aufnahmen wurden im intermittierenden Modus (*tapping mode*) aufgenommen. Übersichtsaufnahmen der Dimension $5 \times 5 \mu\text{m}$ sind in Abbildung 72 gezeigt.

Wie in den STEM-Mikrographien zeigte sich bei beiden Proben ein breites Spektrum an Größen. Neben Partikeln mit Größen unter 100 nm, wie sie bei der DLS bestimmt wurden, konnten in beiden Fällen auch größere Partikel beobachtet werden. Im RKM zeigten sich weder Unterschiede zwischen den Proben bei pH 3 und pH 7, noch konnte eine Partikelfusion bei pH 7 nachvollzogen werden. Ursache dafür war vermutlich die geringere laterale Auflösung der RKM-Aufnahmen im Vergleich zur Elektronenmikroskopie.

Wie bei der α -helikalen Variante zeigten die RKM-Höhenprofile ähnliche Verläufe in x- und y-Richtung was die runde Form der Partikel bestätigte (Abbildung 31).

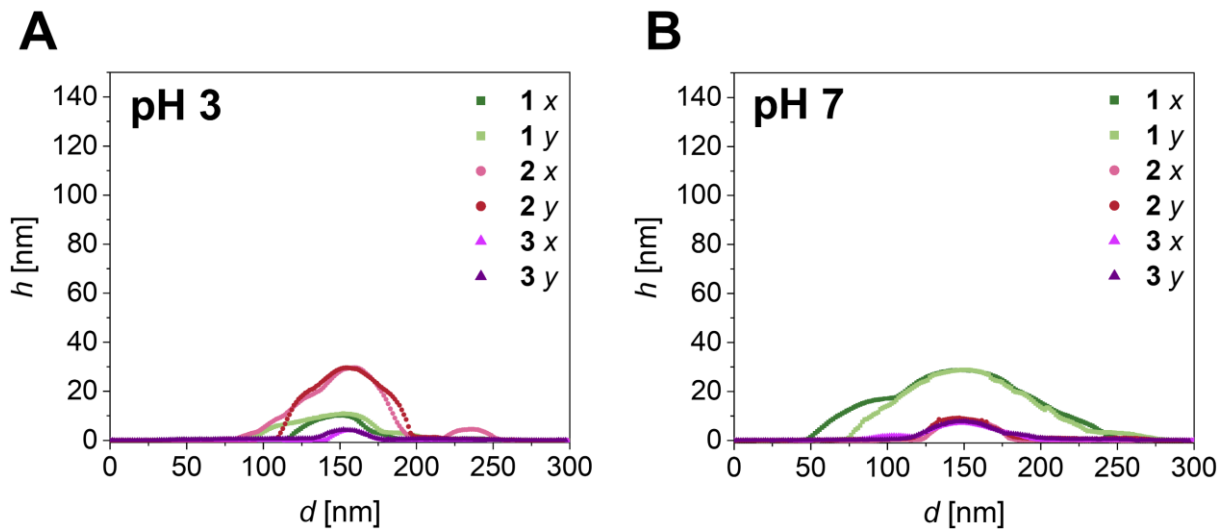


Abbildung 31. **A** Höhenprofile der Partikel 1 (dunkelgrüne Quadrate), Partikel 2 (rote Kreise) und Partikel 3 (violette Dreiecke) in x- und y- Richtung aus der RKM-Aufnahme bei pH 3 in Abbildung 30. **B** Höhenprofile der Partikel 1-3 bei pH 7 (gleiche farbliche Markierung) aus der RKM-Aufnahme in Abbildung 30.

Es konnte bei beiden pH-Werten gezeigt werden, dass die Partikel im Vergleich zu den α -helikalen Assemblaten deutlich flacher waren. Während zuvor bei einem Partikeldurchmesser von etwa 50 nm eine Höhe von ≥ 20 nm beobachtet wurde, waren die Partikel in diesem Fall bei einem ähnlichen Durchmesser nur etwa 10 nm hoch. Obwohl auch in diesem Fall eine Beeinflussung der Partikelhöhe durch Trocknung und Messung nicht ausgeschlossen werden kann,^[163, 166] ist hier doch eine andere Erklärung naheliegend. Da die gemessenen Höhen einer Länge von etwa 2 Monomeren übereinander entsprechen, deuteten die Ergebnisse in diesem Fall auf die Bildung von Bicellen hin.^[6, 60] Damit bliebe in diesen Partikeln kein Hohlraum für eine mögliche Einkapsulierung von Gastmolekülen übrig. Entsprechend zeigte sich in den RKM-Mikrographien auch kein Einfallen der Partikel trotz Lagerung unter vermindertem Druck. Flachere Anstiege des Höhenprofils bei pH 7 (z.B. bei Partikel 2) deuteten zudem auf die Schichtstruktur der Partikel hin. Auch diese ließe sich mit dem Bicellen-Modell erklären, wenn man beispielsweise davon ausgeht, dass eine Schicht etwa einer Monomerlage entspricht.

4.6.3 Partikelstabilität der β -Faltblatt-Konformere

Die Partikelstabilität wurde zunächst mit Hilfe der DLS über sieben Tage hinweg bei vier verschiedenen Bedingungen (pH 3 und pH 7, jeweils Lagerung bei 4 °C oder Raumtemperatur) verfolgt (Abbildung 32).

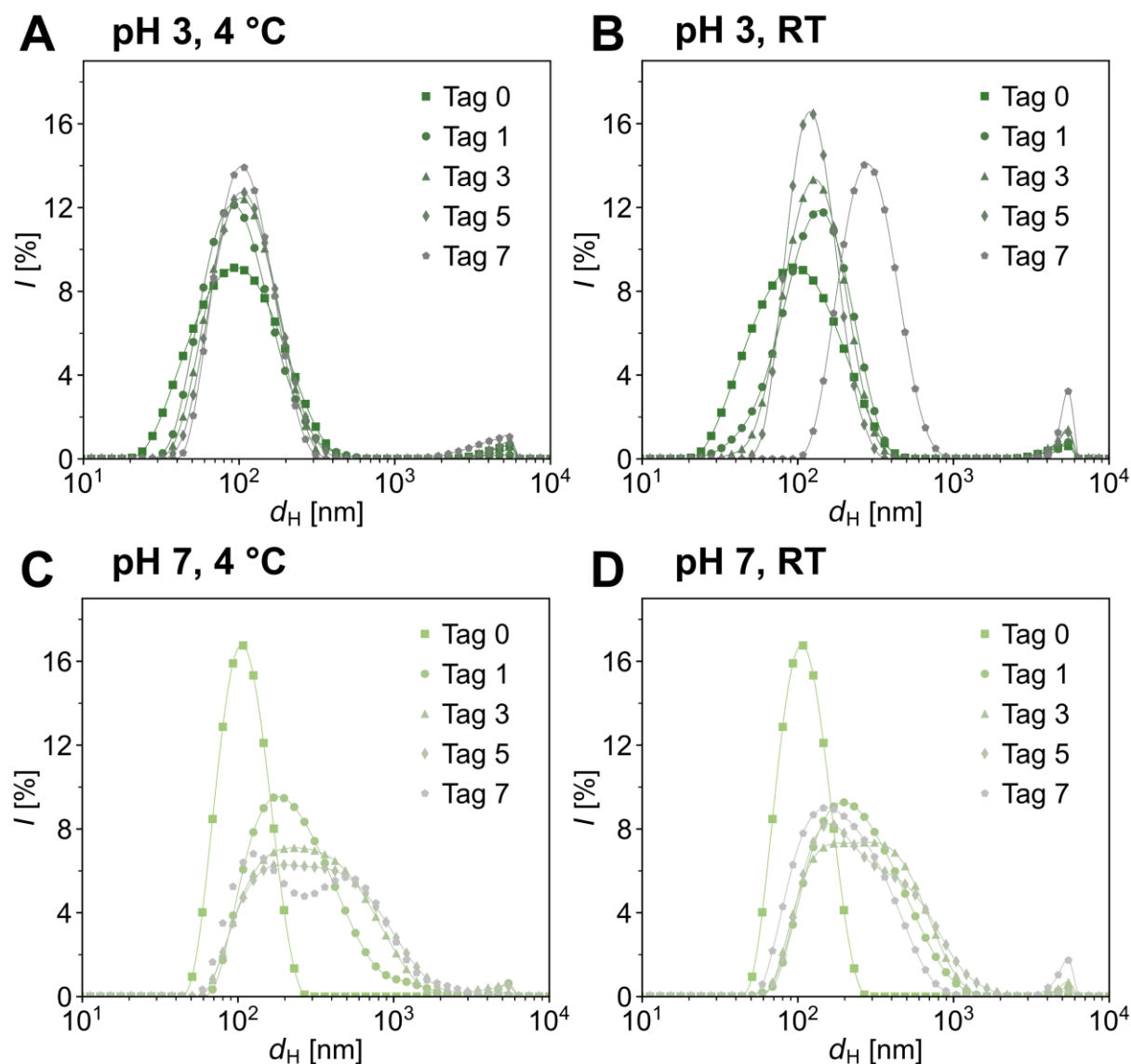


Abbildung 32. DLS-Größenverteilungen nach Intensität für die Langzeitmessung der β -Faltblatt-Partikel von HLHP4 unter verschiedenen Bedingungen. **A** Präparation bei pH 3 (10 mM Citratpuffer) und Lagerung bei 4 °C. **B** Präparation bei pH 3 und Lagerung bei Raumtemperatur. **C** Präparation bei pH 7 (10 mM Citratpuffer) und Lagerung bei 4 °C. **D** Präparation bei pH 7 und Lagerung bei Raumtemperatur. Dargestellt sind die Messungen direkt nach der Präparation (Tag 0), Tag 1, Tag 3, Tag 5 und Tag 7. Der Verlauf der Größenwerte der Hauptspezies ist in Tabelle 24 dargestellt. Alle gezeigten Werte sind Mittelwerte von Triplettmessungen. Eine Übersicht der DLS-Messungen an geraden Tagen, an denen keine STEM-Aufnahmen gemacht wurden, findet sich in Abbildung 73.

Ähnlich wie bei den α -helikalen Varianten waren die Partikel bei pH 3 und einer Lagerung bei 4 °C am stabilsten. In den DLS-Messungen waren keine signifikanten Änderungen der Größenverteilungen zu verzeichnen. Für die korrespondierende Probe bei neutralem pH-Wert stabilisierten sich die Werte nach einer anfänglichen Verschiebung zu größeren Werten,

vermutlich bedingt durch Partikelfusion. Im Gegensatz zu den Partikeln von α -helikalem **HLHP4** waren die Proben des β -Faltblatt-Konformers deutlich stabiler bei Raumtemperatur. Während bei pH 3 die Größenwerte bis zum siebten Tag nahezu konstant blieben und erst am siebten Tag eine sichtbare Aggregation einsetzte, stabilisierten sich die Werte bei pH 7, ähnlich wie bei der 4 °C Probe, nach einer anfänglichen Verschiebung der Größenverteilung zu höheren Werten. Im Allgemeinen schienen die Lagerungsbedingungen bei den β -Faltblatt-Varianten keine großen Auswirkungen auf die Partikelstabilität zu haben. Ursache der besseren Stabilität des β -Faltblatt-Konformers ist vermutlich auf die Packung der Monomere und die Stärke der intermolekularen Wechselwirkungen zurückzuführen. Bei der Diskussion der Partikelstabilitäten des α -helikalen Konformers wurde vermutet, dass die Verwendung verschiedener Puffersubstanzen zu den Unterschieden in den Stabilitäten beitragen könnte. Dabei wurde angemerkt, dass Citrationen durch ihren multidentaten Charakter besser zur Stabilisierung des Systems beitragen könnten als Phosphationen. Zudem war die Pufferkonzentration bei den α -helikalen Konformeren im neutralen Milieu erniedrigt, um ein Ausfallen der Peptide zu verhindern. Entsprechend ließe sich die erhöhte Stabilität der β -Faltblatt-Partikel bei pH 7 im Vergleich zum α -helikalen Konformer mit der Verwendung des 10 mM Citratpuffers, anstatt des 1 mM Phosphatpuffers, begründen. Dadurch würden die Partikel hier bei beiden pH-Werten zusätzlich durch den Puffer stabilisiert werden.

Die Beobachtungen aus den DLS-Messungen konnten durch parallele elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. Bei pH 3 bildeten sich zu Beginn, wie bereits oben beschrieben, irreguläre Partikel (Abbildung 33, Abbildung 34). Diese vergrößerten sich im Laufe der Zeit und bildeten Plättchen-artige Strukturen. Dabei schienen auch mehrere Partikel in einem Plättchen enthalten zu sein (Abbildung 33E). Somit könnte hier auch von einer Partikelfusion gesprochen werden, die allerdings deutlich später auftrat oder möglicherweise weniger offensichtlich war, als bei pH 7. Eine Erklärung hierfür könnte der Protonierungszustand des Puffers sein, der bei pH 7 mehr negative Ladungen aufweist und so die Fusion durch bessere Abschirmung der Partikelladung erleichtert. Schließlich formten sich Aggregate. Dieser Prozess verlief unter beiden Lagerungsbedingungen ähnlich, führte aber bei Raumtemperatur schneller zur Aggregatbildung. Dadurch waren die Aggregate hier am Ende der Messreihe auch größer. Diese Unterschiede spiegelten sich in den DLS-Größenverteilungen durch eine schnellere Änderung der Partikelgrößen bei Raumtemperatur wider.

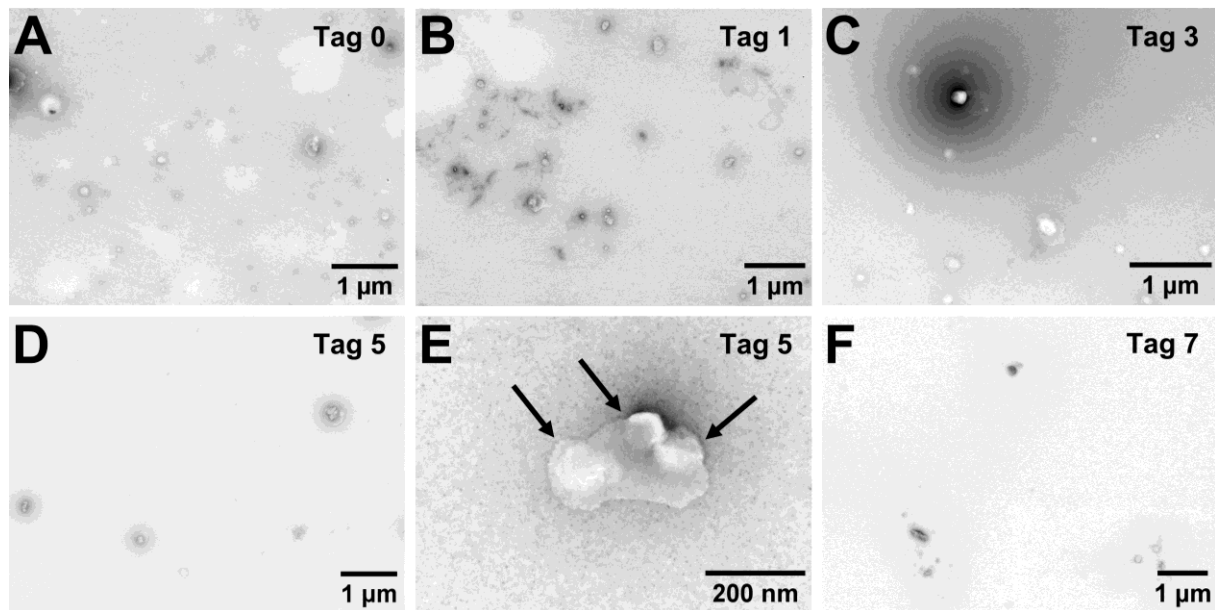


Abbildung 33. Übersicht der STEM-Mikrographien zur Langzeitstabilität von β -Faltblatt **HLHP4** bei pH 3 (10 mM Citratpuffer) und Lagerung bei 4 °C. Die Aufnahmen zeigen die Probe nach 0 Tagen (**A**), 1 Tag (**B**), 3 Tagen (**C**), 5 Tagen (**D, E**) und 7 Tagen (**F**). **E** Bildung der Peptidplättchen nach fünf Tagen. Einzelne Partikel sind mit Pfeilen markiert.

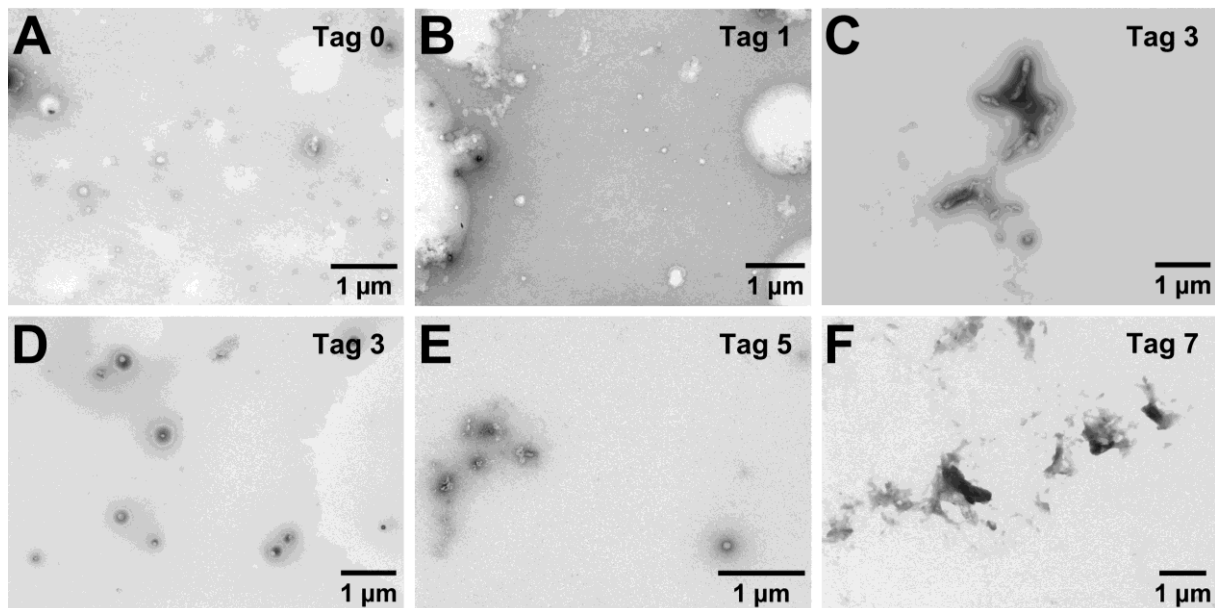


Abbildung 34. Übersicht der STEM-Mikrographien zur Langzeitstabilität von β -Faltblatt **HLHP4** bei pH 3 (10 mM Citratpuffer) und Lagerung bei Raumtemperatur. Die Aufnahmen zeigen die Probe nach 0 Tagen (**A**), 1 Tag (**B**), 3 Tagen (**C, D**), 5 Tagen (**E**) und 7 Tagen (**F**). **D** Sekundäre Spezies nach drei Tagen. Es sind Peptidscheiben zu sehen, in deren Mitte ein Partikel sitzt.

Auch bei pH 7 verliefen die Prozesse bei beiden Lagerungsbedingungen ähnlich (Abbildung 35, Abbildung 36). Die anfängliche Änderung in beiden Größenverteilungen lässt sich durch eine rapide Fusion der Partikel erklären, die bereits nach der Präparation begann. Anschließend bildeten sich im Verlauf der Messperiode immer größere Fusionsobjekte. Bei Raumtemperatur verlief der Prozess schneller, sodass nach fünf Tagen die Peptide teilweise zu mikrometer-großen Schichten fusioniert waren (Abbildung 36D, markiert). Diese Strukturen waren aufgrund ihrer Größe vermutlich außerhalb des Messbereichs des DLS-Geräts.

Interessanterweise verlief die Fusion der sub-Mikrometer Partikel aber bei beiden Proben etwa gleich schnell, sodass sich kaum Unterschiede in den Größenverteilungen zeigten. Die Bildung von Peptidschichten unter allen Bedingungen lässt sich mit dem Bicellen-Modell erklären, da Bicellen leicht in der horizontalen Ebene fusionieren können, wodurch sich großflächige Schichten bilden.^[181, 182]

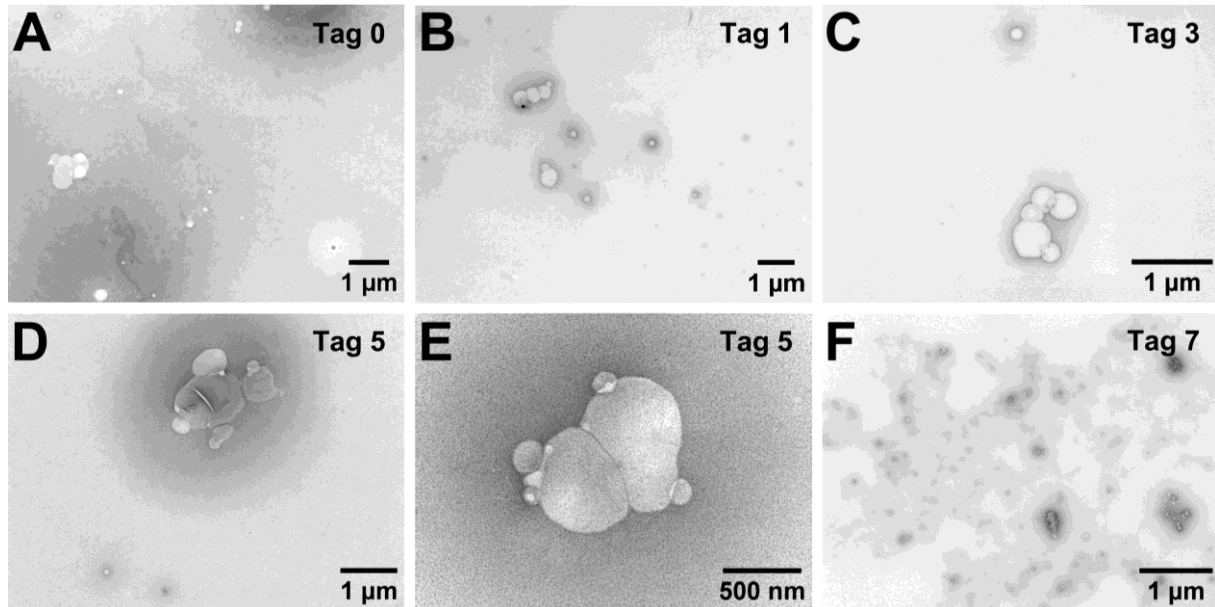


Abbildung 35. Übersicht der STEM-Mikrographien zur Langzeitstabilität von β -Faltblatt **HLHP4** bei pH 7 (10 mM Citratpuffer) und Lagerung bei 4 °C. Die Aufnahmen zeigen die Probe nach 0 Tagen (**A**), 1 Tag (**B**), 3 Tagen (**C**), 5 Tagen (**D,E**) und 7 Tagen (**F**). **E** Detail einer Partikelfusion, an der mehrere individuelle Partikel beteiligt sind.

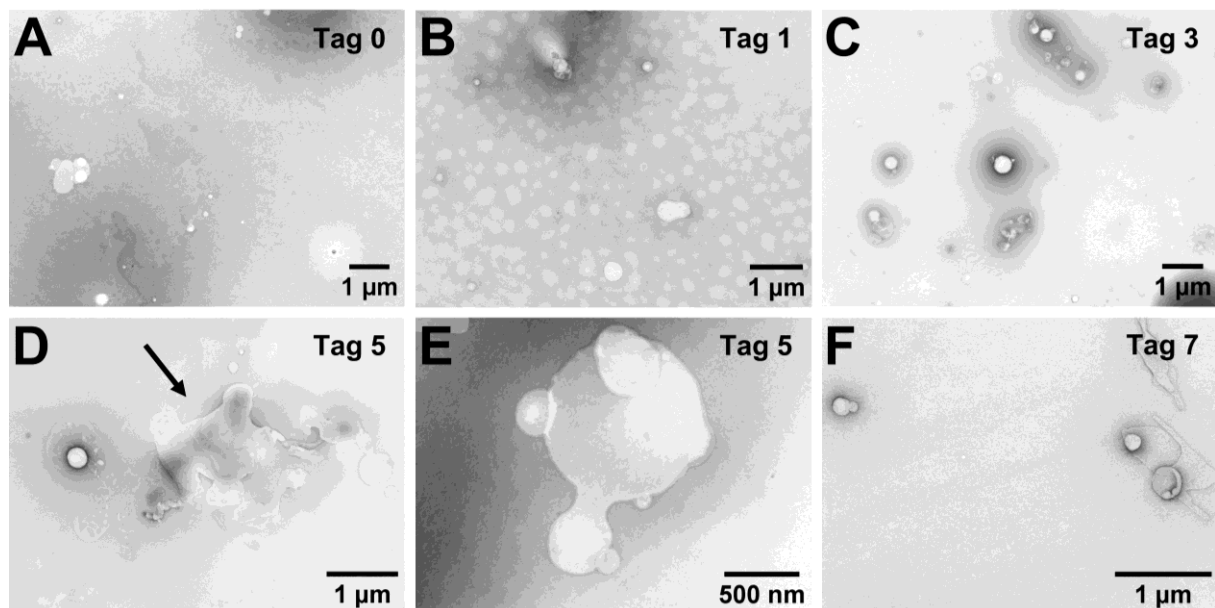


Abbildung 36. Übersicht der STEM-Mikrographien zur Langzeitstabilität von β -Faltblatt **HLHP4** bei pH 7 (10 mM Citratpuffer) und Lagerung bei Raumtemperatur. Die Aufnahmen zeigen die Probe nach 0 Tagen (**A**), 1 Tag (**B**), 3 Tagen (**C**), 5 Tagen (**D,E**, Peptidschicht markiert) und 7 Tagen (**F**). **E** Detail einer Partikelfusion, an der mehrere individuelle Partikel beteiligt sind.

Die Fusionsprozesse der β -Faltblatt-Partikel sind, neben der temperaturinduzierten Umwandlung der Sekundärstruktur der α -helikalen Konformere, mit die interessanteste Beobachtung dieser Arbeit. Dadurch wurde verdeutlicht, dass die gleiche Peptidsequenz unter verschiedenen Präparationsbedingungen komplett verschieden geartete Partikel bilden kann. Während beim α -helikalen Konformer eher rigide, runde und nicht-fusionierende Partikel gebildet wurden, zeigten die β -Faltblatt-Varianten dynamische, formbare, flache Partikel. Damit ähneln letztere eher Lipidmembranen, die zu ähnlichen Fusionsprozessen im Stande sind.^[3]

Zur weiteren Untersuchung der Stabilität wurden die Zeta-Potentiale der Proben bei pH 3 und pH 7 bestimmt. Dabei wurde bei pH 3 ein Zeta-Potential von $\zeta = -2 (\pm 2)$ mV gemessen. Dieses Ergebnis unterstrich die Schwierigkeiten, die bei der Präparation der Proben bei pH 3 aufkamen. Es kam regelmäßig zu starker Aggregation der Proben während der Ultraschallbehandlung, sodass Experimente oft wiederholt werden mussten. Zudem zeigten diese Messungen klar, dass das Zeta-Potential für die Assemblate von **HLHP4** nicht zwingend ein Beweis für deren Langzeitstabilität, sondern eher ein Maß für die Präparierbarkeit der Proben war. Denn trotz eines Zeta-Potentials von nahezu null, wiesen die Partikel bei pH 3 eine sehr gute Langzeitstabilität auf. Ähnlich wurde für pH 7 ein Zeta-Potential von $\zeta = -48 (\pm 5)$ mV bestimmt. Trotz des sehr hohen Zeta-Potentials fusionierten die Partikel mit der Zeit, ließen sich aber von allen Varianten am besten präparieren.

Außerdem trat bei den β -Faltblatt-Konformeren keine Vorzeicheninversion auf. Dies bestätigte die zuvor geäußerte Vermutung, dass Ethanol bei den α -helikalen Varianten die Vorzeicheninversion des Zeta-Potentials begünstigte.

4.6.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden Experimente im Rahmen der Charakterisierung der β -Faltblatt-Partikel von **HLHP4** diskutiert. Dabei wurde zunächst der Weg zu einer erfolgreichen Präparation der Partikel aus den Peptidfilmen besprochen und die Versuche zur Erhöhung der Peptidlöslichkeit dargestellt. Anschließend wurden Experimente zur grundlegenden Charakterisierung der Konformere mit DLS, CD-Spektroskopie, Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie besprochen. Abschließend wurde die Langzeitstabilität der β -Faltblatt-Partikel untersucht und die Ergebnisse mit den Resultaten der Messungen für die α -helikalen Konformere verglichen. Dabei halfen die Messungen an den β -Faltblatt-Varianten einige Vermutungen zu den α -helikalen Partikeln zu bekräftigen. So wurde erneut die Abhängigkeit der Partikelstabilität von den verwendeten Puffersubstanzen aufgezeigt und die Annahme untermauert, dass eine Verwendung von Ethanol bei der Partikelpräparation eine Inversion des Zeta-Potentials unterstützt.

4.7 Wechselwirkungen der Peptidpartikel mit Gast-Molekülen

Aufgrund der vielen Gestaltungsmöglichkeiten im Design, der einfachen Synthese, der großen Anzahl an möglichen Morphologien, der Reaktivität auf externe Stimuli und der hohen Biokompatibilität stellt der Transport medizinisch relevanter Wirkstoffe eines der Hauptanwendungsgebiete lipidmimetischer Peptide dar.^[14, 37, 41, 183] Auch die HLH-Peptide wurden mit dem Ziel der Anwendung in diesem Bereich designt. Daher wurde die Eignung der HLH-Peptide zum Transport von Wirkstoffen anhand von **HLHP4** untersucht. Aufgrund der flachen Struktur und den geringen Ausbeuten bei der Präparation wurden die β -Faltblatt-Konformere als ungeeignet für diese Anwendungen empfunden. Der Fokus wurde daher auf die Untersuchungen der α -helikalen Partikel bei pH 7 gelegt, da in diesem Fall eine hohe Ausbeute an Partikel mit guter Biokompatibilität kombiniert werden konnte.

4.7.1 Wechselwirkung mit Gast-Molekülen

Zunächst wurde untersucht, ob hydrophobe Moleküle in die Peptidpartikel eingelagert werden. Zu diesem Zweck wurde der umgebungssensitive Farbstoff Diphenylhexatrien (DPH) zu der Partikelsuspension gegeben. DPH hat die Eigenschaft, in lipophile Umgebungen zu interkalieren und nur dort zu fluoreszieren, da der Farbstoff durch die Anwesenheit von Wasser stark gequencht wird.^[184, 185] Eine Konzentration von 2 μM DPH in der Gesamtlösung erwies sich in einer kurzen Testreihe mit verschiedenen Konzentrationen als ausreichend für Fluoreszenzmessungen. Untersuchungen der Partikelgröße zeigten nur eine leichte Beeinflussung durch die Anwesenheit des Farbstoffes (Abbildung 74). Nach der Zugabe von DPH wurden die Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das Fluoreszenzspektrum aufgenommen. In Anwesenheit der Peptidpartikel wurden die charakteristischen DPH-Banden bei $\lambda = 405 \text{ nm}$, 428 nm und 454 nm beobachtet.^[184, 185] Referenzmessungen ohne Peptid zeigten keine Fluoreszenz (Abbildung 37A). Somit konnte gezeigt werden, dass DPH in die Partikel interkalierte und die Umgebung hydrophob war. Die DPH-Fluoreszenz konnte außerdem unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Dazu wurde die Probenlösung wie zuvor für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen auf einem Kupfergrid präpariert. Eine Nachkontrastierung mit Uranylacetat war hier nicht notwendig (Abbildung 37B).

Es sei angemerkt, dass bei den Vorversuchen eine Beeinträchtigung der Partikelstabilität in Abhängigkeit von der DPH-Konzentration beobachtet werden konnte. Bei Konzentrationen des Farbstoffs über 5 μM wurde die Partikelstabilität signifikant verschlechtert, was sich in einer schnellen Aggregation der Partikel innerhalb der Inkubationszeit äußerte. Diese Beobachtungen unterstrichen eine Wechselwirkung zwischen DPH und Peptid.

Die Enkapsulierung eines hydrophileren Moleküls wurde durch Zugabe einer 5 μM Lösung von Esculin in Ethanol bei der Probenpräparation untersucht. Bei Esculin handelt es sich im Prinzip

um Glucose, an die ein Coumarinmolekül kovalent gebunden ist. Als potentiellies Arzneimittel zeigt Esculin einige positive pharmakologische Eigenschaften.^[186, 187] Der Farbstoff konnte bei einer Anregungswellenlänge von 385 nm im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Dazu wurde der Farbstoff während der Partikelpräparation teilweise in die Partikel eingeschlossen und die Suspension anschließend auf ein Kupfergrid aufgetragen. Überschüssiger Fluoreszenzfarbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen mit Wasser entfernt. In der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme zeigten sich im Anschluss fluoreszierende Stellen, wie sie auch bei der Interkalation von DPH beobachtet werden konnten und zeigten damit die Fähigkeit der Partikel hydrophilere Moleküle zu enkapsulieren (Abbildung 75).

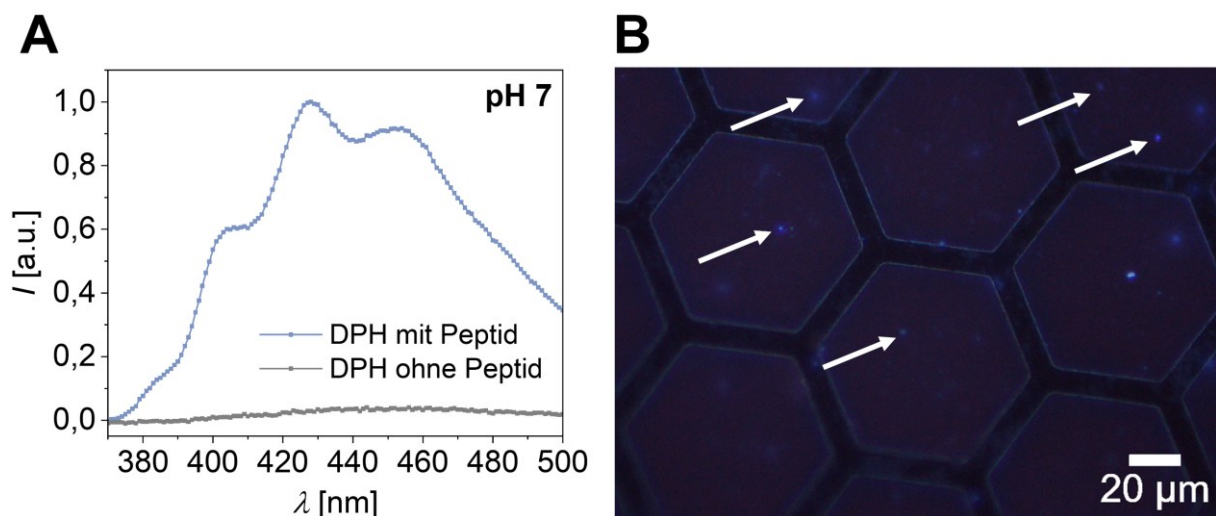


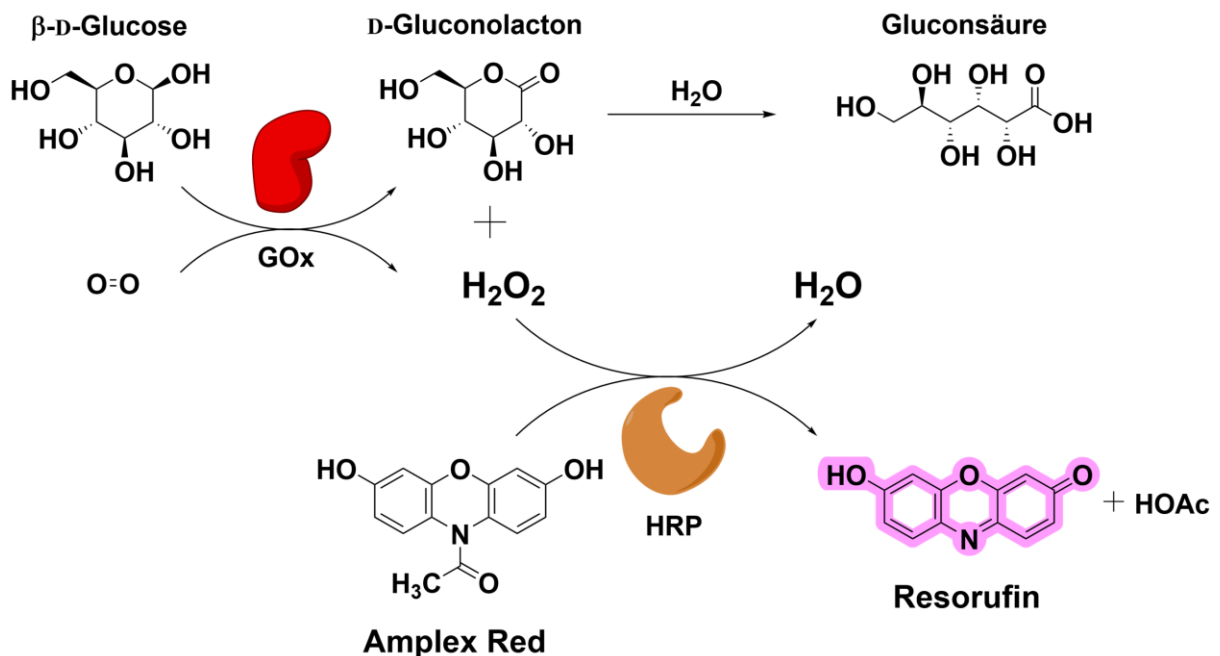
Abbildung 37. **A** Fluoreszenzspektren der Mittelwerte von Duplikatmessungen der DPH-Fluoreszenz mit Peptid (hellblau) und ohne Peptid (hellgrau) bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). **B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der DPH-Fluoreszenz bei Interkalation in die Peptidpartikel bei pH 7. Einige Partikel sind mit Pfeilen markiert (Kontrast angepasst, $\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$, Belichtungszeit 200 ms).

4.7.2 Vorversuche des Amplex® Red Assay

Die Eigenschaft der Partikel, Moleküle zu enkapsulieren wurde zusätzlich über einen Amplex® Red Assay getestet. Die Mehrheit der Vorversuche wurde gemeinsam mit *Dominik Kus, B.Sc.* und *Ana Gherasim* durchgeführt. Dabei war es zunächst die Idee, Glucose in den Partikeln zu enkapsulieren. Diese sollte als Substrat der Glucoseoxidase (GOx) enzymatisch zum Gluconolacton umgesetzt werden (dieses hydrolysiert anschließend nicht-enzymatisch zur Gluconsäure) und das freiwerdende Wasserstoffperoxid wiederum von der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) genutzt werden, um das farblose Amplex® Red zum pink leuchtenden Resorufin zu oxidieren. Die Absorption des Resorufin wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 568 \text{ nm}$ verfolgt (Schema 2).^[188, 189]

Die Enkapsulierung der Glucose erfolgte durch Zugabe einer wässrigen, gepufferten Glucoselösung bei der Assemblierung der Partikel. Überschüssiger Zucker wurde durch Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) oder ähnliche Methoden abgetrennt. Beim Größenausschluss sollten die Partikel aufgrund ihrer hohen

Masse direkt eluiert werden, während die Glucose zurückbleibt und erst später eluiert wird. Daher wurden Säulen mit einem relativ geringem Massenausschlusslimit gewählt. Alternativ wurden auch Ionentauschersäulen getestet, in denen die Partikel aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit der Säule zurückgehalten werden sollten, um damit eine Abtrennung von der ungeladenen Glucose zu erreichen. Aufgrund der Zeta-Potential-Inversion war dabei allerdings unklar, welche Nettoladung die Partikel nach außen zeigen würden. Daher wurden sowohl anionische, wie auch kationische Säulen getestet. Nach der Abtrennung des Glucoseüberschusses wurde nur bei Diffusion der Moleküle durch die Membran eine Umsetzung des Amplex® Red erwartet. Bei erfolgreicher Retention des Zuckers in den Partikeln würde durch eine Zerstörung der Partikel eine instantane Umsetzung des Amplex® Red die erfolgreiche Encapsulierung nachgewiesen.



Schema 2. Reaktionsübersicht des vollständigen Amplex® Red Assays. Zunächst wird β -D-Glucose von der Glucoseoxidase unter Verbrauch von Luftsauerstoff zu D-Gluconolacton und Wasserstoffperoxid oxidiert. Während das Lacton zur Gluconsäure hydrolysiert, kann das Wasserstoffperoxid von der Meerrettichperoxidase (HRP) genutzt werden, um Amplex® Red zu Resorufin umzusetzen. Dabei wird eine Äquivalente Wasser und Essigsäure frei.

Zu diesem Zweck wurden verschiedenste Säulen von **Cytiva** ohne Erfolg getestet (Tabelle 26). In allen Fällen konnten keine signifikanten Mengen an Partikeln isoliert werden, da das Peptid am Säulenmaterial haftete. Dies konnte gezeigt werden, als das Säulenmaterial über Nacht in verdünnter Salzsäure aufgelöst und das Peptid massenspektrometrisch in der salzsauren Lösung nachgewiesen werden konnte. Analysen des Durchflusses mittels DLS blieben im Vergleich dazu immer ergebnislos und zeigten keinerlei Streuintensität (Abbildung 76A). Experimente mit reinen Peptidpartikeln ohne Zusatz des Farbstoffs lieferten identische Ergebnisse.

Im Anschluss wurde versucht, die überschüssige Glucose mit Spin Konzentratoren (**Sartorius Vivaspin® 500 PES**, 5 kDa MWCO) zu entfernen. Dabei sollte die überschüssige Glucose durch die Membran gefiltert werden und die Partikel im Ausgangsvolumen zurückbleiben. Durch mehrfaches Wiederholen der Zentrifugation unter Zugabe frischer Pufferlösung ließ sich die freie Glucose aus der Lösung entfernen. Die restliche Konzentration an Glucose im Überstand konnte über einen quantitativen Amplex® Red Assay bestimmt werden. Nach drei Wiederholungen wurde eine geringe Restkonzentration von etwa 0,41 μM Glucose (bei einer Anfangskonzentration von 9 μM Glucose) im Überstand in Lösung gemessen. Allerdings führte die wiederholte Zentrifugation zur Zerstörung der Partikel. Dies äußerte sich in der Zunahme des *Attenuator*-Wertes bei der DLS-Messung, sowie der Abnahme der Korrelationskurve im Vergleich zu der Messung vor den Zentrifugationsschritten (Abbildung 76B). Zudem zeigten die übrigen Partikel nach der Zentrifugation eine deutlich geringere Stabilität und neigten stark zur Aggregation. Daher wurde diese Abtrennungsmethode ebenfalls verworfen.

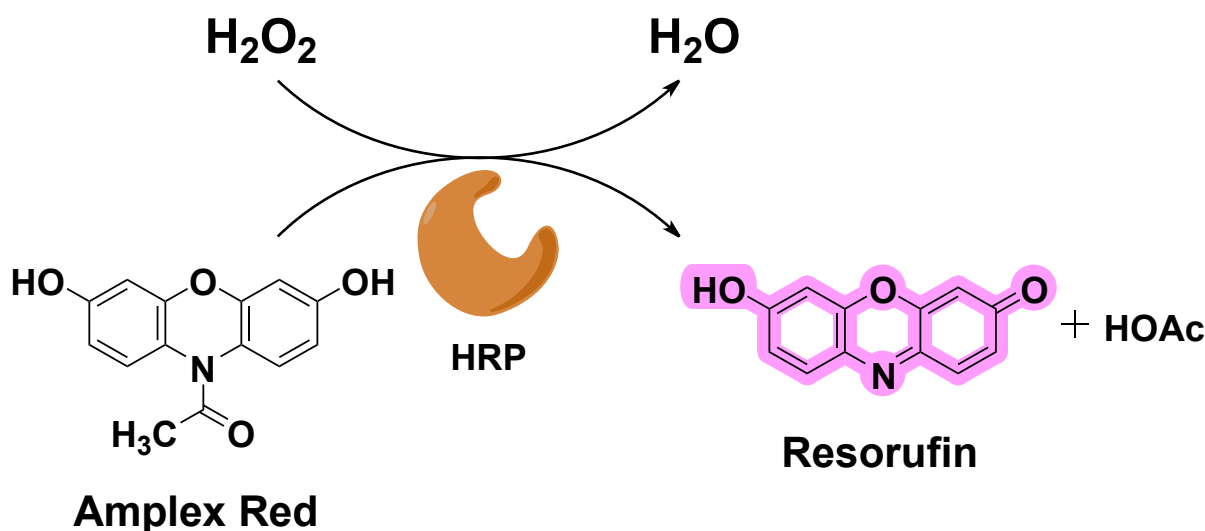
Schließlich wurde der Versuchsaufbau verändert und auf eine Abtrennung des überschüssigen Zuckers verzichtet. Stattdessen wurde die Möglichkeit einer zusätzlichen peptidfreien Referenzmessung erörtert. Bei erfolgreicher Retention der Glucose in den Partikeln sollte dabei der Absorptionwert in der peptidhaltigen Lösung nach kurzer Zeit einen stabilen Endwert unter dem Wert der Referenzlösung erreichen, da in letzterer 100 % der Glucose frei vorläge. Außerdem sollte nachfolgend ein langsamer Anstieg des Absorptionwertes in der peptidhaltigen Lösung auf eine Diffusion der Glucose aus den Partikeln in die Lösung hindeuten. Die Triebkraft für diesen Vorgang wäre ein Konzentrationsgradient über die Membran, der durch die rapide Umsetzung der freien Glucose außerhalb der Partikel entstünde.

Mehrere Vorversuche mit verschiedenen Konzentrationen an Enzymen, Farbstoff und Zucker schienen zunächst vielversprechend. Allerdings deutete in allen Versuchen eine Erhöhung der Basislinie auf eine Aggregation der Lösung hin, die auch mit bloßem Auge erkennbar war (Abbildung 77). Durch aufeinanderfolgende Zugabe der Komponenten konnte herausgefunden werden, dass bei Zugabe von Glucoseoxidase, eine schnelle Aggregation zu beobachten war. Warum die Enzymzugabe zu einer Aggregation führte, konnte nicht erschlossen werden.

Folglich wurde der Versuchsaufbau erneut verändert und auf den ersten Reaktionsschritt verzichtet. Nun sollte Amplex® Red direkt in den Partikeln enkapsuliert und eine Umsetzung durch HRP bei externer Zugabe einer Wasserstoffperoxid-Lösung erfolgen (Schema 3). Die Enkapsulierung gelang durch Verwendung einer ethanolischen Lösung des Farbstoffs bei der Präparation der Peptidpartikel. Als Minimalkonzentration für Amplex® Red-Lösung in der Reaktionslösung wurde ein Wert um etwa 3 μM ermittelt. So sollten negative Einflüsse auf die

Partikelstabilität durch Encapsulierung des Farbstoffs, wie sie zuvor beim DPH beobachtet wurden, verhindert werden. Es wurden zwei Äquivalente Wasserstoffperoxid und ein deutlicher Überschuss an HRP zugegeben, um eine schnelle und vollständige Umsetzung des Amplex® Red zu erreichen.

4.7.3 Ergebnisse des Amplex® Red Assay



Schema 3. Reaktionsübersicht des finalen Amplex® Red Assays. Dabei wird Amplex® Red direkt in den Partikeln enkapsuliert. Wasserstoffperoxid wird extern zugegeben und dann von der Meerrettichperoxidase (HRP) verbraucht, um Amplex® Red zu Resorufin umzusetzen. Dabei wird je ein Äquivalent Wasser und Essigsäure frei. Ein verringerter Absorptionswert im Vergleich zu einer peptidfreien Referenz, deutet die erfolgreiche Encapsulierung und Retention des Farbstoffs in den Peptidpartikeln hin.

Nachdem die Konzentrationen der einzelnen Komponenten erarbeitet worden waren (Tabelle 16), wurden drei verschiedene Bedingungen im Assay untersucht. Bei jeder Messung wurden zunächst alle Komponenten bis auf Wasserstoffperoxid in der Küvette vermischt und der Absorptionswert für zwei Minuten verfolgt. Dadurch konnte für jede einzelne Messung eine Basislinie erhalten werden, um den nachfolgenden Anstieg der Kurve besser zu visualisieren. Außerdem erlaubte diese Vorgehensweise eine genauere Bestimmung der Absorptionsdifferenzen.

Zunächst wurde eine peptidfreie Referenzmessung durchgeführt, um den Absorptionswert der vollständig umgesetzten Amplex® Red Menge zu bestimmen. Nach der zweiminütigen Wartezeit wurde eine Wasserstoffperoxid-Lösung zugegeben. Durch den Überschuss an HRP und Peroxid erfolgte der Anstieg der Absorption nach Zugabe des Peroxids rapide, sodass eine vollständige Umsetzung nach wenigen Sekunden erreicht wurde. Die Absorption wurde für insgesamt fünf Minuten verfolgt, sodass sich ein konstanter Absorptionswert nach der Umsetzung einstellen konnte. Im Anschluss wurde eine Probe mit enkapsuliertem Amplex® Red vermessen. Hier konnte ein geringerer Absorptionswert als bei der Referenz erhalten werden. Dies deutete auf eine erfolgreiche Encapsulierung des Farbstoffs hin.

In einem dritten Versuch wurden die Peptidpartikel zunächst hergestellt und dann, für die Messung, der Farbstoff extern zugegeben. In dieser Messung wurde ein Absorptionswert im Bereich der Referenzmessung erhalten. Dadurch wurde sowohl die Encapsulierung des Farbstoffs in der vorherigen Messung bestätigt, sowie gezeigt, dass keine schnelle Diffusion des Amplex® Red in die Partikel möglich war. Die Ergebnisse wurden im Triplikat bestätigt, deren Mittelwerte in Abbildung 38 dargestellt sind.

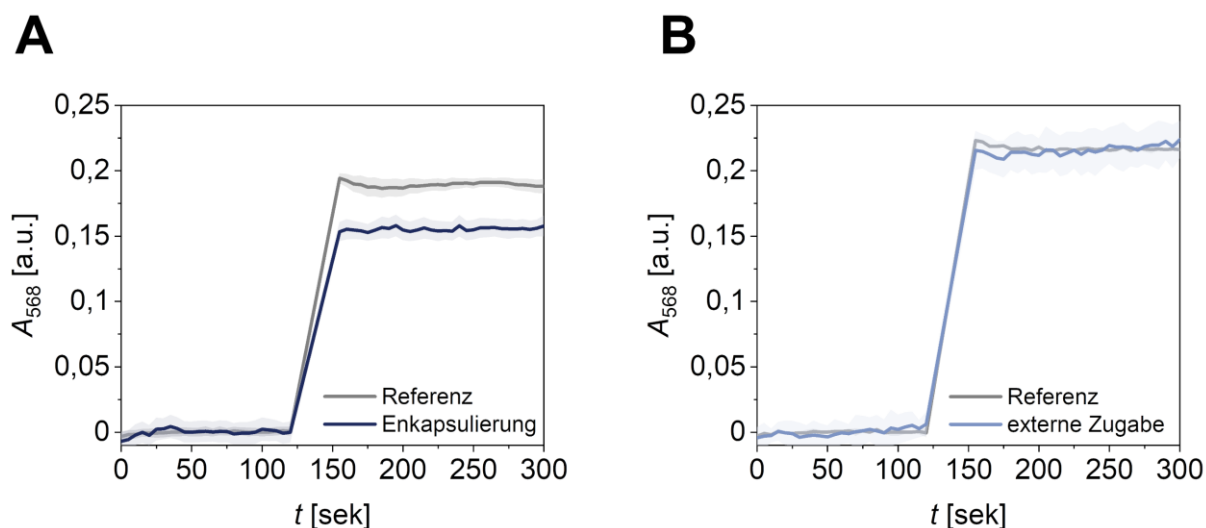


Abbildung 38. **A** Mittelwert der Triplettmessung von enkapsuliertem Amplex® Red (dunkelblau) im Vergleich zum Mittelwert der Triplettmessungen der Referenzprobe (grau). **B** Mittelwert der Triplettmessung bei externer Zugabe des Farbstoffs (hellblau) im Vergleich zur Referenzreaktion (hellgrau). Es ist zu beachten, dass die Messungen mit Peptid aufgrund der Lichtstreuung an den Partikeln einen größeren Fehler aufweisen, als die Referenzmessung.

Die UV/Vis-Spektren der jeweiligen Messungen unterstrichen die Ergebnisse des Assays. In allen Fällen war die charakteristische Absorptionsbande des Resorufin um $\lambda = 570$ nm zu beobachten. Allerdings wies allein die Messung mit enkapsuliertem Farbstoff eine diskrete zweite Bande bei $\lambda = 579$ nm auf. Diese stimmt in der Position mit anderen Systemen aus der Literatur überein, in denen die Encapsulierung von Resorufin in, z.B. Cyclodextrinen, Tetralactamen und anderen Käfigstrukturen, sowie Micellen, beobachtet wurde.^[190-193] Im Gegensatz dazu war im UV/Vis-Spektrum der externen Zugabe das Signal bei $\lambda = 571$ nm durch leichte Wechselwirkungen mit den Partikeln verbreitert, zeigte aber keine zweite Bande bei höheren Wellenlängen.

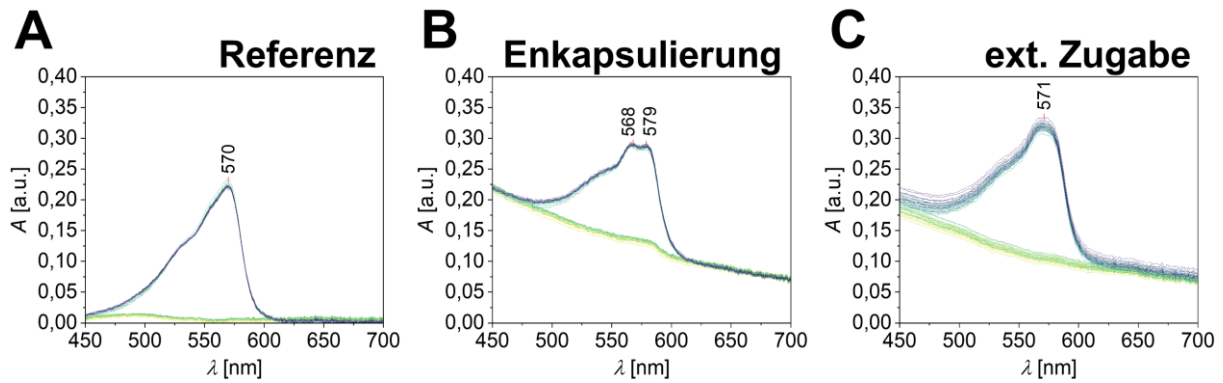


Abbildung 39. **A** Repräsentative UV/Vis-Spektren der Referenzreaktion des Amplex® Red Assay vor Zugabe der Peroxid-Lösung (grün) und nach Zugabe der Peroxid-Lösung (blau). **B** Repräsentative UV/Vis-Spektren der Reaktionslösung mit enkapsuliertem Farbstoff vor der Peroxid-Zugabe (grün) und nach der Zugabe (blau). Es ist eine zusätzliche Bande bei $\lambda = 580$ nm in allen Messungen nach der Zugabe zu erkennen. **C** Repräsentative UV/Vis-Spektren der Reaktionslösung bei externer Zugabe von Amplex® Red. Die Spektren vor der Peroxid-Zugabe sind grün dargestellt, die Spektren nach der Zugabe sind blau. Im Vergleich zur Enkapsulierung ist nur ein Maximum nach der Zugabe des Wasserstoffperoxids zu erkennen.

4.7.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden Wechselwirkungen der **HLHP4** Partikel mit verschiedenen Gastmolekülen beleuchtet. Die Existenz einer hydrophoben Umgebung in den Partikeln konnte erfolgreich über Interkalation des umgebungssensitiven Farbstoffs DPH nachgewiesen werden. Dessen Fluoreszenz bei Zugabe zu der Partikellösung konnte sowohl im Fluoreszenzspektrometer, als auch unter dem Mikroskop beobachtet werden. In Hinblick auf die Anwendung der Partikel zur Enkapsulierung verschiedener Moleküle wurde das Enkapsulierungsvermögen der Peptidpartikel in einem Amplex® Red Assay untersucht. Dabei wurden zunächst die Schwierigkeiten bei der Entwicklung des Assays dargelegt und anschließend die Ergebnisse des erfolgreichen Assays diskutiert. Mit Hilfe von Absorptionsmessungen und UV/Vis-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass sich Amplex® Red enkapsulieren lässt und auch in den Partikeln gehalten werden kann.

4.8 Änderung der Membranfluidität der HLHP4-Partikel

In Kapitel 4.1 wurden verschiedene Möglichkeiten der Modifikation des grundlegenden Helix-Loop-Helix-Motivs beschrieben. Dazu gehören unter anderem Modifikationen der beiden hydrophoben Helices. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich das Ersetzen eines Leucins durch ein Prolin in einem der hydrophoben Segmente auf die Assemblate auswirkt. Durch Prolin sollte ein Knick in der Peptidkette induziert werden, wodurch das Verhalten ungesättigter Fettsäuren nachgeahmt würde, deren Doppelbindungen ebenfalls zu einem Knick in der Fettsäurekette führen.^[1, 3, 49] Entsprechend wurde eine Zunahme der Größe der Partikel aufgrund des erhöhten Raumbedarfs der modifizierten Variante erwartet. Außerdem wurde eine Zunahme der Membranfluidität erwartet, da die veränderte dreidimensionale Struktur zusätzlich die Stärke der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Monomeren abschwächen sollte. Diese Schwächung der Wechselwirkungen wäre vergleichbar mit einer Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur bei Lipiden mit ungesättigten Bindungen.^[1, 3, 49]

HLHP4.1 ließ sich mit den zuvor etablierten Protokollen ohne Probleme synthetisieren und aufreinigen. Im Vergleich zu **HLHP4** zeigte sich eine leicht verbesserte Wasserlöslichkeit.

HLHP4.1 wurde nicht ohne Zusatz der Stammverbindung **HLHP4** assembliert, da auch in der Natur ungesättigte Fettsäuren meist nicht ausschließlich in den Membranen vorkommen.^[1, 3] Es wurden Mischungen mit der Stammverbindung **HLHP4** mit 10 mol-%, 5 mol-% und 2,5 mol-% **HLHP4.1** hergestellt. Dazu wurden die Peptide in HFIP angelöst und anteilig, basierend auf den Stoffmengenverhältnissen, vermischt. Die Partikel wurden zunächst basierend auf Protokoll B in pH 7 assembliert. Zum einen bildete **HLHP4** unter diesen Bedingungen stabile Partikel, die sich ohne Probleme herstellen ließen. Zum anderen war es interessant zu untersuchen, wie sich der Prozess der Partikelfusion unter diesen neuen Bedingungen verändern würde.

In allen drei Fällen konnten Partikel erhalten werden (Abbildung 40A). Die hydrodynamischen Durchmesser waren dabei alle größer als bei den reinen Partikeln von **HLHP4** ($d_H = 114$ nm) und nahmen schrittweise mit zunehmendem Anteil an **HLHP4.1** weiter zu. Diese Beobachtungen bestätigten die Vermutungen hinsichtlich der Auswirkungen eines geknickten hydrophoben Segments auf die Größe der Assemblate. Die schrittweise Zunahme der Größe zeigte, dass die Partikelgröße, wie vermutet, ungefähr proportional mit der Menge an **HLHP4.1** in der Membran zunahm. Die Stabilität der Partikel war durch den Zusatz von **HLHP4.1** ebenfalls, wie erwartet, vermindert. Allerdings war der Stabilitätsverlust unerwartet stark, sodass die Partikel selbst bei einem sehr geringen Anteil von 2,5 % **HLHP4.1** über Nacht aggregierten, wie es die Zunahme der hydrodynamischen Durchmesser belegt (Abbildung 40B). Dennoch konnte die Vermutung einer erhöhten Membranfluidität bestätigt werden.

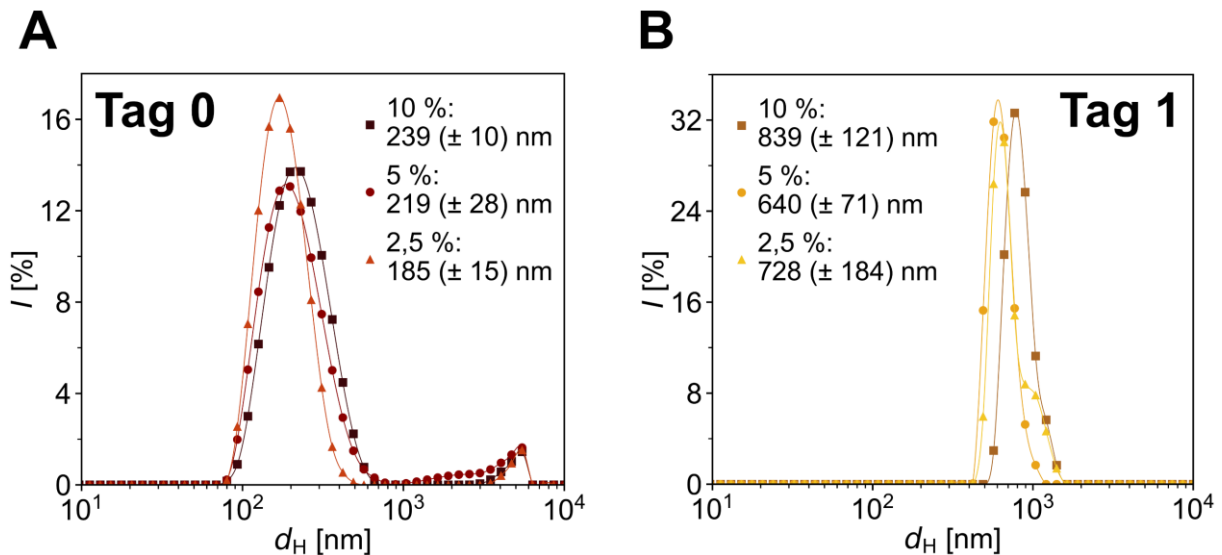


Abbildung 40. **A** Mittelwerte der Triplettmessungen der Partikelgrößen von Mischungen von **HLHP4** mit verschiedenen Anteilen **HLHP4.1** bei pH 7 (10 mM Citratpuffer). Es ist eine Vergrößerung der Partikel mit zunehmendem Anteil an **HLHP4.1** messbar. **B** Größenverteilungen der gleichen Proben nach Lagerung über Nacht bei Raumtemperatur. Es ist eine deutliche Zunahme aller Größen aufgrund von Partikelaggregation sichtbar. Alle Verteilungen stellen die Größenverteilung nach Intensität dar.

Die geringe Stabilität der Partikel ließ sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen (Abbildung 41). Obwohl alle Aufnahmen direkt nach Präparation der Partikel erfolgten, ließen sich in keinem Fall Partikel erkennen. Stattdessen konnten nur Aggregate verschiedenster Größen beobachtet werden. Besonders eindrucksvoll zeigte sich die schnelle Aggregation der Partikel in einer Aufnahme der Probe mit 5 % **HLHP4.1** (Abbildung 78). Hier ließen sich bereits nach der Präparation Peptidschichten mit Ausmaßen von mehreren Mikrometern beobachten, wie sie bei der Probe von reinem **HLHP4** nur nach fünf Tagen Lagerung bei Raumtemperatur auftraten.

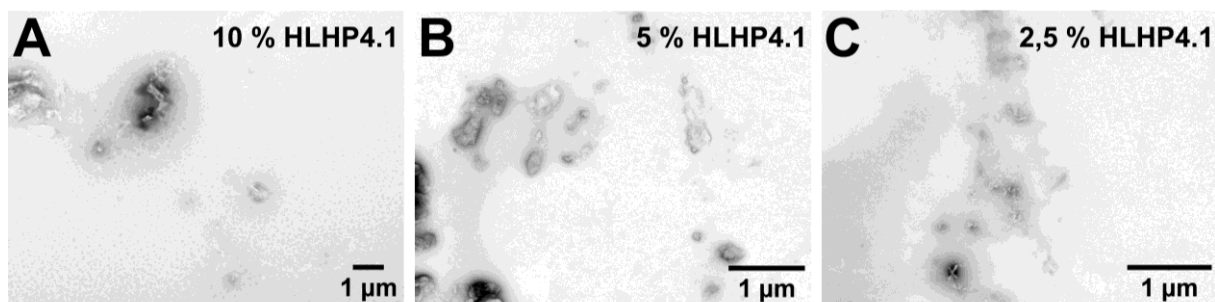


Abbildung 41. STEM-Mikrographien der Mischungen von **HLHP4** mit **HLHP4.1** bei verschiedenen Anteilen der geknickten Variante direkt nach der Präparation bei pH 7 (10 mM Citratpuffer). **A** Mischung aus 10 % **HLHP4.1** mit **HLHP4**. **B** Mischung aus 5 % **HLHP4.1** mit **HLHP4**. **C** Mischung aus 2,5 % **HLHP4.1** mit **HLHP4**. Auf keiner Aufnahme sind intakte Partikel zu erkennen.

Die Experimente mit **HLHP4.1** implizierten schwache intermolekulare Wechselwirkungen in der Membran der β -Faltblatt-Partikel von **HLHP4**, da geringe Mengen an **HLHP4.1** bereits sichtbare Auswirkungen auf die Partikelstabilität hatten. Allerdings unterstrich dieses Erkenntnis die Beobachtung der Partikelfusion im Vergleich zu den α -helikalen Konformeren.

4.9 Modifikationen der Loop-Sequenz

Eine weitere Möglichkeit zur Modifikation besteht in Änderungen des Schleifensegments. Optionen umfassen Änderungen der Länge, der Sequenz, der Peptidladung oder Dekorationen der hydrophilen Aminosäuren. Aus den vielen verschiedenen Optionen wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst Modifikationen der Sequenz und der Länge der Schleife untersucht.

Dazu wurden die beiden Peptide **HLHP5** und **HLHP6** hergestellt. Bei **HLHP5** wurden die vier Arginine in der Schleife durch vier Lysine ersetzt. Durch eine Änderung der funktionellen Gruppe der Seitenkette werden Unterschiede im Vermögen der Peptide zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen erwartet.^[132, 133]

Für **HLHP6** wurde die Arginin-haltige Sequenz zu Grunde gelegt. Allerdings wurde diese Schleife um eine Einheit auf fünf Arginine verlängert. Folglich sollte der Biegeradius der Hufeisenform verringert werden und es zur Bildung kleinerer Partikel kommen.

Untersuchungen an **HLHP5** und **HLHP6** wurden teilweise gemeinsam mit *Charlotte Helm, B.Sc.* durchgeführt.

4.9.1 Grundlegende Charakterisierung

Mit den optimierten Synthese- und Aufreinigungsprotokollen ließen sich beide Peptide in hoher Reinheit herstellen und isolieren (Abbildung 60, Abbildung 61). Beide Varianten teilten den sehr hydrophoben Charakter von **HLHP4** und wiesen eine schlechte Wasserlöslichkeit auf. Entsprechend wurden beide Peptide mit der Präparationsmethode unter Verwendung von Ethanol assembliert und die resultierenden Strukturen mit den gleichen Methoden wie bei **HLHP4** bei pH 3 und pH 7 untersucht. Die erhaltenen Daten werden im Folgenden direkt im Vergleich mit den Ergebnissen der entsprechenden Messungen von **HLHP4** dargestellt.

Im Allgemeinen ähnelten die Größenverteilungen der beiden Varianten denen von **HLHP4** (Abbildung 42). Alle hydrodynamischen Durchmesser lagen in einem ähnlichen Wertebereich zwischen 20 nm bis 900 nm. Die intensitätsverteilten DLS-Diagramme zeigten sowohl im sauren wie auch im neutralen Milieu einen ausgeprägteren bimodalen Charakter für **HLHP5** und **HLHP6**. Beide Varianten bildeten größere Partikel als **HLHP4**.

Bei Betrachtung der Größenverteilungen nach Anzahl ließ sich aber erkennen, dass die Partikelgrößen in allen Fällen nahezu identisch waren und die Werte größtenteils in einem Bereich unter 100 nm lagen (Abbildung 79). Dennoch waren die Werte der beiden Arginin-haltigen Peptide in einem ähnlichen Bereich gruppiert (pH 3: um die 55 nm, pH 7: um die 30 nm), während die Messwerte von **HLHP5** eher abwichen. Im sauren Milieu waren die Partikel von **HLHP5** kleiner und bei neutralem pH-Wert größer. Folglich schien die Partikelgröße eher durch die Zusammensetzung der hydrophilen Schleife als durch deren Länge beeinflusst zu sein. Interessanterweise ließ sich für **HLHP6** bei pH 7 eine bimodale

Verteilung erkennen, sodass hier zwei Gruppen von Partikeln mit unterschiedlichen Größen vorzuliegen schienen. Allerdings waren die Größenwerte bei pH 3 quasi identisch mit den von **HLHP4**. Eine signifikante Auswirkung der Verlängerung des hydrophilen Segments lässt sich somit nicht begründen.

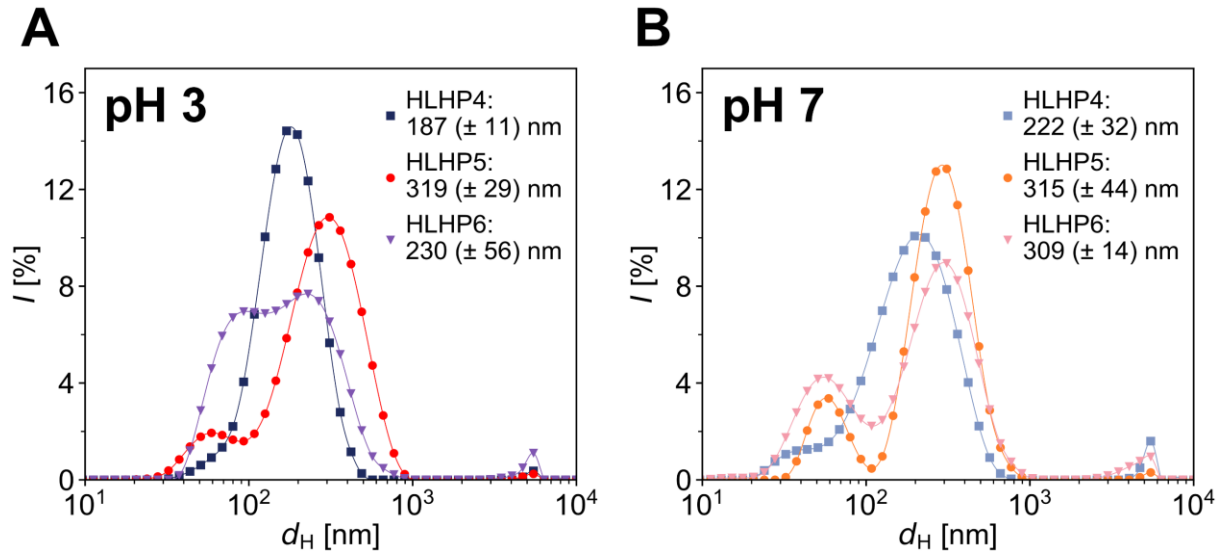


Abbildung 42. **A** Größenverteilungen nach Intensität für Partikel von **HLHP4** (blau), **HLHP5** (rot) und **HLHP6** (violett) direkt nach der Präparation bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer). **B** Größenverteilungen nach Intensität für Partikel von **HLHP4** (hellblau), **HLHP5** (orange) und **HLHP6** (pink) direkt nach der Präparation bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). Dargestellt sind Mittelwerte von Triplettmessungen einer repräsentativen Probe.

Die Sekundärstrukturanalyse zeigte für beide Varianten bei beiden pH-Werten eine α -helikale Sekundärstruktur (Abbildung 43).^[147-149] Die CD-Spektren der beiden Arginin-Varianten ähnelten sich im Kurvenverlauf und auch im Verhältnis der Minima, während die CD-Spektren von **HLHP5** in Bezug auf das Verhältnis der beiden Minima abwichen. Bei **HLHP4** und **HLHP6** ließ sich eine stärkere Helix-Wechselwirkung bei pH 3 beobachten, während die Verhältnisse bei **HLHP5** genau umgekehrt waren und die Helix-Interaktion im neutralen Milieu zunahm. Dennoch zeigte **HLHP5** eine geringere α -Helizität. Tabelle 4 zeigt die berechneten Werte für das Verhältnis 222 nm / 208 nm für alle sechs CD-Spektren.

Tabelle 4. Verhältnis 222 nm zu 208 nm der Minima der α -Helix für **HLHP4**, **HLHP5** und **HLHP6**. Die Werte wurden aus den CD-Spektren aus Abbildung 43 bei pH 3 und pH 7 berechnet.

Peptid	Verhältnis 222 nm / 208 nm	
	pH 3	pH 7
HLHP4	1,13	0,86
HLHP5	0,84	0,98
HLHP6	1,06	0,83

Aus den Ergebnissen der CD-Messungen ließ sich schlussfolgern, dass, wie zu erwarten, die Sekundärstruktur der Peptide vor allem durch die Zusammensetzung der hydrophoben Segmente bestimmt wird. Die Zusammensetzung der hydrophilen Schleife schien aber eine Rolle für die Stärke der Helix-Interaktionen und das Verhalten bei verschiedenen pH-Werten zu spielen.

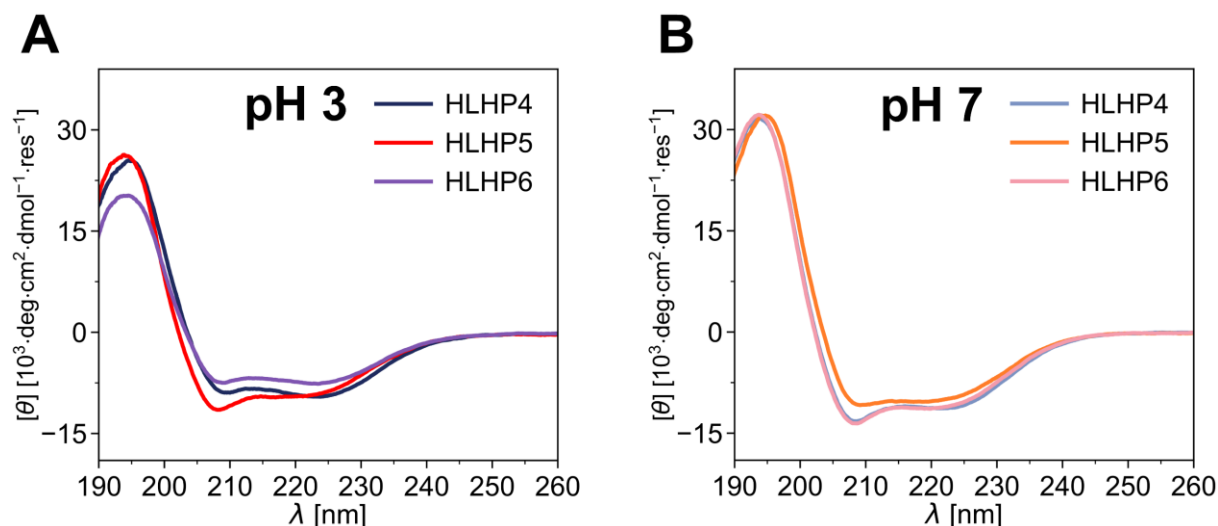


Abbildung 43. **A** Vergleich der CD-Spektren von **HLHP4** (blau), **HLHP5** (rot) und **HLHP6** (violett) bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) direkt nach der Präparation. **B** Vergleich der CD-Spektren von **HLHP4** (hellblau), **HLHP5** (orange) und **HLHP6** (pink) bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) direkt nach der Präparation

4.9.2 Stabilitätsexperimente

Die Stabilität beider Varianten war im Allgemeinen geringer als für **HLHP4**. Dies ließ sich zum einen über die leicht verringerten Zeta-Potential-Werte beider Peptide im Vergleich zu **HLHP4** zeigen (Tabelle 5).

Im Übrigen zeigten alle drei Varianten eine Vorzeicheninversion des Zeta-Potentials, was sich aber mit der Ähnlichkeit der drei Peptide begründen ließ. Bereits bei der Besprechung der Zeta-Potentiale von **HLHP4** war die Vorzeicheninversion diskutiert worden. Im Vergleich mit mehreren Literaturquellen wurde die Möglichkeit zur Beeinflussung des Zeta-Potentials durch Anlagerung von Pufferionen sowie die Präparation aus Ethanol beschrieben.^[171-175]

Tabelle 5. Übersicht der Zeta-Potentiale der Partikel von **HLHP4**, **HLHP5** und **HLHP6** mit α -helikaler Sekundärstruktur bei pH 3 und pH 7.

	pH 3	pH 7	<i>n</i> -BuOH (pH 3)
HLHP4	+ 30 (\pm 1) mV	+ 22 (\pm 1) mV	+ 14 (\pm 2) mV
HLHP5	+ 28 (\pm 1) mV	+ 15 (\pm 4) mV	---
HLHP6	+ 25 (\pm 4) mV	+ 18 (\pm 2) mV	---

Identisch zu **HLHP4** zeigten beide modifizierten Peptide eine höhere Stabilität bei pH 3 als bei pH 7. Die geringeren Gesamtstabilitäten beider Modifikationen zeigten sich auch in den entsprechenden STEM-Aufnahmen (Abbildung 44, Abbildung 45). Beide Peptide

assemblierten in runde Partikel, deren Morphologie identisch mit der der **HLHP4**-Partikel war. Ebenfalls ließ sich in keinem Fall in der Partikelform ein Unterschied zwischen pH 3 und pH 7 erkennen. Wie bei **HLHP4** wiesen auch diese Partikel einen nicht-fusionierenden Charakter auf und zeigten eine hohe Tendenz, aneinander zu haften. Allerdings neigten beide Varianten, im Gegensatz zu **HLHP4**, zu einer schnellen Aggregation, die sich unabhängig vom pH-Wert erkennen ließ.

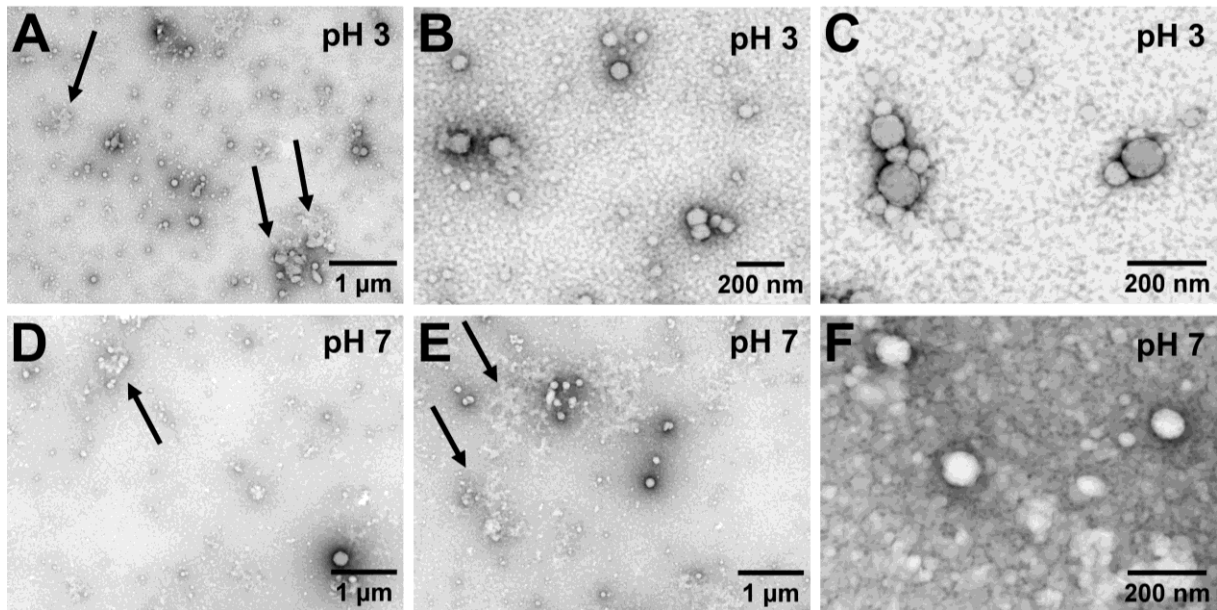


Abbildung 44. A-C STEM-Mikrographien von **HLHP5**-Partikeln α -helikalen Typs direkt nach der Präparation bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer). D-F STEM-Mikrographien von **HLHP5**-Partikeln α -helikalen Typs direkt nach der Präparation bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). Aggregate sind beispielhaft mit Pfeilen markiert.

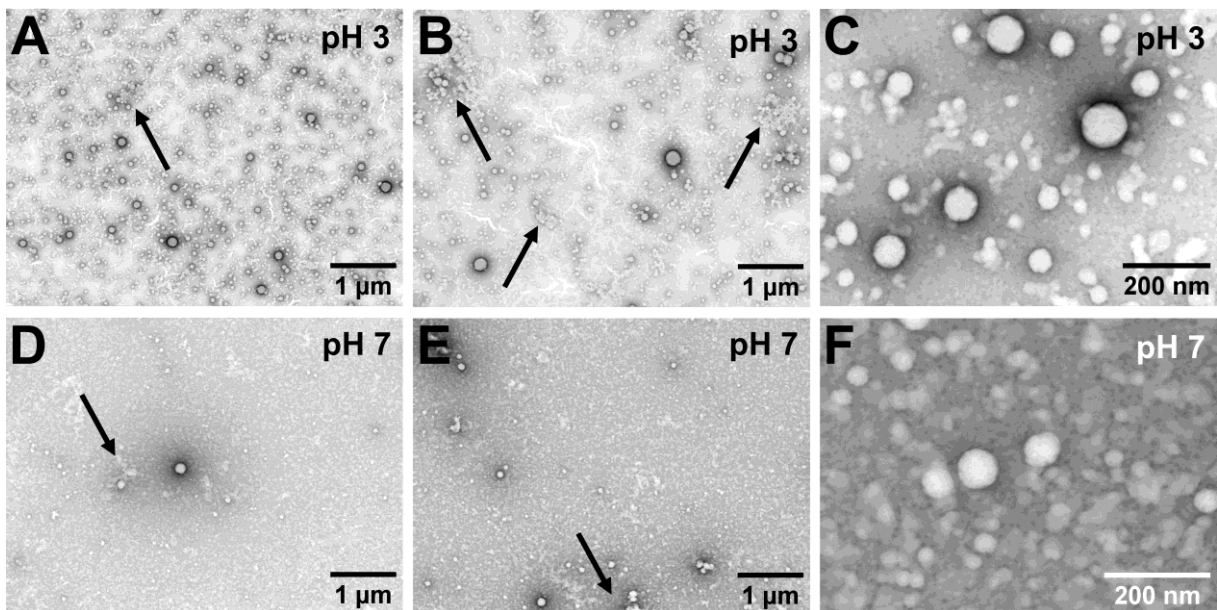


Abbildung 45. A-C STEM-Mikrographien von **HLHP6**-Partikeln α -helikalen Typs direkt nach der Präparation bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer). D-F STEM-Mikrographien von **HLHP6**-Partikeln α -helikalen Typs direkt nach der Präparation bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). Aggregate sind beispielhaft mit Pfeilen markiert.

Dabei bildete **HLHP5** größere Aggregate als **HLHP6**. Nach Lagerung der Proben über Nacht bei 4 °C und Raumtemperatur ließ sich in allen Fällen unter dem Elektronenmikroskop eine zunehmende Aggregation beobachten (Abbildung 80). Für **HLHP6** bei pH 3 war diese Zunahme am geringsten, für **HLHP5** unter beiden Lagerungsbedingungen am größten. Eine Verdünnung der Probe auf 50 % der Ausgangskonzentrationen konnte die Aggregation nicht unterdrücken, wie an einem Beispiel gezeigt werden konnte (Abbildung 81). Es wurde lediglich die Anzahl der Partikel auf dem Substrat verringert, während die verbleibenden Partikel noch immer zur Aggregation neigten.

Durch die höhere Instabilität der Partikel ließ sich auch eine schnellere Änderung der Sekundärstruktur hin zu mehr β -Faltblatt-Anteil erwarten. Tatsächlich konnte in drei von vier Fällen ein sichtbarer Anteil an β -Faltblatt-Sekundärstruktur nachgewiesen werden, wenn die Änderung der Sekundärstruktur über 24 Stunden bei Raumtemperatur mit dem CD-Spektrometer verfolgt wurde (Abbildung 46). Dazu wurden über einen Tag hinweg, alle 30 Minuten 10 CD-Spektren der Peptide aufgenommen, während die Lösung in der Küvette gelagert wurde. Erneut zeigte sich, wie bei **HLHP4**, der Trend einer erhöhten Stabilität bei pH 3. Eine Ausnahme in dieser Messreihe bildete **HLHP6** bei pH 3, dessen Sekundärstruktur sich nicht veränderte. Als Folge deutlicher Präzipitation des Peptids während der Partikelpräparation, wurde für die Messungen von **HLHP6** bei pH 3 der verbleibende Überstand verwendet. Dadurch erklären sich die, im Vergleich zu anderen Messungen, verringerten Signalintensitäten in allen CD-Spektren.

Anschließend wurden sowohl für **HLHP5** als auch für **HLHP6** die Experimente zur temperaturinduzierten Umwandlung der Sekundärstruktur durchgeführt (Abbildung 82, Abbildung 83). Ziel war es, zu untersuchen, ob auch hier eine temperaturabhängige Umwandlung zur β -Faltblatt-Sekundärstruktur erfolgt. Es wurden ähnliche Ergebnisse wie für **HLHP4** erhalten. In allen Fällen wandelte sich die Sekundärstruktur beim Erhitzen zum β -Faltblatt um. Die Umwandlung war irreversibel, was durch Präzipitation des Peptids optisch zu erkennen war und auch durch Messungen der Sekundärstruktur nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur gezeigt werden konnte. Allerdings unterschieden sich die Peptide in den Umwandlungstemperaturen. Dem bisherigen Trend folgend, zeigten beide Varianten wie auch **HLHP4** bei pH 3 eine höhere Umwandlungstemperatur und waren somit im sauren Milieu stabiler. Zudem wurden die Ergebnisse aus der elektronenmikroskopischen Analyse bestätigt, da im Vergleich der drei Peptide die Partikel aus **HLHP5** am instabilsten waren. Eine Übersicht der Umwandlungstemperaturen ist in Tabelle 6 gezeigt.

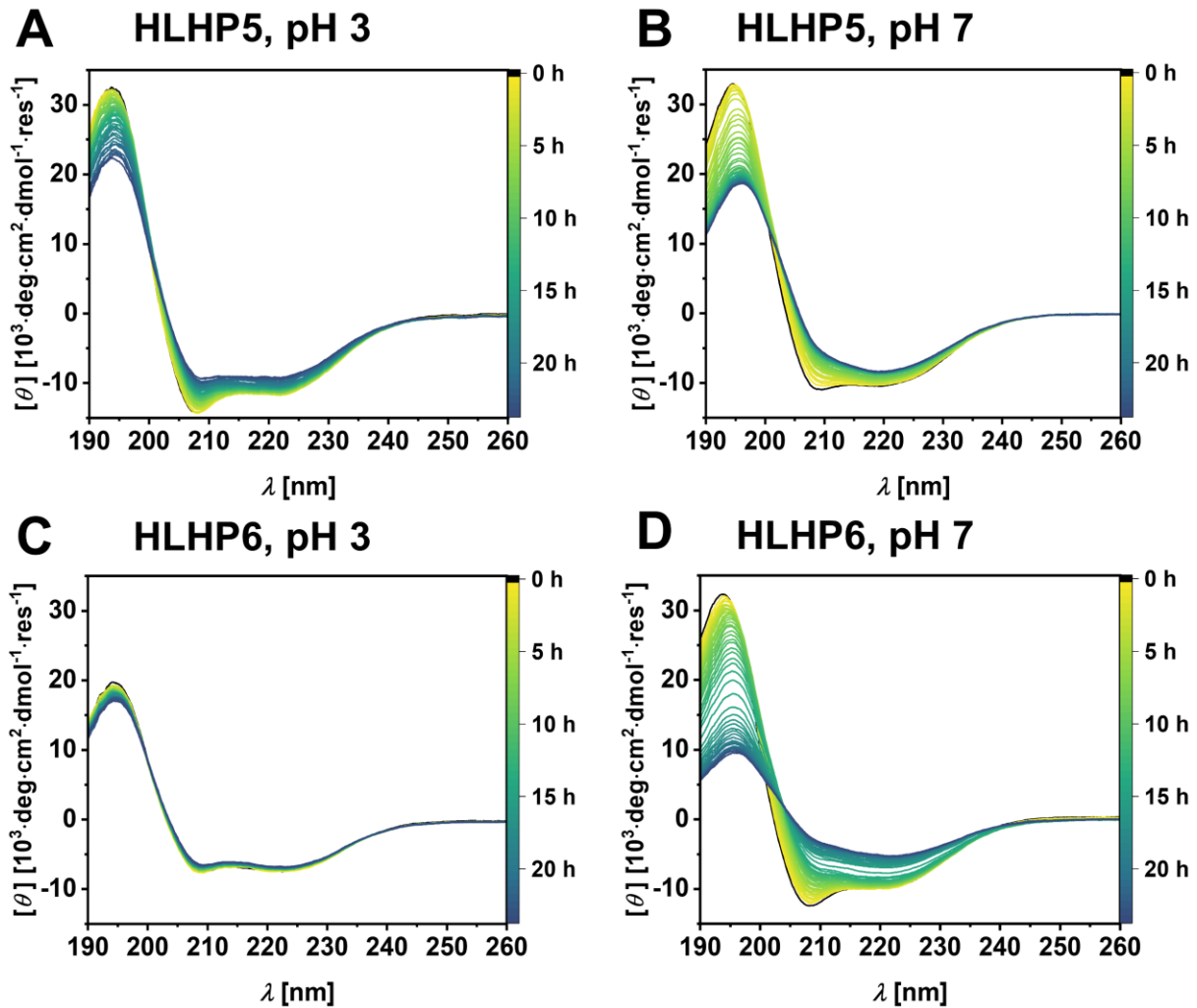


Abbildung 46. A-B 24 h CD-Messungen der Partikel von α -helikalem **HLHP5** bei pH 3 (A, 5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und pH 7 (B, 5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). C-D 24 h CD-Messungen der Partikel von α -helikalem **HLHP6** bei pH 3 (C, 5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und pH 7 (D, 5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). Aufgrund signifikanter Präzipitation während der Partikelpräparation sind die Signalintensitäten bei C deutlich verringert. Alle Spektren wurden in 30 Minuten Intervallen über einen Zeitraum von 24 Stunden bei Raumtemperatur aufgenommen.

Tabelle 6. Umwandlungstemperaturen von **HLHP4**, **HLHP5** und **HLHP6** bei pH 3 und pH 7, wie sie aus den CD-Spektren erhalten werden konnten.

	pH 3	pH 7
HLHP4	50 °C	45 °C – 50 °C
HLHP5	45 °C	40 °C
HLHP6	50 °C	40 °C – 45 °C

Interessant war hier erneut die Messung von **HLHP6** im sauren Milieu. Die Umwandlung begann bei 50 °C, zeigte aber im Vergleich zu allen anderen Messungen eine langsamere Änderung der Sekundärstruktur mit zunehmender Temperatur (Abbildung 83A,B).

4.9.3 Schlussfolgerungen

Der Vergleich der Peptide **HLHP4**, **HLHP5** und **HLHP6** lieferte einige Einblicke in die Sequenz-Funktion-Beziehungen der HLH-Peptide. Zum einen wurde für alle drei Varianten eine erhöhte Stabilität bei pH 3 beobachtet. Wie bereits in Kapitel 4.5.1 diskutiert wurde, könnten diese pH-spezifischen Unterschiede durch eine stabilisierende Wirkung der Citrationen und eine erhöhte Pufferkonzentration bei pH 3 erklärt werden. Für **HLHP4** und **HLHP6** ließen sich zusätzlich stärkere Helix-Interaktionen im sauren Milieu beobachten, die zu einer weiteren Stabilisierung beitragen könnten.

Die wiederum geringeren Werte der α -Helizität bei **HLHP5** unterstrichen eine weitere Beobachtung hinsichtlich der Partikelstabilitäten der einzelnen HLH-Peptide. Und zwar nahmen diese im Vergleich unter identischen Bedingungen in der Reihenfolge **HLHP4** > **HLHP6** > **HLHP5** ab. Dieser Trend zeigte sich neben den CD-Messungen, auch in der Abfolge der Zeta-Potential-Werte und in der elektronenmikroskopischen Analyse. Die höhere Stabilität der Partikel der Arginin-haltigen Peptide lässt sich vermutlich mit der erhöhten Fähigkeit der Guanidinium-Gruppe zur Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen im Vergleich zu einem primären Amin begründen.^[132, 133] Somit bestätigten sich die zu Beginn des Kapitels geäußerten Erwartungen hinsichtlich einer Änderung der funktionellen Gruppe des hydrophilen Segments.

Die Stabilitätsunterschiede zwischen **HLHP4** und **HLHP6** können mit der Länge der Schleife begründet werden. Auch wenn sich aus den Experimenten die erwartete Verkleinerung der Partikel nicht eindeutig herleiten ließ, erhöhte eine zusätzliche Arginin-Einheit in der Schleife zwangsweise die elektrostatische Abstoßung. Dies führte im Folgenden zu einer erhöhten Instabilität der Partikel, die sich bei pH 7 eindeutig in den Stabilitätsmessungen äußerte. Bei pH 3 spiegelte sich eine erhöhte Instabilität während der Partikelpräparation und in der deutlichen Präzipitation des Peptids wider. Die verbleibenden Partikel im Überstand zeigten anschließend eine sehr gute Stabilität. Eine Erklärung dafür konnte nicht gefunden werden. Außerdem blieb die Frage offen, ob eine Präzipitation von **HLHP6** unter sauren Bedingungen durch eine Anpassung der Präparationsmethode hätte vermindert werden können.

4.9.4 Innere Struktur der HLH-Peptidpartikel

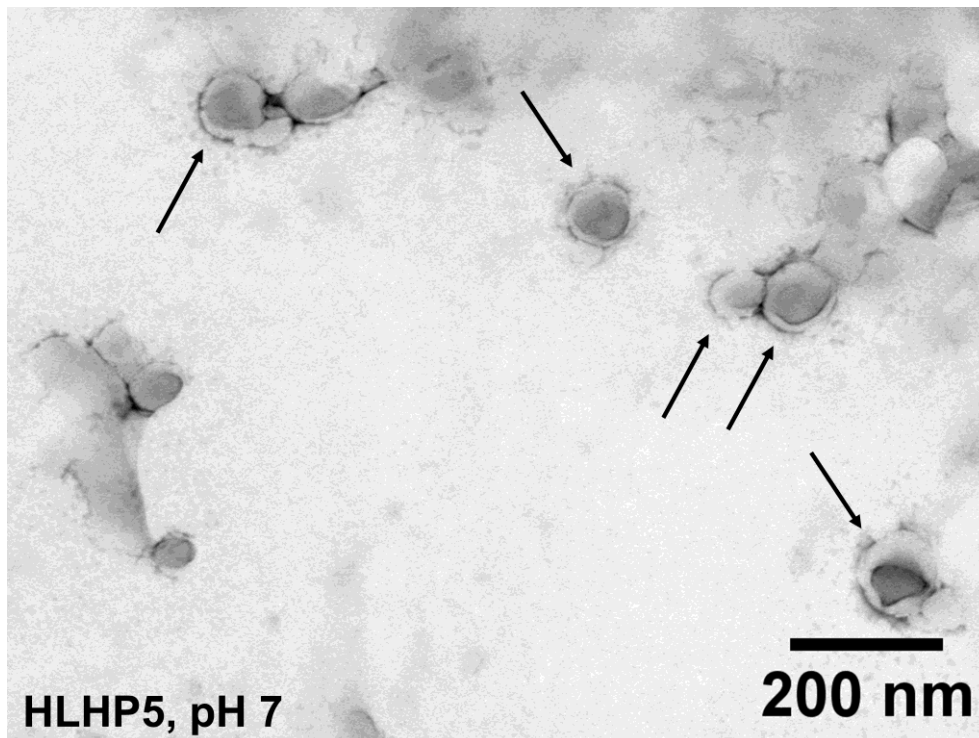


Abbildung 47. STEM-Mikrographie einer Probe von α -helikalen **HLHP5**-Partikeln bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) direkt nach der Präparation. Die Pfeile markieren einige becherförmige Strukturen, die auf diesem Substrat in großer Anzahl beobachtet werden konnten.

Wie in Abschnitt 2.3 gezeigt wurde, können amphiphile Moleküle zu Vesikeln assemblieren oder eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (LLPS) eingehen. Einen Hinweis zum inneren Aufbau der HLH-Partikel lieferte eine Beobachtung von **HLHP5** bei pH 7 (Abbildung 47). In dieser Probe konnten in großem Ausmaß becherförmigen Strukturen beobachtet werden, die im Allgemeinen bei Liposomen unter dem Elektronenmikroskop gefunden werden können.^[159, 162, 163] Somit deuteten die Aufnahmen für dieses Peptid unter diesen Bedingungen auf einen Hohlraum in der Mitte der Struktur, d.h. einen vesikulären Charakter, hin. Ähnliche Strukturen konnten zwar für **HLHP4** und **HLHP6** nicht beobachtet werden. Jedoch zeichneten sich deren Partikel durch eine höhere Stabilität der Membran aus, die möglicherweise einem Kollaps unter reduziertem Druck widerstehen können.

Einen weiteren Hinweis auf den vesikulären Aufbau lieferte der nicht-fusionierende Charakter der Peptidpartikel, da bei einer LLPS im Allgemeinen eine Fusion der Kondensate beobachtet werden kann. Diese kann zwar durch eine Reifung der Partikel und nachfolgende Verhärtung der Kondensate unterbunden werden.^[53, 61, 62] Da allerdings bei den HLH-Peptiden mit α -helikaler Sekundärstruktur keine Partikelfusion zu beobachten war und die Partikelgrößen aus den STEM-Mikrographien nach der Präparation mit den DLS-Messungen übereinstimmten, müsste hier ein instantaner Reifeprozess stattgefunden haben. Wiederum benötigen selbst sehr aggregationsneigende Peptide mehrere Stunden für den Reifeprozess,^[62] weshalb eine instantane Reifung eher unwahrscheinlich ist. Zudem konnten in den STEM-Mikrographien der

Langzeitmessungen keine Hinweise auf Amyloid- oder ähnliche fibrilläre Strukturen gefunden werden, die auf einen fortschreitenden Reifeprozess hindeuten würden.^[53, 62, 65]

4.9.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden Experimente zu zwei Varianten von **HLHP4** mit veränderter Loop-Sequenz vorgestellt und mit diesem verglichen. Die Peptidpartikel wurden dafür aus Ethanol präpariert. Es wurden DLS- und CD-Daten diskutiert und auch die Stabilität der verschiedenen Partikel mit Hilfe von Zeta-Potential-Messungen, STEM-Aufnahmen und Langzeit-CD Messungen untersucht. Im Anschluss wurden Schlussfolgerungen aus den Messungen in Bezug auf Sequenz-Funktion-Beziehungen der Peptidpartikel gezogen, Gründe für die unterschiedlichen Stabilitäten der Peptide diskutiert, sowie Hinweise auf einen vesikulären Charakter der Partikel dargelegt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Feld der peptidbasierten Lipidmimetika ist von linearen amphiphilen Peptiden, die in unterschiedliche dreidimensionale Strukturen assemblieren, dominiert.^[28, 29, 31, 34, 72, 73] Die lineare Struktur limitiert jedoch die Modifizierbarkeit der Morphologien. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, das Feld der amphiphilen Peptide, um einen komplexeren Baustein zu erweitern und die Sequenz-Funktion-Beziehungen der resultierenden Peptidpartikel zu untersuchen. Als Grundlage wurde das Helix-Loop-Helix (HLH)-Motiv gewählt, das durch zwei hydrophobe Segmente gekennzeichnet ist, die über eine hydrophile Schleife zu einer hufeisenförmigen Struktur verbunden sind (Abbildung 48). Diese amphiphile Struktur ahmt den Aufbau von Membranlipiden nach.^[3] Das HLH-Motiv ist ausreichend komplex, um über eine Vielzahl an Stellschrauben die Morphologie der zu erwartenden Partikel zu modifizieren. Dazu gehören unter anderem Anpassungen in Länge und Art der hydrophoben Aminosäure in einem oder beiden hydrophoben Segmenten. Erhöhungen der Membranfluidität ließen sich potenziell durch Einbau von Prolinen in die hydrophoben Segmente erreichen. Die Größe der Partikel, Reaktion auf externe Stimuli und Gesamtladung der Assemblate können durch Modifikationen und Dekoration der hydrophilen Einheit gesteuert werden. Ein Blick in die Literatur zeigt zudem die Einzigartigkeit dieses Motivs in der Verwendung als Baustein amphiphiler Lipidmimetika. Einzig *Lieberg und Aili* publizierten Arbeiten zur Selbstassemblierung von HLH-Peptiden.^[125, 126] Diese Peptide waren allerdings im Gegensatz zu den Sequenzen in dieser Arbeit nicht vollständig *de novo* konstruiert.

Es wurde eine kleine Bibliothek an HLH-Peptiden aufgebaut, die in Tabelle 7 gezeigt ist.

Tabelle 7. Übersicht der Peptidsequenzen, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Peptid	Sequenz
HLHP1	Ac-AAA AAA AAA GPRR G AAA AAA AAA-NH ₂
HLHP1.1	Ac-AAA P AA AAA GPRR G AAA AAA AAA-NH ₂
HLHP2	Ac-AAA AAA AAA GPRRR G AAA AAA AAA-NH ₂
HLHP2.1	Ac-AAA P AA AAA GPRRR G AAA AAA AAA-NH ₂
HLHP3	Ac-AAA AAA AAA GPRRRR G AAA AAA AAA-NH ₂
HLHP3.1	Ac-AAA P AA AAA GPRRRR G AAA AAA AAA-NH ₂
HLHP4	Ac-LLL LLL LLL GPRRRR G LLL LLL LLL-NH ₂
HLHP4.1	Ac-LLL P LL LLL GPRRRR G LLL LLL LLL-NH ₂
HLHP5	Ac-LLL LLL LLL GPKKKK G LLL LLL LLL-NH ₂
HLHP6	Ac-LLL LLL LLL GPRRRRRG LLL LLL LLL-NH ₂

Die Synthese der Peptide gelang unter Minimierung der Aggregation mittels Mikrowellen-unterstützter Festphasenpeptidsynthese (SPPS) und der doppelten Kupplung aller

Aminosäuren. Zusätzlich wurden Aminosäuren ohne Seitenketten-Schutzgruppe bei 105 °C gekuppelt und ein weiterer Waschschrift zwischen den Kupplungen eingeführt. Probleme bei der Löslichkeit der Rohpeptide wurden durch Verwendung von 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP) als Lösungsmittel umgangen. Unter der Verwendung von HFIP und Methanol konnten Lösungsmittelgemische für eine erfolgreiche chromatographische Aufreinigung der Rohpeptide auf C4-Umkehrphasensäulen entwickelt werden, sodass beinahe alle Peptide in Reinheiten von über 98 % erhalten werden konnten.

Die Peptide wurden auf ihre Selbstassemblierung mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS), Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie, Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie (RKM) untersucht. Aufgrund der besseren Wasserlöslichkeit wurden zunächst Alanin-haltige HLH-Peptide untersucht. Diese bildeten allerdings keine stabilen Partikel und konnten mittels Elektronenmikroskopie nicht abgebildet werden.

Peptidpartikel aus den Leucin-haltigen Peptiden wurden über zwei verschiedene Protokolle präpariert. Ausgangspunkt beider Methoden war ein Peptidfilm im Reagenzglas, der aus einer Lösung des Peptids in HFIP präpariert wurde. In der meist verwendeten Präparationsmethode wurde das Peptid durch Zugabe von EtOH zum Film resolvatisiert. Die Selbstassemblierung erfolgte nach Zugabe einer wässrigen Pufferlösung spontan. Die alternative Präparationsmethode B umfasste die Zugabe 80 °C heißen Wassers und 80 °C heißen Puffers. Die Selbstassemblierung in Peptidpartikel erfolgte unter anschließender Ultraschallbehandlung. Je nach Präparationsmethode wurden Peptidpartikel mit α -helikaler Sekundärstruktur oder β -Faltblatt-Sekundärstruktur erhalten (Abbildung 48), die unterschiedliche Morphologien aufwiesen.

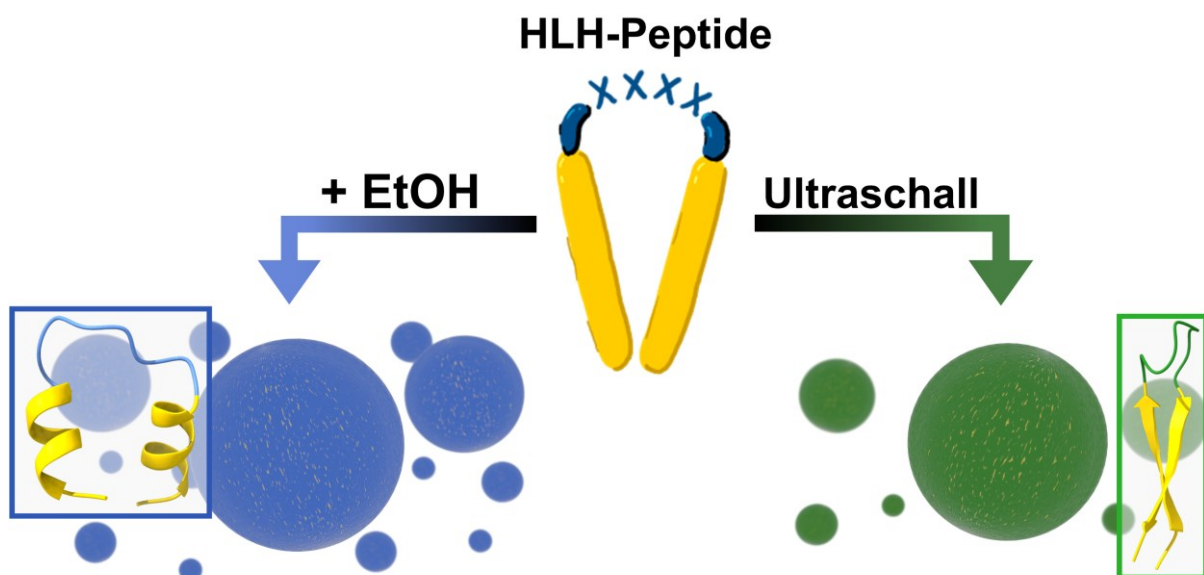


Abbildung 48. Schematische Darstellung der möglichen Sekundärstrukturen, die, je nach Präparationsmethode, aus den Leucin-Varianten der HLH-Peptide erhalten werden können. Zusatz von Ethanol führte zu α -helikaler Sekundärstruktur (blau). Ultraschall ohne Zusatz von Ethanol in wässrigem Puffer resultierte in einer β -Faltblatt-Sekundärstruktur (grün). Schematische Zeichnungen © Morten Mosbach, M.Sc. wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Schematische dreidimensionale Darstellungen der Partikel wurden mit *Blender* erstellt.

Der hohe pK_S -Wert von Arginin^[132] erlaubte Messungen der assemblierten Strukturen bei pH 3 und pH 7 ohne signifikante Änderungen der Partikelladung und einer einhergehenden Verminderung des amphiphilen Charakters. Die Partikelgrößen in Lösung konnten mittels DLS bestimmt werden. Für das α -helikale **HLHP4**-Konformer ergaben sich bei pH 3 und pH 7 Partikelgrößen zwischen 20 nm und 700 nm (Abbildung 49A). Eine Korrektur nach Anzahl erlaubte eine realistischere Darstellung der Größenverhältnisse und zeigte unter beiden Bedingungen Partikel mit Größen von überwiegend < 100 nm (Abbildung 49B). Die α -helikale Sekundärstruktur der Peptide konnte in beiden Fällen durch CD-Spektroskopie bestätigt werden (Abbildung 49C). Das Verhältnis der Minima (222 nm / 208 nm) offenbarte eine stärkere Helix-Interaktion im sauren Milieu.^[153-155]

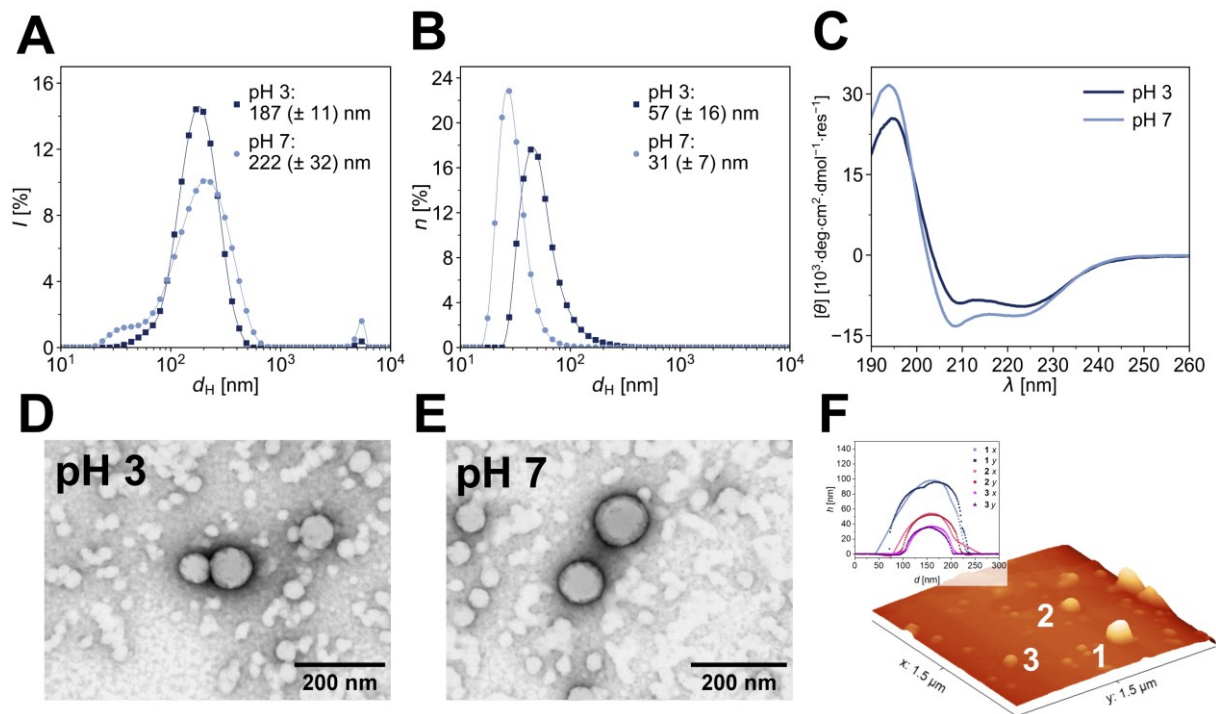


Abbildung 49. **A** Größenverteilungen der α -helikalen Partikel von **HLHP4** nach Intensität. Messungen wurden bei pH 3 (dunkelblau, 5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und pH 7 (hellblau, 5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate repräsentativer Messungen. **B** Verteilung nach Teilchenanzahl der gleichen Messungen. **C** Repräsentative CD-Spektren bei pH 3 (dunkelblau) und pH 7 (hellblau). **D**, **E** STEM-Mikrographien der α -helikalen **HLHP4**-Partikel direkt nach der Präparation bei pH 3 (**D**) und pH 7 (**E**). **F** Dreidimensionale RKM-Aufnahme (1,5 x 1,5 μm) der Peptidpartikel bei pH 7 mit zugehörigem Höhenprofil der Partikel 1-3.

Die Morphologie der Partikel wurde zunächst mittels Raster- und Transmissionselektronenspektroskopie (*scanning and transmission electron microscopy*, STEM) untersucht. Die Peptide assemblierten in sphärische Partikel, deren Durchmesser größtenteils unter 100 nm lag und damit die DLS-Messungen bestätigte (Abbildung 49D,E). Es ließen sich keine pH-spezifischen Unterschiede erkennen. Die Partikel neigten im Allgemeinen dazu, aneinander zu haften. Nach Immobilisation der Partikel auf Muskovit-Substrat konnte die dreidimensionale Struktur der Partikel mittels RKM untersucht werden (Abbildung 49F). Die Größen der Partikel korrelierten mit den Ergebnissen der STEM-

Messungen. Ein Partikelkollaps, wie er oft bei Liposomen beobachtet werden kann, konnte weder durch STEM noch RKM gezeigt werden (Abbildung 19).^[159, 162, 163] Daher ließ sich für **HLHP4**-Partikel auf eine hohe Rigidität der Außenhülle oder das Fehlen eines großen inneren Hohlraums schließen.

Die Langzeitstabilität der Partikel wurde über den Zeitraum von einer Woche beobachtet. Dabei wurden Partikelsuspensionen bei beiden pH-Werten sowohl bei 4 °C, als auch bei Raumtemperatur untersucht. Die Partikelgröße nahm durch Aggregation in unterschiedlichem Ausmaß im Laufe der Woche zu. Während es bei den Proben bei Raumtemperatur zu einer sichtbaren Aggregatbildung kam (Abbildung 70A), war der Prozess bei 4 °C deutlich verlangsamt. Die höchste Stabilität wurde bei pH 3 und Lagerung bei 4 °C beobachtet. Ebenso verlief die Aggregation der Proben bei Raumtemperatur bei pH 3 langsamer (Abbildung 20). Aggregatbildung spiegelte sich in den STEM-Mikrographien entsprechender Proben wider und bestätigte die Messungen in Lösung (z.B. Abbildung 23 oder Abbildung 24). Die Stabilitätstrends wurden mit Messungen des Zeta-Potentials bestätigt. Hier wurden Werte von $\zeta = + 30 (\pm 1)$ mV für die Partikel bei pH 3 und Werte von $\zeta = + 22 (\pm 1)$ mV für die Partikel bei pH 7 bestimmt. Ebenfalls wurde die Sekundärstruktur der Peptide über den Zeitraum der Langzeitmessung mittels CD-Spektroskopie verfolgt (Abbildung 25). Einhergehend mit der Aggregation der Peptide zeigte sich insbesondere bei den Proben bei Raumtemperatur eine deutliche Abschwächung des α -helikalen Signals zu Gunsten eines erhöhten Anteils an β -Faltblatt-Sekundärstruktur. Die Labilität der Sekundärstrukturen während der Langzeitmessung eröffnete Fragen hinsichtlich einer beschleunigten Möglichkeit zur vollständigen Umwandlung der α -helikalen in β -Faltblatt-Sekundärstrukturen. Dazu wurden Proben von **HLHP4** im CD-Spektrometer langsam auf 80 °C erhitzt (Abbildung 26). Bei beiden pH-Werten ließ sich bei etwa 50 °C eine irreversible Umwandlung der Sekundärstruktur zu β -Faltblatt feststellen, die mit einer Präzipitation des Peptids einherging. Die Resultate implizierten damit die Existenz einer zweiten temperaturabhängigen Vorzugskonformation, die sich durch Zuführen thermischer Energie erreichen ließ.

Die Möglichkeiten zur Umwandlung der Sekundärstruktur führten zu Bestrebungen einer direkten, gezielten Herstellung der β -Faltblatt-Konformere. Dies gelang durch die Entwicklung der alternativen Präparationsmethode B (s. oben). Die Größenverteilung der β -Faltblatt-Partikel war weniger breit als bei den α -helikalen Varianten und lag unter 100 nm (Abbildung 50A,B). Die β -Faltblatt-Sekundärstruktur konnte bei pH 3 bestätigt werden (Abbildung 50C). Die Untersuchung der Partikel mittels Elektronenmikroskopie zeigte eine pH-abhängige Morphologie (Abbildung 50D,E). Dabei unterschieden sich die Partikel in ihrer Morphologie deutlich von den Assemblaten des α -helikalen Konformers. Bei pH 3 zeigten die Partikel eine unregelmäßige Struktur und maßen größtenteils unter 100 nm im Durchmesser.

Die Partikel bei pH 7 wiesen hingegen eher eine Schichtstruktur auf und waren etwas größer als von den DLS-Messungen hervorgesagt.

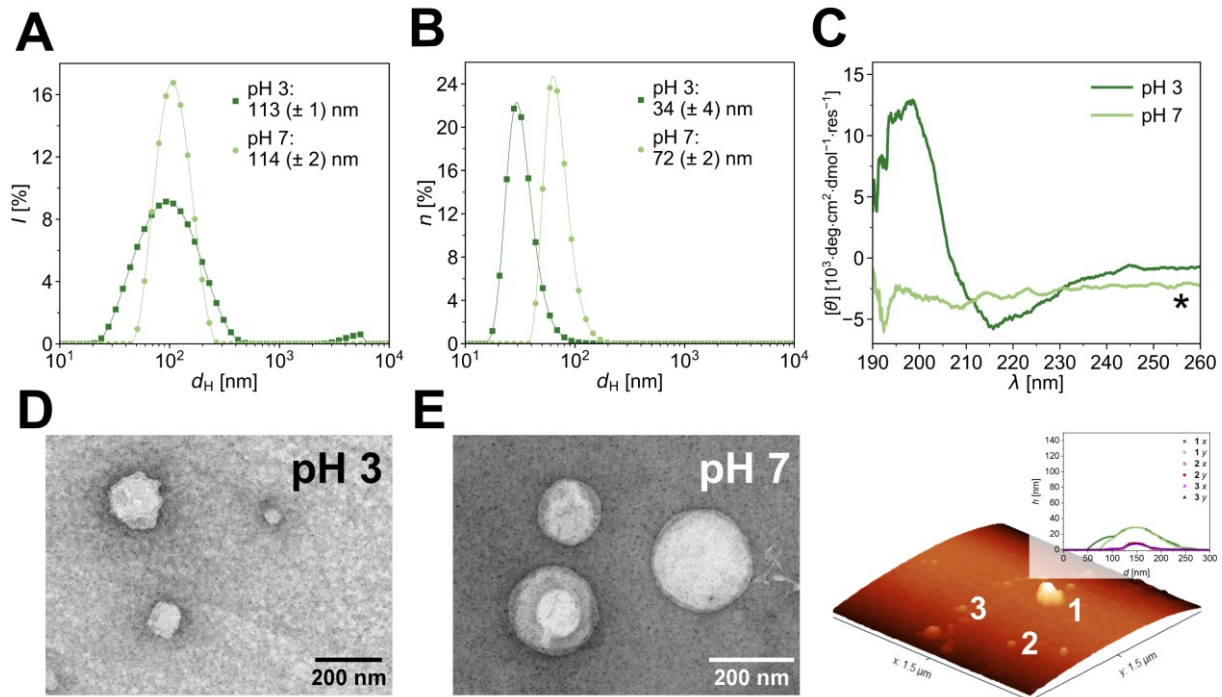


Abbildung 50. **A** Größenverteilungen der β -Faltblatt-Partikel von **HLHP4** nach Intensität. Messungen wurden bei pH 3 (dunkelgrün, 10 mM Citratpuffer) und pH 7 (hellgrün, 10 mM Citratpuffer) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate repräsentativer Messungen. **B** Verteilung nach Teilchenanzahl der gleichen Messungen. **C** Repräsentative CD-Spektren bei pH 3 (dunkelgrün, 5 mM Citratpuffer) und pH 7 (hellgrün, 5 mM Citratpuffer). *Aufgrund einer starken Lichtstreuung an den Partikeln, ließ sich bei pH 7 nur ein schwaches Signal erhalten, das keiner Sekundärstruktur zugeordnet werden konnte. **D, E** STEM-Mikrographien der β -Faltblatt-Partikel direkt nach der Präparation bei pH 3 (**D**) und pH 7 (**E**). **F** Dreidimensionale RKM-Aufnahme ($1,5 \times 1,5 \mu\text{m}$) der Peptidpartikel bei pH 7 mit zugehörigem Höhenprofil der Partikel 1-3.

Die Partikel bei pH 7 zeigten starke Neigungen zur Fusion (Abbildung 51). Dieses Verhalten stand diametral dem Charakter der α -helikalen Konformere gegenüber und veranschaulichte das Potential von **HLHP4** zur Bildung unterschiedlichster Assemblate.

Aufgrund der geringeren lateralen Auflösung ließen sich in den RKM-Aufnahmen keine pH-spezifischen Unterschiede oder Partikelfusionen erkennen (Abbildung 50F). Allerdings offenbarten die Höhenprofile bei beiden pH-Werten eine deutlich flachere Struktur als bei den Partikeln der α -helikalen Konformere (Abbildung 31). Einzelne Partikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm waren nur etwa 10 nm hoch und entsprachen damit in etwa der Länge von zwei Monomeren von **HLHP4**. Dies ließ in beiden Fällen auf die Bildung von Bicellen schließen.^[6, 60] Ein flacher Anstieg des Höhenprofils bei pH 7 untermauerte zudem die Annahme, dass die β -Faltblatt-Konformere schichtförmig assemblierten.

Bei der Beobachtung der Partikelstabilität über eine Woche zeichneten sich die β -Faltblatt-Konformere im Allgemeinen durch eine höhere Stabilität im Vergleich zu den α -helikalen Konformeren, vor allem bei Raumtemperatur, aus (Abbildung 32). Die Lagerungsbedingungen schienen in diesem Fall deutlich weniger Einfluss auf die Partikelstabilität zu haben.

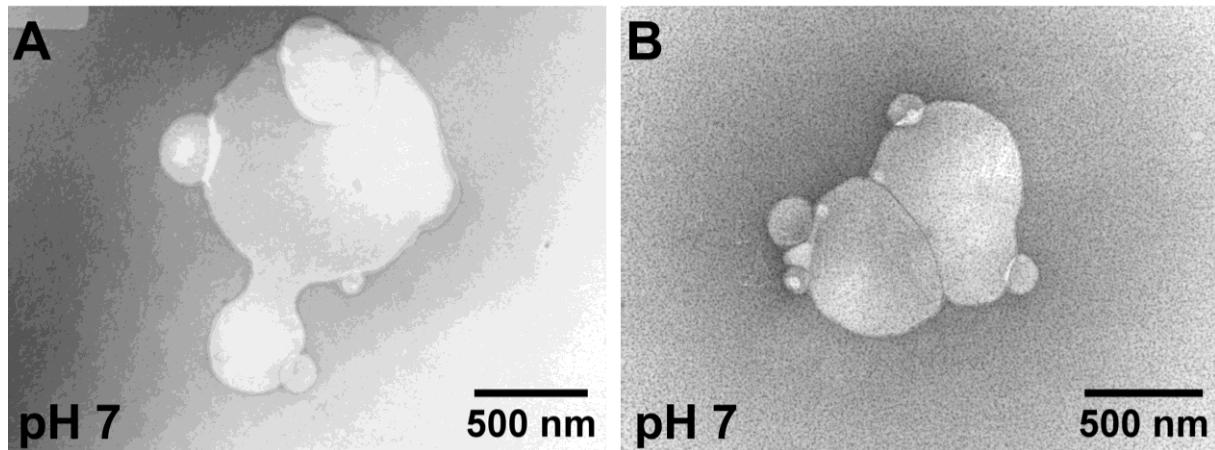


Abbildung 51. Beispiele für die Fusion der β -Faltblatt-Partikel bei pH 7 (10 mM Citratpuffer). **A** STEM-Mikrographie einer Partikelfusion nach Lagerung über 5 Tage bei Raumtemperatur. **B** STEM-Mikrographie einer Partikelfusion nach Lagerung über 5 Tage bei 4 °C.

Elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigten die Ergebnisse. Die Zunahme der Größen bei pH 7 war durch die Fusion der Partikel bedingt. Zudem deuteten die Aufnahmen auf eine später einsetzende Partikelfusion bei pH 3 hin (Abbildung 33 - Abbildung 36). Messungen des Zeta-Potentials ergaben einen Wert von $\zeta = -2 (\pm 2)$ mV bei pH 3 und unterstrichen damit die schlechte Präparierbarkeit der Peptide unter diesen Bedingungen. Im Gegensatz dazu wurde die sehr gute Handhabung bei pH 7 durch einen Zeta-Potential Wert von $\zeta = -48 (\pm 5)$ mV bestätigt.

Die Eignung der Partikel von **HLHP4** zur Encapsulierung von Molekülen wurde anhand mehrerer Versuche mit α -helikalem **HLHP4** bei pH 7 untersucht. Zunächst wurde die hydrophobe Umgebung der Peptidmembran erfolgreich durch Interkalation von Diphenylhexatrien (DPH) nachgewiesen (Abbildung 37) und die Encapsulierung des deutlich hydrophileren Esculins im Fluoreszenzmikroskop veranschaulicht (Abbildung 75). Mit Hilfe enzymatischer Reaktionen konnte zudem gezeigt werden, dass die Partikel Amplex® Red sowohl enkapsulieren als auch zurückhalten konnten (Abbildung 38).

Im Anschluss wurden Modifikationen des Helix-Loop-Helix-Motivs untersucht. Um den Einfluss ungesättigter Fettsäuren auf die Membranfluidität nachzuziehen, wurde **HLHP4.1** untersucht, in dem ein Leucin des hydrophoben Segments durch ein Prolin ersetzt wurde. Es wurden Mischungen von 2,5 mol-%, 5 mol-% und 10 mol-% **HLHP4.1** mit **HLHP4** basierend auf Protokoll B bei pH 7 untersucht, um das Fusionsverhalten der Partikel zu beobachten. In allen Fällen wurden Partikel beobachtet, deren Größen mit Zunahme des Anteils des sterisch anspruchsvolleren **HLHP4.1** zunahm (Abbildung 40A). Die Vermutung einer Abnahme der Partikelstabilität konnte ebenfalls bestätigt werden. Allerdings war der Stabilitätsverlust so groß, dass die Partikel nach einer Lagerung über Nacht bereits aggregierten (Abbildung 40B) und eine Untersuchung der Partikel mittels Elektronenmikroskopie nicht möglich war.

(Abbildung 41). Ob die Beeinflussung der Membranstabilität bei Partikeln des α -helikalen Konformers weniger stark ausfiele, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht.

Im Anschluss wurden Modifikationen der Loop-Sequenz untersucht. Mit **HLHP5** wurden die Auswirkungen einer veränderten hydrophilen Kopfgruppe, mit dem Austausch der Arginine gegen Lysine, untersucht. Bei **HLHP6** wurde die hydrophile Schleife von **HLHP4** um eine weitere Arginin-Einheit verlängert. Die Partikelgrößen- und morphologien beider Varianten waren ähnlich zu **HLHP4**. Ebenso zeigten **HLHP5** und **HLHP6** eine α -helikale Sekundärstruktur. In den Eigenschaften waren sich die Arginin-haltigen Peptide **HLHP4** und **HLHP6** untereinander ähnlicher als zu **HLHP5**. Allerdings waren beide Varianten deutlich instabiler als **HLHP4** und neigten zur Aggregation. Im Vergleich nahmen die Partikelstabilität in der Reihenfolge **HLHP4** > **HLHP6** > **HLHP5** ab. Becherförmige Strukturen der **HLHP5**-Partikel und der nicht-fusionierende Charakter aller drei Varianten deuteten auf einen vesikulären Aufbau der Peptidpartikel hin.

Im Hinblick auf ein vollständiges Verständnis der Mechanismen der Partikelstabilität wäre eine Analyse der Partikel mit computergestützten Methoden hilfreich. So könnten Wechselwirkungen der verschiedenen Modifikationen mit dem Solvens und mit benachbarten Monomeren modelliert und weitere Erkenntnisse zur Partikelstabilität abgeleitet werden. Zusätzlich sollten weitere Puffersubstanzen und deren Auswirkungen auf die Langzeitstabilität der Partikel untersucht werden. Computergestützte Untersuchung könnten ebenfalls zur Untersuchung der Sekundärstrukturumwandlung von α -Helix zu β -Faltblatt genutzt werden.^[194-196]

Untersuchungen der Membranfluidität sollten zum einen durch Analysen der α -helikalen Partikel von **HLHP4** mit verschiedenen Anteilen von **HLHP4.1** vervollständigt werden. Im RKM könnte die Aufnahme von Kraftkurven und die Analyse beider Konformere von **HLHP4** in Lösung einen weiteren Beitrag zu dieser Fragestellung leisten.^[4, 52]

Obwohl Mutmaßungen zum inneren Aufbau der Partikel angestellt wurden, konnte die Frage nicht abschließend geklärt werden. Versuche die dreidimensionale Struktur durch Konfokalmikroskopie zu erhalten, scheiterten an der Präparation großer Peptidpartikel. Der dreidimensionale Aufbau der Partikel ließe sich möglicherweise durch Cryoelektronenmikroskopie aufschlüsseln.^[197, 198]

Erstrebenswert wäre eine Erweiterung der Peptidbibliothek. Hier läge die Synthese von Peptiden mit negativ geladener Schleife nahe. Ebenfalls möglich wäre eine Verkleinerung des Motivs durch Reduktion der Anzahl der hydrophoben Aminosäuren und gleichzeitiger Verkürzung des hydrophilen Segments auf zwei oder drei Arginine.

Langfristige Ziele des Projekts könnten eine Vertiefung der bereits angedeuteten Anwendungen als Transportkapsel für Medikamente oder Mikroreaktoren für räumlich isolierte

Reaktionen sein. Die Experimente in dieser Arbeit deuteten zwar auf die Eignung der Peptide für die Aufgaben hin, waren aber nur ein erster Beweis der Machbarkeit und müssten in weiteren Studien vertieft werden. Unterstützend dazu sollte eine Möglichkeit zur Isolation der Partikel mit enkapsulierten Molekülen gefunden werden. Anpassungen der Peptidsequenz könnten ein erster Schritt in diese Richtung sein. Alternativ ließe sich der Aufbau eines komplexen artifiziellen Membransystems ins Auge fassen, wie es in Arbeiten von *Vogele et al.* bereits für Elastin-ähnliche Peptide gezeigt wurde.^[16, 199] Es wäre zudem möglich, dass auf der urzeitlichen Erde solche peptidbasierten Kompartimente entscheidend zur Evolution anderer Biomoleküle beitrugen und präsentieren damit neue Wege für die Forschung zu peptidbasierten selbstassemblierenden Strukturen.^[63, 200]

6 Experimenteller Teil

6.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Fmoc-Rink-Amid ChemMatrix®-Harz wurde von *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Fmoc-Rink-Amid TentaGel® (TG)-Harz wurde bei *Iris Biotech GmbH* (Marktredwitz, Deutschland) gekauft. Alle Standard-Fmoc-geschützten Aminosäuren sowie *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) wurden von *Iris Biotech GmbH* (Marktredwitz, Deutschland) bezogen. *N,N'*-Dimethylformamid (DMF, Peptidsynthesequalität) wurde von *Fisher Scientific* (Loughborough, Vereinigtes Königreich) bezogen. OxymaPure®, Piperidin (99 %), *N,N'*-Diisopropylethylamin (DIPEA, ≥ 99 %), Dichlormethan (DCM, ≥ 99,9 %), wasserfreies DMF (≥ 99 %), Acetonitril (MeCN, HPLC-Qualität), Methanol (MeOH, HPLC-Qualität), Ethanol (EtOH, HPLC-Qualität), Trifluoressigsäure (TFA, HPLC-Qualität), Triisopropylsilan (TIPS, 98 %), Zitronensäure-Monohydrat (99,5 %), Hellmanex® III und Natriumhydroxid-Pellets wurden bei *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) gekauft. Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (99,0 %) wurde von *Honeywell* (Seelze, Deutschland) bezogen. Pyridin (99,5 %) wurde von der *Grüssing GmbH* (Filsum, Deutschland) bezogen. Essigsäureanhydrid (≥ 99,8 %) wurde bei der *Carl Roth GmbH + Co. KG* (Karlsruhe, Deutschland) gekauft. Diethylether (≥ 99,5 %) wurde bei *Honeywell* (Seelze, Deutschland) erworben. 1,1,1,3,3,3-Hexafluoropropan-2-ol (HFIP, ≥ 99 %) wurde von *Carbolution Chemicals GmbH* (St. Ingebert, Deutschland) bezogen. Rauchende Salzsäure (36,5 – 38 %, analyt. Qualität) wurde bei *Honeywell* (Seelze, Deutschland) und rauchende Salpetersäure (65 %, Analysequalität) bei *neoFroxx GmbH* (Einhausen, Deutschland) erworben. 1-Butanol (≥ 99,5 %) wurde bei *Fisher Scientific* (Loughborough, Vereinigtes Königreich) erworben. Destilliertes Wasser wurde mit einem *Sartorius arium® mini lab* Wassersystem nochmals destilliert und sterilisiert (Reinstwasser, ddH₂O). Wasserstoffperoxid (30 %-ige Lösung) und Meerrettichperoxidase wurden von *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Amplex® UltraRed wurde von *Invitrogen®* von *Thermo Fisher Scientific* (Eugene, USA) bezogen.

1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH, 98 %) wurde bei *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) gekauft. Esculin Sesquihydrat (≥ 98 %) wurde bei *TCI* (Eschborn, Deutschland) erworben.

6.2 Software für Datenanalyse und Visualisierung

Daten wurden mit *OriginPro 2022 9.9.0.225* und *Spyder 6.0.1* verarbeitet und dargestellt. Aufnahmen aus der Lichtmikroskopie wurden mit der *Zen 3.1 blue edition* Software analysiert und mit *ImageJ 1.53t* prozessiert, um den Bildkontrast anzupassen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit *ImageJ 1.53t* bearbeitet. Dabei wurde bei jedem Bild einzeln der Kontrast angepasst und ein Maßstabsbalken in das Bild eingefügt. RKM-Aufnahmen wurden mit *Gwyddion 2.67* verarbeitet. Reaktionsschemata wurden mit *ChemDraw Professional 20.0* erstellt.

6.3 Peptid-Synthese und Aufreinigung

6.3.1 Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Alle Peptide wurden in einem Maßstab von 0,1 mmol mit einem automatisierten, mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizer (**CEM Liberty Blue HT12TM**, detaillierte Einstellungen siehe Abschnitt 6.4.12) hergestellt. Als feste Phase wurde Fmoc-Rink-Amid TentaGel®- oder ChemMatrix®-Harz verwendet. Vor der Synthese wurde das Harz (0,2 g) in *N,N'*-Dimethylformamid (DMF, 5 mL) suspendiert und für mindestens 15 Minuten quellen gelassen. Fmoc-geschützte Aminosäuren wurden eingewogen und in DMF (0,2 M) gelöst. Zur Fmoc-Entschützung wurde eine Lösung aus Piperidin in DMF (1:4 v/v) verwendet. *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) wurde in DMF (0,5 M) gelöst und diente als Aktivatorlösung. Eine Lösung von OxymaPure® (1 M) und *N,N'*-Diisopropylethylamin (DIPEA, 0,1 M) in DMF wurde als Aktivatorbase verwendet.

Nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe des Harzes wurde die erste Aminosäure durch Zugabe der Aktivatorlösungen aktiviert und an das Harz gekoppelt. Alle Aminosäuren wurden ausnahmslos doppelt gekuppelt, sodass der Kupplungsschritt bei jeder Aminosäure zweimal erfolgte. Anschließend wurde die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe der zuletzt gekoppelten Aminosäure unter Zugabe der Piperidin-Lösung entschützt und die nachfolgende Aminosäure bei Zugabe der Aktivatorlösungen gekoppelt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis das Peptid vollständig auf dem Harz aufgebaut war. Eine detaillierte Prozessübersicht lässt sich den Tabellen in Kapitel 6.4.12 entnehmen.

Nach der Synthese wurde das mit Peptid beladene Harz in einen Spritzenreaktor (20 mL) mit PE-Fritte überführt und mit DMF (6 x 5 mL) gewaschen. Zur *N*-terminalen Acetylierung wurde eine Mischung aus Essigsäureanhydrid (0,5 mL) und Pyridin (4,5 mL) für 10 Minuten mit dem Harz bei Raumtemperatur äquilibriert, die Lösung verworfen und das Harz anschließend mit DMF (6 x 5 mL) und DCM (6 x 5 mL) gewaschen. Das beladene Harz wurde über Nacht unter vermindertem Druck getrocknet.

6.3.2 Abspaltung der Peptide

Eine Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA, 8,5 mL), Triisopropylsilan (TIPS, 1,0 mL) und Reinstwasser (0,5 mL) wurde in den Spritzenreaktor mit dem getrockneten Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde vier Stunden auf einer Schüttelplatte bei Raumtemperatur äquilibriert. Die Lösung wurde anschließend in einem Falcontube (50 mL) gesammelt und das Harz mit TFA (3 x 5 mL) gewaschen. TFA wurde im Stickstoffstrom entfernt. Das Peptid wurde mit eiskaltem Diethylether (25 mL) ausgefällt und durch Zentrifugation (4000 U/min für 10 Minuten bei Raumtemperatur) isoliert. Der Überstand wurde dekantiert und das erhaltene Peptidpellet mit eiskaltem Diethylether (4 °C, 2 x 25 mL) gewaschen. Der Ether wurde 30 Minuten unter vermindertem Druck entfernt. Alle Peptide wurden durch Zugabe von 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP, 5 mL) gelöst. Nachdem das Peptid vollständig gelöst war, wurden 20 – 25 mL Reinstwasser hinzugefügt. Die Lösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und an einem **Christ Alpha 2-4-LDplus**-Gefriertrockner lyophilisiert.

6.3.3 Aufreinigung der Peptide

Die Peptide wurden unter Verwendung einer Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bei einer Flussrate von 3 mL/min und 50 °C aufgereinigt. Es wurde ein semi-präparatives HPLC-Chromatographiesystem von **Jasco** verwendet, bestehend aus einer *PU-4180* RHPLC-Pumpe, einem *CO-4060* Säulentermostat und einem *UV-4070* Detektor. Die Signale wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 220$ nm verfolgt.

Das lyophilisierte Peptid wurde in Portionen (2 – 3 mg) in 2 mL-Reaktionsgefäße eingewogen und mit HFIP (100 μ L) versetzt. Diese Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur äquilibriert.

Alanin-haltige Peptide wurden anschließend wie folgt präpariert: Zu der HFIP-Lösung wurde Reinstwasser (520 μ L), Essigsäure (380 μ L) und erneut Reinstwasser (1000 μ L) gegeben. Diese Mischung wurde durch einen H-PTFE-Spritzenfilter (0,2 μ m) von **Macherey-Nagel** filtriert. Als Säule wurde zunächst eine **VDS optilab VDSpher® OptiBio PUR 300 C18-SE** (250 mm x 10 mm, 300 Å, 5 μ m) verwendet. In diesem Fall wurde ein linearer Gradient von MeCN + 0,1 % TFA (Puffer B) in ddH₂O + 0,1 % TFA (Puffer A) verwendet (Einzelheiten siehe Tabelle 9). Später wurde eine **VDS optilab VDSpher® OptiBio PUR 300 C4-V-E** (250 mm x 10 mm, 300 Å, 5 μ m) Säule mit MeOH + 0,1 % TFA (Puffer C) in ddH₂O + 0,1 % TFA (Puffer A) als Laufmittel verwendet (Einzelheiten siehe Tabelle 9).

In beiden Fällen wurde das Peptid in nicht bindender Plastikware aufgefangen (5 mL Gefäße) und mit Reinstwasser auf 4 mL aufgefüllt. Anschließend wurden die Gefäße bis zum Ende des Tages in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Behältnisse aus mehreren Durchläufen gemeinsam gefriergetrocknet.

Proben der Leucin-haltigen Peptide wurden wie folgt aufgereinigt: Zu der HFIP-Lösung wurde ddH₂O (380 µL) hinzugegeben, gefolgt von Essigsäure (320 µL) und MeOH + 0,1 % TFA (1200 µL). Wichtig war hierbei die Lösung erst nach Zugabe der Essigsäure zu vortexen, da leichte Präzipitation auftrat. Konnte diese nach der Vermischung der Lösung nicht vollständig aufgelöst werden, wurde noch etwas mehr Essigsäure zugegeben. Diese Mischung wurde durch einen H-PTFE-Spritzenfilter (0,2 µm) von **Macherey-Nagel** filtriert. Zur Aufreinigung der Rohpeptidlösung wurde eine **VDS optilab VDSpher® OptiBio PUR 300 C4-V-E** (250 mm x 10 mm, 300 Å, 5 µm) Säule und ein linearer Gradient von MeOH + 0,1 % TFA (Puffer C) in ddH₂O + 0,1 % TFA (Puffer A) verwendet (Einzelheiten siehe Tabelle 9). Das Peptid wurde in nicht bindender Plastikware aufgefangen (5 mL Gefäße) und mit Reinstwasser auf 4 mL aufgefüllt. Anschließend wurden die Gefäße bis zum Ende des Tages in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Behältnisse aus mehreren Durchläufen gemeinsam gefriergetrocknet.

Die analytische HPLC wurde mit einem **Hitachi Primaide** Chromatographiesystem durchgeführt, bestehend aus einer 1110 Pumpe, einem 1210 Autosampler, einem 1310 Säulenofen und einem 1430 Diodearray Detektor auf einer **VDS optilab VDSpher® OptiBio PUR 300 C18-SE** (250 mm x 4,6 mm, 300 Å, 5 µm) oder **VDS optilab VDSpher® OptiBio PUR 300 C4-V-E** (250 mm x 4,6 mm, 300 Å, 5 µm) Säule bei einer Flussrate von 1 mL/min und 50 °C Ofentemperatur. Die Chromatogramme wurden in einem Bereich von 190 nm bis 400 nm aufgenommen. Details zu den analytischen Gradienten sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 8. Gradienten für die präparative und analytische Aufreinigung der Alanin-Varianten.

präparative Aufreinigung	Äquilibration	linearer Gradient	Waschen	Re-Äquilibration
Zeit / min	0 → 5	5 → 45	46 → 51	52 → 59
% MeCN in Wasser (+ 0.1% TFA)	10%	10 – 40%	100%	10%
Zeit / min	0 → 5	5 → 45	46 → 56	57 → 65
% MeOH in Wasser (+ 0.1% TFA)	20%	20 – 60%	100%	20%

analytische Aufreinigung	Äquilibration	linearer Gradient	Waschen	Re-Äquilibration
Zeit / min	0 → 5	5 → 35	36 → 41	42 → 50
% MeCN in Wasser (+ 0.1% TFA)	10%	10 – 40%	100%	10%

Tabelle 9. Gradienten für die präparative und analytische Aufreinigung der Leucin-Varianten.

präparative Aufreinigung	Äquilibration	linearer Gradient	Waschen	Re-Äquilibration
Zeit / min	0 → 5	5 → 45	45 → 56	57 → 65
% MeOH in Wasser (+ 0.1% TFA)	60%	60 – 100%	100%	60%

analytische Aufreinigung	Äquilibration	linearer Gradient	Waschen	Re-Äquilibration
Zeit / min	0 → 5	5 → 35	35 → 41	42 → 50
% MeOH in Wasser (+ 0.1% TFA)	60%	60 – 100%	100%	60%

6.3.4 Massenanalyse

Die Reinheit der Peptide wurde ebenfalls mit MALDI-TOF Massenspektrometrie überprüft. Dazu wurde das aufgereinigte Peptid in HFIP (1 µL) gelöst und mit α -cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (α -CHCA) Lösung (1 µL, gesättigte Lösung in MeCN/ddH₂O (1:1)) co-kristallisiert. Die Messung wurde an einem **Bruker Autoflex Speed** Massenspektrometer durchgeführt.

6.4 Biophysikalische Analyse

Für alle biophysikalischen Analysen wurde durchgehend nicht bindende Plastikware für alle Pipettenspitzen und Aufbewahrungsgefäße verwendet, die mit dem Peptid in Kontakt kamen.

6.4.1 Herstellung der Peptidfilme

Das lyophilisierte Peptid wurde in HFIP (1 mL, (Volumen für 10 – 12 HPLC-Fractionen)) gelöst. Nach zwei Stunden Äquilibration bei Raumtemperatur wurde die Peptidlösung durch einen 0,2 µm H-PTFE-Spritzenfilter von **Macherey-Nagel** in ein Reagiergefäß (2 mL) aus nicht bindender Plastikware filtriert. Der Spritzenfilter wurde zuvor durch Filtration von reinem HFIP (500 µL) gereinigt und befeuchtet. Die Peptidkonzentration wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie bei 214 nm nach der Methode von *Kuipers* und *Gruppen* bestimmt.^[145] Die Extinktionskoeffizienten aller Peptide sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10. Übersicht der Extinktionskoeffizienten aller Peptide in dieser Arbeit bei 214 nm.

Peptid	Molarer Extinktionskoeffizient ϵ bei 214 nm [M ⁻¹ cm ⁻¹]
HLHP1	24726
HLHP1.1	27369
HLHP2	25751
HLHP2.1	28394
HLHP3	26776
HLHP3.1	29419
HLHP4	27010
HLHP4.1	29640
HLHP5	26776
HLHP6	28035

Die UV/Vis-Absorptionsmessungen wurden mit einem **Implen** Nanophotometer *NP80* oder *C40* in einer Quarzglasküvette von **Hellma Analytix** mit einer optischen Weglänge von 10 mm durchgeführt. Detailliertere Messparameter sind in Tabelle 11 angegeben.

Auf eine Blindmessung mit HFIP (200 µL) folgten mindestens zwei Messungen der Probe (je 200 µL, 10 µL oder 20 µL Peptidstammlösung mit HFIP verdünnt) bis zur Stabilisierung der Werte. Im Anschluss wurden die Probenmessungen gemittelt. Die Konzentration der Peptidlösung c wurde unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet (Gl. 1).

$$c = \frac{A}{\epsilon d} \quad (\text{Gl. 1})$$

Dabei bezeichnet A die Absorption der Lösung mit dem Extinktionskoeffizienten ϵ in einer Küvette der Weglänge d . Die Küvette wurde nach jeder Messung mit einer wässrigen

Hellmanex® III-Lösung (3 x), Reinstwasser (7 x) und Isopropanol (3 x) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Falls in den Blindmessung eine Verunreinigung der Küvette festgestellt wurde, wurde die Küvette nochmals mit rauchender Salpetersäure gespült, mit Reinstwasser (7 x) nachgewaschen und das obige Waschprotokoll wiederholt.

Kleine Glasreagenzgläser (**VWR test tubes soda glass**, 75x12x0,5-0,6 mm) wurden mit rauchender Salzsäure (je ~ 1 mL, 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur), ddH₂O (7 x) und Isopropanol (3 x) gereinigt und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Peptidlösung wurde direkt im Anschluss in Aliquots von 15 nmol oder 30 nmol (doppelter Ansatz) in die gereinigten Reagenzgläser überführt. Das Lösungsmittel wurde für 15 Minuten bei 40 °C in einem schwachen Stickstoffstrom entfernt. Reste des Lösungsmittels wurden bei 50 °C über Nacht im Vakuum entfernt. Die Reagenzgläser wurden mit Parafilm® verschlossen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 11. Detaillierte Messparameter der UV/Vis Absorptionsmessungen.

Parameter	Wert
Heizen	aus
Basislinienkorrektur	bei 750 nm
Glättung	aus
manuelle Verdünnung	aus

6.4.2 Puffer Herstellung

Puffer-Stammlösungen wurden durch Auflösen von Zitronensäure-Monohydrat oder Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat in Reinstwasser (50 mL Becherglas) mit einer Zielkonzentration von 100 mM (bei 100 mL Gesamtvolumen) hergestellt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Natriumhydroxidlösung (1 M) auf entweder pH 3 oder pH 7 eingestellt. Dabei sollte die Lösung nicht gerührt werden und die pH-Elektrode frei in der Lösung hängen. Es wurde ein pH-Meter *HI 2210* von **Hanna Instruments** verwendet. Die Lösung wurde mit Hilfe eines Glastrichters in einen Maßkolben überführt. Das Becherglas wurde mit Reinstwasser (3 x) nachgewaschen und der Maßkolben anschließend mit Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 100 mL aufgefüllt. Der Puffer wurde dann über einen Celluloseacetat Filter von **Sartorius** (Porengröße 0,2 µm) unter Verwendung einer **ThermoScientific Nalgene Bottle Top Filter Unit** filtriert und entgast (20 Minuten bei 150 mbar). Der entgaste Puffer wurde im Anschluss in ein Falcontube (50 mL) überführt und entweder bei Raumtemperatur oder bei 4 °C gelagert. Bei einer Lagerung bei Raumtemperatur wurde die Pufferlösung nach vier Wochen erneuert.

6.4.3 Präparation der Peptidpartikel

Zur Herstellung der Peptidpartikel wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, die zu unterschiedlichen Sekundärstrukturen in den Assemblaten führten.

a) **α -helikale Partikel:** Ethanol, Wasser (je 2 Minuten bei 10 mbar) und Pufferlösungen (zuvor beschrieben) wurden vor der Partikelpräparation im Vakuum entgast. Ethanol (10 μ L, 25 °C) wurde bei Raumtemperatur (RT) zu dem Peptidfilm gegeben. Der Film wurde durch kurzes Vortexen vollständig in Ethanol gelöst. Filmreste konnten durch leichtes Klopfen und Schwenken des Reagenzglas gelöst werden. Für pH 3 wurde eine Lösung von 10 mM Citratpuffer (190 μ L, RT) hinzugegeben. Für pH 7 wurde eine Lösung von 1 mM Phosphatpuffer (190 μ L, RT) hinzugegeben. Die Zugabe der Pufferlösung erfolgte in einer kontanten Geschwindigkeit unter leichtem Schwenken des Reagenzglas. Die Lösung wurde kurz durchmischt und anschließend in ein nicht-bindendes Reagiergefäß (1,5 mL) überführt und mit einer Lösung aus 5 % EtOH im entsprechenden Puffer (200 μ L) verdünnt. Für die Amplex® Red Assays wurde keine Verdünnung vorgenommen.

b) **β -Faltblatt-Partikel (Protokoll B):** Reinstwasser (180 μ L, 80 °C) wurde bei Raumtemperatur auf den Peptidfilm gegeben. Das Reagenzglas wurde vorsichtig geschüttelt und 100 mM Citratpuffer (pH 3 oder pH 7, 20 μ L, 80 °C) in konstanter Geschwindigkeit hinzugegeben. Die Lösung wurde kurz gevortext und dann in ein nicht-bindendes Reagiergefäß (1,5 mL) überführt. Das Gefäß wurde für 35 Minuten in 5 Minuten-Intervallen bei 80 °C mit einem **Bandelin Sonopuls 4200** mit einem *BR 30 Cup Booster* bei 25 % konstanter Amplitude beschallt. Das Wasser im Wasserbad des Ultraschallgeräts wurde alle 5 Minuten mit frischem destilliertem Wasser (80 °C) ausgetauscht.

6.4.4 Dynamische Lichtstreuung

Die Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wurden mit einem **Malvern Zetasizer Advance Ultra Red** durchgeführt. Die detaillierten Messparameter sind in Tabelle 12 aufgeführt.

100 μ L der Lösung des assemblierten Peptids wurden in eine Einweg UV-Küvette (**Brandt UV-Küvetten micro**, Zentrumshöhe 8,5 mm) überführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Küvette immer in gleicher Orientierung in das Gerät gestellt wurde. Die Proben wurden vor der Messung für 60 Sekunden äquilibriert. Je Probe wurden drei Messungen durchgeführt. Es wurde entweder die Intensitätsverteilung oder die Verteilung nach Anzahl verwendet, die von der Software unter Verwendung der Standardparameter extrapoliert wurde. Für die Datenanalyse wurde der Durchschnitt jedes Triplikats gebildet und diese Punkte grafisch dargestellt. Die x-Achse des Diagramms ist dabei logarithmisch zu skalieren. In den Diagrammen wurden die intensitätsgewichteten Mittelwerte für die Hauptspezies jedes

Triplikats zusammen mit deren Standardabweichung angegeben, wie sie von der ZS Explorer-Software berechnet wurden.

Die Viskosität des Ethanol/Wasser-Gemisches wurden über das Berechnungstool der *Zetasizer Software 7.12* von **Malvern Instruments Ltd.** auf $\eta = 1,0606 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ berechnet.

Tabelle 12. allgemeine Einstellungen für DLS-Messungen mit dem Zetasizer Advance Ultra Red. Soweit nicht anders vermerkt, wurden keine Filter verwendet.

Parameter	Wert
Streuwinkel	173°
Material	Protein
Dispergens	Wasser oder 5 % EtOH in Wasser
Temperatur	25 °C
Äquilibrationszeit	60 Sekunden
Analysemethode	General
Attenuation	Auto
Anzahl der Durchläufe	Auto
Laufzeit	Auto
Anzahl der Wiederholungen	3

6.4.5 Zeta-Potential Messungen

Ethanol und Reinstwasser wurden jeweils zwei Minuten bei vermindertem Druck (10 mbar) unter kräftigem Rühren entgast. Die daraus angesetzten Pufferlösungen wurden nochmals mit einem **VWR** Ultraschallbad *USC-T* für 30 Minuten entgast. Damit sollten Abweichungen durch Gasblasenbildung des Alkohol/Wasser-Gemisches verhindert werden.^[170] Um das Protokoll konsistent zu halten, wurden auch reine Pufferlösungen nochmals für 30 Minuten entgast. Die Peptidpartikel wurden wie oben beschrieben mit den entgasten Puffern hergestellt. Anschließend wurde zunächst eine DLS-Messung (wie oben beschrieben) durchgeführt, um die Probenqualität zu beurteilen.

Für die Messung des Zeta-Potentials wurde eine Küvette *DTS 1070* (Mehrfachverwendung möglich) von **Malvern Panalytical** mit Reinstwasser (800 μL) und entgaster Pufferlösung (2 x 400 μL) gespült. Für die Messung wurde die Technik der *diffusion barrier* angewandt: 750 μL der entgasten Pufferlösung wurden in die Küvette pipettiert und mit 50 μL der Peptidlösung unterschichtet. Dafür wurden Gelbeladungsspitzen von **Sorenson BioScience Inc.** (MultiFlex Round Tips, 83 mm Länge) verwendet.

Eine Zeta-Potential-Messung bestand aus mehreren Teilmessungen. Zuerst wurden drei Größenmessungen durchgeführt, auf die fünf Zeta-Potential-Messungen folgten. Die Messung wurde mit einem weiteren Triplikat der Größenmessung abgeschlossen, um mögliche

Veränderungen der Partikel durch die angelegte Spannung beobachten zu können. Die Küvette wurde im Anschluss gründlich mit Reinstwasser und *Isopropanol* gespült und über Nacht an Luft getrocknet.

Für alle Größenmessungen wurden die Parameter aus Tabelle 12 verwendet. Die Parameter für die Zeta-Potential-Messungen sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die Werte der Dielektrizitätskonstanten der Alkohol/Wasser-Gemische wurden aus Literaturwerten berechnet.^[201-203]

Tabelle 13. Einstellungen für die Zeta-Potential-Messungen am *Zetasizer Advance Ultra Red*.

Parameter	Wert
Material	Protein
Dispergens	Wasser oder 5 % EtOH in Wasser
Temperatur	25 °C
Äquilibrationszeit	30 Sekunden
Analysemethode	Monomodal
Attenuation	Auto
Anzahl der Durchläufe	minimum: 35, maximum: 40
Spannung	150 V
Pause zwischen den Wiederholungen	240 s
Anzahl der Wiederholungen	5

Die Zeta-Potential-Werte wurden als Mittelwerte von 2 x 5 Messungen mit den Standardabweichungen angegeben, wie sie vom Gerät berechnet wurden.

6.4.6 Circular dichroismus-Spektroskopie

Circular dichroismus-Spektren (CD-Spektren) wurden mit dem Spektropolarimeter **Jasco J-1500** aufgezeichnet. Während der Benutzung wurde das Gerät konstant mit einem Stickstoffstrom (10 L/min) gespült. Es wurden Quarzküvetten mit einer optischen Weglänge von 1 mm oder 5 mm von **Starna Scientific** verwendet. Diese wurden vor der ersten Messung zuerst mit rauchender Salpetersäure (10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur) und anschließend mit Reinstwasser (7 x) gespült. Danach wurde die Küvette mit Hellmanex® III-Lösung (3 x), Reinstwasser (7 x) und *Isopropanol* (3 x) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 185 nm bis 260 nm aufgezeichnet. Die Messparameter sind in Tabelle 14 aufgeführt. Es wurde zuerst eine Blindmessung mit Pufferlösung und anschließend die Probenmessung durchgeführt. Je Messung wurde ein Gesamtvolumen von 200 µL Lösung für die Küvette mit 1 mm Weglänge benutzt. Die CD-Spektren der β -Faltblatt-Konformere wurden mit 1 mL Lösung in der

Quarzküvette mit einer Weglänge von 5 mm gemessen. In diesem Fall wurden 30 Akkumulationen mit einer D.I.T. von 4 Sekunden bei einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min verwendet.

Schmelzkurven wurden bei Wellenlängen von 208 nm – 209 nm (Minimum der α -Helix) in einem Bereich von 0 °C bis 80 °C bei einer Heizrate von 1 °C/min erfasst. Gleichzeitig wurden alle 5 °C (beginnend bei 0 °C) zehn CD-Spektren akkumuliert, um die Änderung der Sekundärstruktur zu visualisieren (Parameter siehe Tabelle 14). Nach der Messung wurde die Lösung schnell auf 25 °C abgekühlt und ein weiterer Satz von zehn CD-Spektren gemessen. Messungen über 24 Stunden wurden unter Verwendung der Parameter aus Tabelle 14 durchgeführt. Nach einer Blind- und Einzelspektrum-Messung folgte eine Reihe von zeitgesteuerten Spektrum-Messungen in 30-Minuten Intervallen über 24 Stunden. Bei jeder Spektrum-Messung wurde über 10 Messungen akkumuliert.

Aus den zehn akkumulierten Messungen wurde der Mittelwert gebildet und dieser verwendet. Für die Datenauswertung wurde davon zunächst die Blindmessung subtrahiert. Anschließend wurde das CD-Signal in Milligrad (*mdeg*) unter Verwendung der folgenden Gleichung in die *mean residue ellipticity* $[\theta]$ umgewandelt (Gl. 2):^[148]

$$[\theta] = \frac{mdeg}{d \cdot c \cdot n} \quad (\text{Gl. 2})$$

d beschreibt die Weglänge der Küvette in Millimeter, c ist die Proteinkonzentration in mol · L⁻¹ und n die Anzahl der Peptidbindungen.

Tabelle 14. Einstellungen für die Messungen von CD-Spektren am **Jasco** CD Spectropolarimeter.

Parameter	Wert
Datenabstand	0,1 nm
D.I.T.	2 Sekunden
Bandbreite	1 nm
Scanmodus	kontinuierlich
Scangeschwindigkeit	100 nm·min ⁻¹
Akkumulationen	10
Temperatur	25 °C

Nach Abschluss der Messungen wurde die Küvette wieder mit rauchender Salpetersäure (10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur), Reinstwasser (7 x), Hellmanex® III (3 x), Reinstwasser (7 x) und Isopropanol (3 x) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

6.4.7 Elektronenmikroskopie

Als Substrat für die Elektronenmikroskopie wurden hexagonale Kupfergrids mit einer Maschengröße von 300 Ångstrom und einer Schicht aus 5–6 nm Formvar mit 1 nm Kohlenstoff von **Science Services** verwendet. Die Substrate wurden 30 Sekunden lang mit Luftplasma (**Diener Electronic, Zepto**, 50 sccm Fluss, 15 % Generator) behandelt. Die Partikellösung (3 µL) wurde mit der Pipette auf das Substrat aufgetragen und 2,5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem Filterpapier entfernt. Das Grid wurde mit Reinstwasser (5 x 3 µL) gewaschen und anschließend mit Uranylacetat (2 x 3 µL, 1 % (w/v) in Reinstwasser, jeweils 45 Sekunden Inkubation, **Science Services**) nachkontrastiert. Die Probe wurde für einige Minuten an Luft getrocknet und entweder direkt analysiert oder bis zur Mikroskopie unter Vakuum gelagert.

Die Proben wurden mit einem **Zeiss Ultra 55** Feldemission-Rasterelektronenmikroskop mit STEM-Modul bei einer Primärelektronenenergie von 20 keV untersucht. Es wurde folgende Segmentkonfiguration beim STEM-Detektor verwendet: S1 aus, S2 invertiert und S3 ein.

Die Bilder wurden mit *ImageJ 1.53t* bearbeitet, um den Kontrast anzupassen und einen Maßstabsbalken einzufügen.

6.4.8 Fluoreszenzmikroskopie

Fluorogene Proben wurden wie zuvor beschrieben auf Kupfergrids fixiert. In diesem Fall wurde keine Nachkontrastierung durchgeführt und die Proben wurden nach dem Waschen direkt mit einem **Zeiss Axio Imager Z2m**, mit *Axiocam 503* Farbkamera, analysiert. Für die Anregung der Farbstoffe wurde eine *Colibri 7* LED-Leuchte verwendet. Die Substrate wurden auf einem Glasobjektträger aufgelegt, der zuvor mit *Isopropanol* gereinigt worden war. Alle Bilder wurden im Transmissionsmodus mit einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Die Bilder wurden mit *ImageJ 1.53t* nachbearbeitet, um den Kontrast anzupassen.

6.4.9 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden mit einem **Jasco FP-8500** Spektralfluorometer aufgezeichnet. Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 370 nm bis 500 nm bei Raumtemperatur gemessen. Die Messparameter sind in Tabelle 15 aufgeführt. Es wurde eine Quarzglasküvette von **Hellma Analytics** mit zusätzlichem seitlichem Fenster und einer Schichtdicke von 10 mm verwendet.

Die Peptidpartikel wurden wie zuvor beschrieben hergestellt. 3 µL einer Lösung von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH, 200 µM in DMSO) wurden zu 297 µL der Peptidpartikellösung gegeben und 1 Stunde lang unter Ausschluss von Licht inkubiert.

Eine Blindprobe wurde unter Verwendung einer Pufferlösung (300 µl des entsprechenden Puffers) vorbereitet und vermessen. Ein Negativtest wurde unter Verwendung einer DPH-Lösung in Puffer (2 µM in Puffer, 300 µL) durchgeführt.

Tabelle 15. Einstellungen für fluoreszenzspektroskopische Messungen am **Jasco** Spectrofluorometer.

Parameter	Wert
Bandbreite (Anregung)	5 nm
Bandbreite (Emission)	5 nm
Responsivität	0,1 sek
Datenintervall	1 nm
Wellenlänge (Anregung)	350 nm
Scangeschwindigkeit	100 nm·min ⁻¹
Filter	aus

Nach Abschluss der Messungen wurde die Küvette mit rauchender Salpetersäure (10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur), Reinstwasser (7 x), Hellmanex® III (3 x), Reinstwasser (7 x) und *Isopropanol* (3 x) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

6.4.10 Rasterkraftmikroskopie

Die Peptidpartikellösung wurde wie oben beschrieben hergestellt. Als Substrat wurden Muskovitschieben (*Mica*, V1 Qualität, rund, 9,5 mm, **Science Services**) verwendet. Diese wurden vor Applikation der Probe frisch gespalten, indem mit einem Tesafilm die oberste Schicht der Scheibe abgenommen wurde. Dieser Prozess wurde mit frischem Tesafilm so lange wiederholt, bis sichtbar eine ebene Fläche ohne Vereinigungen vorlag. Darauf wurden sofort 3 µL der Peptidpartikellösung getropft. Die Probe wurde 2,5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier abgenommen. Das Substrat wurde mit Reinstwasser (4 x 3 µL) gewaschen und an Luft getrocknet. Die Proben wurden über Nacht unter Vakuum gelagert.

Für die Messung wurde das Substrat auf einen frisch gereinigten Glasobjektträger (*Isopropanol*) aufgelegt. Die Daten wurden im intermittierenden Modus (*tapping mode*) an einem *Jupiter XR* von **Oxford Instruments** mit *TRACK 60* Cantilevern (**Oxford Instruments**) aufgenommen. Der Cantilever wurde langsam an die Probe angenähert, indem zuerst ein Spannungswert mit 80 % der freien Amplitude angelegt wurde und der Sollwert langsam verringert wurde, bis gerade so ein Signal aufgenommen werden konnte. Die Bilder wurden mit *Gwyddion 2.67* bearbeitet. Dabei wurden die Daten zunächst durch eine *mean plane subtraction* nivelliert, der minimale Höhenwert auf 0 nm gesetzt und, falls nötig, der Kontrast angepasst. Beim Exportieren der Grafiken wurde noch ein Maßstabsbalken eingefügt.

6.4.11 Amplex® Red Assay

Der Assay wurde an einem **Implen** Nanophotometer *NP80* oder *C40* durchgeführt. Die Geräteparameter sind in Tabelle 11 aufgeführt. Stammlösungen von Meerrettichperoxidase (HRP, 21,7 μM) und Wasserstoffperoxid (132 μM) wurden als Lösungen in [5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer (pH 7)] angesetzt. Die Konzentration von HRP wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie mit Hilfe der Nanodrop-Funktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 403 \text{ nm}$ bestimmt (Geräteeinstellungen siehe Tabelle 11).

Amplex® UltraRed (1 mg) wurde in EtOH gelöst und Aliquots (10 mM) mit je 10 μL Volumen vorbereitet. Die Aliquots wurden unter Stickstoffatmosphäre präpariert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Ausschluss von Licht gelagert. Je Assay wurde ein Aliquot verwendet und mit EtOH auf 66 μM verdünnt. Der Assay wurde in Einweg-UV-Küvetten (**Brandt** *UV-Küvetten micro*, Zentrumshöhe 8,5 mm) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 568 \text{ nm}$ durchgeführt. Für alle Experimente wurde ein Gesamtvolumen von $V = 110,11 \mu\text{L}$ verwendet.

Zunächst wurde eine Blindprobe einschließlich Puffer, HRP und Wasserstoffperoxid vermessen. Dazu wurden die Lösungen in die Küvette gegeben und durch mehrfaches Pipettieren vermischt. Anschließend wurde eine Referenzreaktion zur Nachverfolgung der Umwandlung des freien Substrats durchgeführt. Für die Referenzreaktion wurden nochmals 10 μL Amplex® UltraRed mit 190 μL Assay-Puffer verdünnt (3,3 μM Endkonzentration). 100 μL dieser Mischung wurden für den Assay verwendet. Um die gleiche Endkonzentration zu erhalten, wurden für die Einkapselung/interne Zugabe von Amplex® UltraRed statt reinem Ethanol, 10 μL der verdünnten Stammlösung (66 μM) von Amplex® UltraRed in EtOH verwendet, um den Peptidfilm aufzulösen. Für die externe Zugabe von Amplex® UltraRed wurde die Partikellösung wie in 6.4.3 beschrieben hergestellt. In beiden Fällen wurde die fertige Partikellösung zuerst im DLS analysiert, um die Probenqualität zu beurteilen. Die Mischungen wurden zunächst durch Zugabe aller Lösungen außer Wasserstoffperoxid in die UV-Küvette angesetzt und deren Absorption für 2 Minuten verfolgt, bevor Wasserstoffperoxid zugegeben wurde. Der Reaktionsverlauf wurde für insgesamt 5 Minuten verfolgt. Eine Übersicht über die jeweiligen Volumina ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16. Pipettierschema für den Amplex® UltraRed Assay.

Probe	Puffer (5% EtOH in Puffer) [μL]	Peptidlösung [μL]	HRP [μL]	Amplex® Red [μL]	2 Min. →
					H_2O_2 [μL]
Blind	100	---	5,11	---	5
Referenz	100	---	5,11	im Puffer enthalten	5
intern	---	100	5,11	in der Peptidlösung enthalten	5
extern	---	95	5,11	5	5

6.4.12 Einstellungen des Peptidsynthesizers

In den nachfolgenden Tabellen sind die detaillierten Einstellungen für die Festphasenpeptidsynthese (**CEM Liberty Blue**) aufgelistet. Alle Peptide wurden nach dem gleichen Protokoll hergestellt. Dieses beinhaltet Doppelkupplungen für alle Aminosäuren bei einer Kupplungstemperatur von 105 °C außer für Arginin, das bei 90 °C gekuppelt wurde.

Tabelle 17. Einstellungen für das Schwellen des Harzes.

Operation	Werte
1 Schwellen	Lösungsmittelvolumen: 15 mL, Zeit: 300 s

Tabelle 18. Einstellungen für das Doppelkupplungsprotokoll für alle Aminosäuren (außer Arginin).

Operation	Werte
1 Entschützung	Methode: Standard Entschützung, Volumen der Entschützungslösung: 4 mL
2 Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 10 s
3 Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s
4 Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s
5 Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s
6 Kupplung	Methode: 105 °C Kupplung, Aminosäure: aus Methode, Volumen der Aminosäure: 2.5 mL, Activator Position: Position ACT, Activator Volumen: 2 mL, Activator Base Position: Position ACTB, Activator Base Volumen: 1 mL, Verzögerung für Zugabe der Reagenzien: 0 s, Position der verzögerten Reagenz: PositionACTB, Volumen der verzögerten Reagenz: 0 mL, Manifold Wasch Volumen: 2 mL
7 Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 10 s
8 Waschen	Volume: 4 mL, Absaugen: 5 s
9 Waschen	Volume: 4 mL, Absaugen: 5 s
10 Kupplung	siehe Schritt 6
11 Waschen	Volume: 4 mL, Absaugen: 10 s
12 Waschen	Volume: 4 mL, Absaugen: 5 s

Tabelle 19. Einstellungen für die Doppelkupplung von Arginin.

Operation	Werte
1 Deprotection	Reaction Method: Standard Deprotection, Deprotection Volume: 4 mL
2 Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 10 s
3 Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s
4 Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s
5 Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s

6 Experimenteller Teil

6	Kupplung	Methode: Standard Kupplung, Aminosäure: aus Methode, Volumen der Aminosäure: 2.5 mL, Activator Position: Position ACT, Activator Volumen: 2 mL, Activator Base Position: Position ACTB, Activator Base Volumen: 1 mL, Verzögerung für Zugabe der Reagenzien: 0 s, Position der verzögerten Reagenz: PositionACTB, Volumen der verzögerten Reagenz: 0 mL, Manifold Wasch Volumen: 2 mL
7	Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 10 s
8	Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s
9	Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s
10	Kupplung	siehe Schritt 6
11	Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 10 s
12	Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s

Tabelle 20. Einstellungen für die finale Entschützung.

Operation		Werte
1	Entschützung	Methode: Standard Entschützung, Volumen der Entschützungslösung: 4 mL
2	Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s
3	Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s
4	Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s
5	Waschen	Volumen: 4 mL, Absaugen: 5 s

Tabelle 21. Überblick aller verwendeter Mikrowellenmethoden.

Mikrowellenmethode	Temperatur / °C	Leistung / W	Zeit / s	ΔT / °C	Gaseinleitung
Standard	75	155	15	2	an: 2 Sek.
Entschützung	90	30	50	1	aus: 3 Sek.
Standard Kupplung	75	170	15	2	an: 2 Sek.
	90	30	110	1	aus: 3 Sek.
105 °C Kupplung	90	210	15	1	an: 5 Sek.
	105	60	60	1	aus: 2 Sek.

7 Literaturverzeichnis

- [1] J. M. T. Berg, John L.; Gatto jr., Gregory J.; Stryer, Lubert, in *Stryer Biochemie, Vol. 8* Springer Spektrum, **2018**, pp. 405
- [2] E. Muro, G. E. Atilla-Gokcumen, U. S. Eggert, Lipids in cell biology: how can we understand them better?, *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 1819.
- [3] G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112.
- [4] M. C. Piontek, R. B. Lira, W. H. Roos, Active probing of the mechanical properties of biological and synthetic vesicles, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2021**, *1865*, 129486.
- [5] S. Majeed, A. B. Ahmad, U. Sehar, E. R. Georgieva, Lipid Membrane Mimetics in Functional and Structural Studies of Integral Membrane Proteins, *Membranes* **2021**, *11*, 685.
- [6] E. J. Dufourc, Bicycles and nanodiscs for biophysical chemistry11A tribute to Prof Michèle Auger, University Laval, Canada, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2021**, *1863*, 183478.
- [7] R. Ujwal, J. U. Bowie, Crystallizing membrane proteins using lipidic bicelles, *Methods* **2011**, *55*, 337.
- [8] K. Gopfrich, B. Haller, O. Staufer, Y. Dreher, U. Mersdorf, I. Platzman, J. P. Spatz, One-Pot Assembly of Complex Giant Unilamellar Vesicle-Based Synthetic Cells, *ACS Synth. Biol.* **2019**, *8*, 937.
- [9] S. Siquenique, S. Ackerman, A. Schroeder, B. Sarmiento, Bioengineering lipid-based synthetic cells for therapeutic protein delivery, *Trends Biotechnol.* **2025**, *43*, 348.
- [10] N. Yandrapalli, Bottom-up development of lipid-based synthetic cells for practical applications, *Trends Biotechnol.* **2025**, *43*, 2150.
- [11] H. Daraee, A. Etemadi, M. Kouhi, S. Alimirzalu, A. Akbarzadeh, Application of liposomes in medicine and drug delivery, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2016**, *44*, 381.
- [12] R. Chelliah, M. Rubab, S. Vijayalakshmi, M. Karuvelan, K. Barathikannan, D.-H. Oh, Liposomes for drug delivery: Classification, therapeutic applications, and limitations, *Next Nanotechnol.* **2025**, *8*, 100209.
- [13] P. Liu, G. Chen, J. Zhang, A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives, *Molecules* **2022**, *27*, 1372.
- [14] S. Yadav, A. K. Sharma, P. Kumar, Nanoscale Self-Assembly for Therapeutic Delivery, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*:127, 1.
- [15] R. Matsumura, G. Sato, Y. Kuruma, Protocol for in vitro phospholipid synthesis combining fatty acid synthesis and cell-free gene expression, *STAR Protoc.* **2024**, *5*, 103051.
- [16] K. Vogele, T. Frank, L. Gasser, M. A. Goetzfried, M. W. Hackl, S. A. Sieber, F. C. Simmel, T. Pirzer, Towards synthetic cells using peptide-based reaction compartments, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3862.
- [17] M. C. Huber, A. Schreiber, P. von Olshausen, B. R. Varga, O. Kretz, B. Joch, S. Barnert, R. Schubert, S. Eimer, P. Kele, S. M. Schiller, Designer amphiphilic proteins as building blocks for the intracellular formation of organelle-like compartments, *Nat. Mater.* **2015**, *14*, 125.
- [18] H. R. Marsden, L. Gabrielli, A. Kros, Rapid preparation of polymersomes by a water addition/solvent evaporation method, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1512.
- [19] E. R. Wright, V. P. Conticello, Self-assembly of block copolymers derived from elastin-mimetic polypeptide sequences, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 1057.
- [20] M. L. Becker, J. Liu, K. L. Wooley, Peptide-polymer bioconjugates: hybrid block copolymers generated via living radical polymerizations from resin-supported peptides, *Chem. Commun. (Camb)* **2003**, 180.
- [21] D. W. Lowik, J. C. van Hest, Peptide based amphiphiles, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 234.

- [22] J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, Peptide-amphiphile nanofibers: A versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5133.
- [23] J. F. Miravet, B. Escuder, M. D. Segarra-Maset, M. Tena-Solsona, I. W. Hamley, A. Dehsorkhi, V. Castelletto, Self-assembly of a peptide amphiphile: transition from nanotape fibrils to micelles, *Soft Matter* **2013**, *9*, 3558.
- [24] B. J. Williams-Noonan, K. Kulkarni, N. Todorova, M. Franceschi, C. Wilde, M. P. D. Borgo, L. C. Serpell, M.-I. Aguilar, I. Yarovsky, Atomic Scale Structure of Self-Assembled Lipidated Peptide Nanomaterials, *Adv. Mater.* **2024**, *36*, 2311103.
- [25] E. Kokkoli, A. Mardilovich, A. Wedekind, E. L. Rexeisen, A. Garg, J. A. Craig, Self-assembly and applications of biomimetic and bioactive peptide-amphiphiles, *Soft Matter* **2006**, *2*, 1015.
- [26] A. Dehsorkhi, V. Castelletto, I. W. Hamley, Self-assembling amphiphilic peptides, *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 453.
- [27] N. Rodrigues de Almeida, Y. Han, J. Perez, S. Kirkpatrick, Y. Wang, M. C. Sheridan, Design, Synthesis, and Nanostructure-Dependent Antibacterial Activity of Cationic Peptide Amphiphiles, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 2790.
- [28] C. Tang, F. Qiu, X. Zhao, Molecular Design and Applications of Self-Assembling Surfactant-Like Peptides, *J. Nanomater.* **2013**, *469261*, 1.
- [29] G. von Maltzahn, S. Vauthey, S. Santoso, S. Zhang, Positively Charged Surfactant-like Peptides Self-assemble into Nanostructures, *Langmuir* **2003**, *19*, 4332.
- [30] V. Castelletto, J. Seitsonen, J. Ruokolainen, C. Piras, R. Cramer, C. J. C. Edwards-Gayle, I. W. Hamley, Peptide nanotubes self-assembled from leucine-rich alpha helical surfactant-like peptides, *Chem. Commun. (Camb)* **2020**, *56*, 11977.
- [31] D. J. Adams, K. Holtzmann, C. Schneider, M. F. Butler, Self-Assembly of Surfactant-like Peptides, *Langmuir* **2007**, *23*, 12729.
- [32] C. Chen, J. Chen, Q. Yu, J. Zhang, X. Niu, L. Hao, L. Yang, Y. Zhao, Effects of salts on the self-assembly behavior and antibacterial activity of a surfactant-like peptide, *Soft Matter* **2020**, *16*, 9758.
- [33] X. Ma, Y. Wang, Z. Chen, K. Qi, Q. Wu, H. Yang, Z. Qiu, D. Wang, Y. Ke, J. Wang, H. Xu, Elucidating Self-Assembly Tunability via a Designer Zwitterionic Surfactant-like Peptide, *Langmuir* **2025**, *41*, 14211.
- [34] S. Zhang, Lipid-like Self-Assembling Peptides, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2142.
- [35] S. I. Stupp, R. H. Zha, L. C. Palmer, H. Cui, R. Bitton, Self-assembly of biomolecular soft matter, *Faraday Discuss.* **2013**, *166*, 9.
- [36] Y.-C. Lee, Moon, Ju-Young, in *Introduction to Bionanotechnology* Springer Singapore, **2020**, pp. 79
- [37] S. Eskandari, T. Guerin, I. Toth, R. J. Stephenson, Recent advances in self-assembled peptides: Implications for targeted drug delivery and vaccine engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *110-111*, 169.
- [38] N. J. Sinha, M. G. Langenstein, D. J. Pochan, C. J. Kloxin, J. G. Saven, Peptide Design and Self-assembly into Targeted Nanostructure and Functional Materials, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 13915.
- [39] A. C. Mendes, E. T. Baran, R. L. Reis, H. S. Azevedo, Self-assembly in nature: using the principles of nature to create complex nanobiomaterials, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2013**, *5*, 582.
- [40] N. Nuraje, H. Bai, K. Su, Bolaamphiphilic molecules: Assembly and applications, *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 302.
- [41] H. Lee, H. Kim, S.-Y. Lee, Self-Assembling Peptidic Bolaamphiphiles for Biomimetic Applications, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7*, 3545.
- [42] J. D. Halley, D. A. Winkler, Consistent concepts of self-organization and self-assembly, *Complexity* **2008**, *14*, 10.
- [43] B. A. Grzybowski, C. E. Wilmer, J. Kim, K. P. Browne, K. J. M. Bishop, Self-assembly: from crystals to cells, *Soft Matter* **2009**, *5*, 1110.

- [44] J. Boekhoven, A. M. Brizard, K. N. K. Kowlgi, G. J. M. Koper, R. Eelkema, J. H. van Esch, Dissipative Self-Assembly of a Molecular Gelator by Using a Chemical Fuel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4825.
- [45] B. J. G. E. Pieters, M. B. van Eldijk, R. J. M. Nolte, J. Mecnović, Natural supramolecular protein assemblies, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 24.
- [46] T. Mitchison, M. Kirschner, Dynamic instability of microtubule growth, *Nature* **1984**, *312*, 237.
- [47] Y. Liu, Y. Guo, J. M. Valles, J. X. Tang, Microtubule bundling and nested buckling drive stripe formation in polymerizing tubulin solutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10654.
- [48] A. Desai, T. J. Mitchison, MICROTUBULE POLYMERIZATION DYNAMICS, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 83.
- [49] P. G. Barton, F. D. Gunstone, Hydrocarbon chain packing and molecular motion in phospholipid bilayers formed from unsaturated lecithins. Synthesis and properties of sixteen positional isomers of 1,2-dioctadecenoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4470.
- [50] R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2013**, *1828*, 2347.
- [51] P. L. Yeagle, Modulation of membrane function by cholesterol, *Biochimie* **1991**, *73*, 1303.
- [52] A. Morshed, B. I. Karawdeniya, Y. M. N. D. Y. Bandara, M. J. Kim, P. Dutta, Mechanical characterization of vesicles and cells: A review, *ELECTROPHORESIS* **2020**, *41*, 449.
- [53] S. F. Banani, H. O. Lee, A. A. Hyman, M. K. Rosen, Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 285.
- [54] C. P. Brangwynne, Phase transitions and size scaling of membrane-less organelles, *J. Cell Biol.* **2013**, *203*, 875.
- [55] X. Cui, S. Mao, M. Liu, H. Yuan, Y. Du, Mechanism of Surfactant Micelle Formation, *Langmuir* **2008**, *24*, 10771.
- [56] U. H. N. Dürr, M. Gildenberg, A. Ramamoorthy, The Magic of Bicelles Lights Up Membrane Protein Structure, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6054.
- [57] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413.
- [58] D. D. Lasic, The mechanism of vesicle formation, *Biochem. J.* **1988**, *256*, 1.
- [59] F. Szoka, D. Papahadjopoulos, Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes), *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1980**, *9*, 467.
- [60] M. M. Zetterberg, K. Reijmar, M. Prätting, Å. Engström, D. I. Andersson, K. Edwards, PEG-stabilized lipid disks as carriers for amphiphilic antimicrobial peptides, *J. Control. Release* **2011**, *156*, 323.
- [61] S. Alberti, A. Gladfelter, T. Mittag, Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates, *Cell* **2019**, *176*, 419.
- [62] W. M. Babinchak, W. K. Surewicz, Liquid-Liquid Phase Separation and Its Mechanistic Role in Pathological Protein Aggregation, *J. Mol. Biol.* **2020**, *432*, 1910.
- [63] M. Abbas, W. P. Lipiński, K. K. Nakashima, W. T. S. Huck, E. Spruijt, A short peptide synthon for liquid-liquid phase separation, *Nat. Chem.* **2021**, *13*, 1046.
- [64] G. Li, C. Yuan, X. Yan, Peptide-mediated liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates, *Soft Matter* **2025**, *21*, 1781.
- [65] C. Yuan, Q. Li, R. Xing, J. Li, X. Yan, Peptide self-assembly through liquid-liquid phase separation, *Chem.* **2023**, *9*, 2425.
- [66] H. J. Jeon, J. H. Lee, A. J. Park, J.-M. Choi, K. Kang, A Single Amino Acid Model for Hydrophobically Driven Liquid-Liquid Phase Separation, *Biomacromolecules* **2025**, *26*, 1075.
- [67] V. Castelletto, J. Seitsonen, A. Pollitt, I. W. Hamley, Minimal Peptide Sequences That Undergo Liquid-Liquid Phase Separation via Self-Coacervation or Complex Coacervation with ATP, *Biomacromolecules* **2024**, *25*, 5321.

- [68] L. Lemetti, A. Scacchi, Y. Yin, M. Shen, M. B. Linder, M. Sammalkorpi, A. S. Aranko, Liquid–Liquid Phase Separation and Assembly of Silk-like Proteins is Dependent on the Polymer Length, *Biomacromolecules* **2022**, *23*, 3142.
- [69] H. Cui, M. J. Webber, S. I. Stupp, Self-assembly of peptide amphiphiles: from molecules to nanostructures to biomaterials, *Biopolymers* **2010**, *94*(1), 1.
- [70] F. Gao, X. Zhao, Q. Si, X. Niu, S. Hou, S. Liu, J. Guo, L. Wang, F. Zhang, Gemini surfactant-like peptide-based nanocages with β -sheet-enhanced stability and encapsulation efficiency of hydrophobic anticancer drugs, *RSC Adv.* **2023**, *13*, 12863.
- [71] M. Cao, C. Cao, P. Zhou, N. Wang, D. Wang, J. Wang, D. Xia, H. Xu, Self-assembly of amphiphilic peptides: Effects of the single-chain-to-gemini structural transition and the side chain groups, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, *469*, 263.
- [72] S. Vauthey, S. Santoso, H. Gong, N. Watson, S. Zhang, Molecular Self-Assembly of Surfactant-like Peptides to Form Nanotubes and Nanovesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5355.
- [73] D. G. Fatouros, D. A. Lamprou, A. J. Urquhart, S. N. Yannopoulos, I. S. Vizirianakis, S. Zhang, S. Koutsopoulos, Lipid-like self-assembling peptide nanovesicles for drug delivery, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 8184.
- [74] H. Xu, J. Wang, S. Han, J. Wang, D. Yu, H. Zhang, D. Xia, X. Zhao, T. A. Waigh, J. R. Lu, Hydrophobic-Region-Induced Transitions in Self-Assembled Peptide Nanostructures, *Langmuir* **2009**, *25*, 4115.
- [75] F. Pan, X. Zhao, S. Perumal, T. A. Waigh, J. R. Lu, J. R. P. Webster, Interfacial Dynamic Adsorption and Structure of Molecular Layers of Peptide Surfactants, *Langmuir* **2010**, *26*, 5690.
- [76] V. Castelletto, I. W. Hamley, M. D. Segarra-Maset, C. B. Gumbau, J. F. Miravet, B. Escuder, J. Seitsonen, J. Ruokolainen, Tuning chelation by the surfactant-like peptide A6H using predetermined pH values, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 591.
- [77] I. W. Hamley, A. Dehsorkhi, V. Castelletto, Self-assembled arginine-coated peptide nanosheets in water, *Chem. Commun. (Camb)* **2013**, *49*, 1850.
- [78] E. R. da Silva, W. A. Alves, V. Castelletto, M. Reza, J. Ruokolainen, R. Hussain, I. W. Hamley, Self-assembly pathway of peptide nanotubes formed by a glutamatic acid-based bolaamphiphile, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 11634.
- [79] M. K. Baumann, M. Textor, E. Reimhult, Understanding Self-Assembled Amphiphilic Peptide Supramolecular Structures from Primary Structure Helix Propensity, *Langmuir* **2008**, *24*, 7645.
- [80] J. Li, J. Wang, Y. Zhao, P. Zhou, J. Carter, Z. Li, T. A. Waigh, J. R. Lu, H. Xu, Surfactant-like peptides: From molecular design to controllable self-assembly with applications, *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *421*, 213418.
- [81] F. Peng, Y. Chen, J. Liu, Z. Xing, J. Fan, W. Zhang, F. Qiu, Facile design of gemini surfactant-like peptide for hydrophobic drug delivery and antimicrobial activity, *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *591*, 314.
- [82] R. C. Claussen, B. M. Rabatic, S. I. Stupp, Aqueous Self-Assembly of Unsymmetric Peptide Bolaamphiphiles into Nanofibers with Hydrophilic Cores and Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12680.
- [83] J. H. Fuhrhop, H. H. David, J. Mathieu, U. Liman, H. J. Winter, E. Boekema, Bolaamphiphiles and monolayer lipid membranes made from 1,6,19,24-tetraoxa-3,21-cyclohexatriacontadiene-2,5,20,23-tetrone, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1785.
- [84] E. R. da Silva, M. N. M. Walter, M. Reza, V. Castelletto, J. Ruokolainen, C. J. Connon, W. A. Alves, I. W. Hamley, Self-Assembled Arginine-Capped Peptide Bolaamphiphile Nanosheets for Cell Culture and Controlled Wettability Surfaces, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 3180.
- [85] A. Das, O. Gnewou, X. Zuo, F. Wang, V. P. Conticello, Surfactant-like peptide gels are based on cross- β amyloid fibrils, *Faraday Discuss.* **2025**, *260*, 35.
- [86] I. W. Hamley, S. Burholt, J. Hutchinson, V. Castelletto, E. R. da Silva, W. Alves, P. Gutfreund, L. Porcar, R. Dattani, D. Hermida-Merino, G. Newby, M. Reza, J. Ruokolainen, J. Stasiak, Shear Alignment of Bola-Amphiphilic Arginine-Coated Peptide Nanotubes, *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 141.

- [87] Y. Zhao, W. Yang, D. Wang, J. Wang, Z. Li, X. Hu, S. King, S. Rogers, J. R. Lu, H. Xu, Controlling the Diameters of Nanotubes Self-Assembled from Designed Peptide Bolaamphiphiles, *Small* **2018**, *14*, 1703216.
- [88] F. Qiu, Y. Chen, C. Tang, Q. Zhou, C. Wang, Y.-K. Shi, X. Zhao, De Novo Design of a Bolaamphiphilic Peptide with Only Natural Amino Acids, *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 1053.
- [89] W. Yu, X. Guo, X. Li, Y. Wei, Y. Lyu, L. Zhang, J. Wang, A. Shan, Novel multidomain peptide self-assembly biomaterials based on bola structure and terminal anchoring: Nanotechnology meets antimicrobial therapy, *Mater. Today Bio.* **2024**, *28*, 101183.
- [90] Y. Zhao, L. Deng, W. Yang, D. Wang, E. Pambou, Z. Lu, Z. Li, J. Wang, S. King, S. Rogers, H. Xu, J. R. Lu, Tuning One-Dimensional Nanostructures of Bola-Like Peptide Amphiphiles by Varying the Hydrophilic Amino Acids, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 11394.
- [91] A. C. Eldredge, M. E. Johnson, N. J. Oldenhuis, Z. Guan, Focused Library Approach to Discover Discrete Dipeptide Bolaamphiphiles for siRNA Delivery, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3138.
- [92] J.-X. Chen, X.-D. Xu, S. Yang, J. Yang, R.-X. Zhuo, X.-Z. Zhang, Self-Assembled Bola-like Amphiphilic Peptides as Viral-Mimetic Gene Vectors for Cancer Cell Targeted Gene Delivery, *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 84.
- [93] N. Nuraje, I. A. Banerjee, R. I. MacCuspie, L. Yu, H. Matsui, Biological Bottom-Up Assembly of Antibody Nanotubes on Patterned Antigen Arrays, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8088.
- [94] I. A. Banerjee, L. Yu, H. Matsui, Application of Host-Guest Chemistry in Nanotube-Based Device Fabrication: Photochemically Controlled Immobilization of Azobenzene Nanotubes on Patterned α -CD Monolayer/Au Substrates via Molecular Recognition, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9542.
- [95] L. Pérez, A. Pinazo, R. Pons, M. Infante, Gemini surfactants from natural amino acids, *Adv. Colloid. Interface Sci.* **2014**, *205*, 134.
- [96] J.-X. Wang, T.-T. Cai, J.-L. Li, R.-X. Zhuo, X.-Z. Zhang, Micro-size cell-like vesicles based on gemini-like amphiphilic peptide, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 14993.
- [97] E. Mazurkiewicz, Ł. Lamch, K. A. Wilk, E. Obłąk, Anti-adhesive, anti-biofilm and fungicidal action of newly synthesized gemini quaternary ammonium salts, *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 14110.
- [98] S. Dyagala, S. Halder, R. Aggrawal, M. Paul, V. K. Aswal, S. Biswas, S. K. Saha, ct-DNA compaction by nanoparticles formed by silica and gemini surfactants having hydroxyl group substituted spacers: In vitro, in vivo, and ex vivo gene uptake to cancer cells, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **2024**, *261*, 113066.
- [99] W. Zhang, C. Wan, H. Li, Y. Li, F. Hu, Q. Cheng, Y. Liao, Y. Yang, Substituting Commercial Wetting Agents With Bio-Based Gemini Surfactants: Performance and Sustainability Evaluation, *J. Appl. Polym. Sci.* **2026**, *143*, e57974.
- [100] A. Valls, B. Altava, V. Aseyev, E. García-Verdugo, S. V. Luis, Imidazolium based gemini amphiphiles derived from L-valine. Structural elements and surfactant properties, *J. Mol. Liq.* **2021**, *341*, 117434.
- [101] E. M. Pachón Gómez, O. Fernando Silva, M. Der Ohannesian, M. Núñez Fernández, R. G. Oliveira, M. A. Fernández, Micelle-to-vesicle transition of lipoamino Gemini surfactant induced by metallic salts and its effects on antibacterial activity, *J. Mol. Liq.* **2022**, *353*, 118793.
- [102] G. Ronsin, C. Perrin, P. Guédât, A. Kremer, P. Camilleri, A. J. Kirby, Novel spermine-based cationic gemini surfactants for gene delivery, *Chem. Commun.* **2001**, 2234.
- [103] F. M. Menger, C. A. Littau, Gemini-surfactants: synthesis and properties, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1451.
- [104] X. Yin, Z. Chen, Y. Chen, Y. Xie, B. Xiong, H. Jiang, J. Zhu, Lipidated gemini peptide amphiphiles with enhanced loading capacity and cell membrane affinity for drug delivery, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2020**, *195*, 111271.
- [105] L. Tavano, M. R. Infante, M. A. Riya, A. Pinazo, M. P. Vinardell, M. Mitjans, M. A. Manresa, L. Perez, Role of aggregate size in the hemolytic and antimicrobial activity of

- colloidal solutions based on single and gemini surfactants from arginine, *Soft Matter* **2013**, *9*, 306.
- [106] D. L. Nettles, A. Chilkoti, L. A. Setton, Applications of elastin-like polypeptides in tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 1479.
- [107] T. A. T. Lee, A. Cooper, R. P. Apkarian, V. P. Conticello, Thermo-Reversible Self-Assembly of Nanoparticles Derived from Elastin-Mimetic Polypeptides, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1105.
- [108] T. Kowalczyk, K. Hnatuszko-Konka, A. Gerszberg, A. K. Kononowicz, Elastin-like polypeptides as a promising family of genetically-engineered protein based polymers, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 2141.
- [109] T. Frank, K. Voegelé, A. Dupin, F. C. Simmel, T. Pirzer, Growth of Giant Peptide Vesicles Driven by Compartmentalized Transcription-Translation Activity, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 17356.
- [110] A. K. Varanko, J. C. Su, A. Chilkoti, Elastin-Like Polypeptides for Biomedical Applications, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2020**, *22*, 343.
- [111] D. W. Lim, D. L. Nettles, L. A. Setton, A. Chilkoti, Rapid Cross-Linking of Elastin-like Polypeptides with (Hydroxymethyl)phosphines in Aqueous Solution, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1463.
- [112] A. Yeboah, R. I. Cohen, C. Rabolli, M. L. Yarmush, F. Berthiaume, Elastin-like polypeptides: A strategic fusion partner for biologics, *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *113*, 1617.
- [113] T. Pirzer, Dynamische Peptidvesikel als Vorstufe synthetischer Zellen?, *BIOspektrum* **2021**, *27*, 604.
- [114] L. Sun, Z. Fan, Y. Wang, Y. Huang, M. Schmidt, M. Zhang, Tunable synthesis of self-assembled cyclic peptide nanotubes and nanoparticles, *Soft Matter* **2015**, *11*, 3822.
- [115] A. Solomonov, A. Kozell, U. Shimanovich, Designing Multifunctional Biomaterials via Protein Self-Assembly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, *63*, e202318365.
- [116] S. B. Kent, Chemical synthesis of peptides and proteins, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957.
- [117] B. Bacsá, K. Horváti, S. Bősze, F. Andrae, C. O. Kappe, Solid-Phase Synthesis of Difficult Peptide Sequences at Elevated Temperatures: A Critical Comparison of Microwave and Conventional Heating Technologies, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7532.
- [118] M. Paradís-Bas, J. Tulla-Puche, F. Albericio, The road to the synthesis of “difficult peptides”, *Chemical Society Reviews* **2016**, *45*, 631.
- [119] L. K. Mueller, A. C. Baumruck, H. Zhdanova, A. A. Tietze, Challenges and Perspectives in Chemical Synthesis of Highly Hydrophobic Peptides, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 162.
- [120] I. V. Korendovych, W. F. DeGrado, De novo protein design, a retrospective, *Q. Rev. Biophys.* **2020**, *53*, 1.
- [121] S. P. Ho, W. F. DeGrado, Design of a 4-helix bundle protein: synthesis of peptides which self-associate into a helical protein, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6751.
- [122] W. R. Atchley, W. M. Fitch, A natural classification of the basic helix–loop–helix class of transcription factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 5172.
- [123] J. Garrell, S. Campuzano, The helix-loop-helix domain: A common motif for bristles, muscles and sex, *BioEssays* **1991**, *13*, 493.
- [124] S. J. Anthony-Cahill, P. A. Benfield, R. Fairman, Z. R. Wasserman, S. L. Brenner, W. F. Stafford, C. Altenbach, W. L. Hubbell, W. F. DeGrado, Molecular Characterization of Helix-Loop-Helix Peptides, *Science* **1992**, *255*, 979.
- [125] D. Aili, F. I. Tai, K. Enander, L. Baltzer, B. Liedberg, Self-assembly of fibers and nanorings from disulfide-linked helix-loop-helix polypeptides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5554.
- [126] C. Aronsson, R. Selegård, D. Aili, Zinc-Triggered Hierarchical Self-Assembly of Fibrous Helix–Loop–Helix Peptide Superstructures for Controlled Encapsulation and Release, *Macromolecules* **2016**, *49*, 6997.

- [127] K. P. R. Nilsson, J. Rydberg, L. Baltzer, O. Inganäs, Self-assembly of synthetic peptides control conformation and optical properties of a zwitterionic polythiophene derivative, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10170.
- [128] D. Sanchez-deAlcazar, S. H. Mejias, K. Erazo, B. Sot, A. L. Cortajarena, Self-assembly of repeat proteins: Concepts and design of new interfaces, *J. Struct. Biol.* **2018**, *201*, 118.
- [129] S. A. Hughes, F. Wang, S. Wang, M. A. B. Kreuzberger, T. Osinski, A. Orlova, J. S. Wall, X. Zuo, E. H. Egelman, V. P. Conticello, Ambidextrous helical nanotubes from self-assembly of designed helical hairpin motifs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 14456.
- [130] L. Doyle, J. Hallinan, J. Bolduc, F. Parmeggiani, D. Baker, B. L. Stoddard, P. Bradley, Rational design of α -helical tandem repeat proteins with closed architectures, *Nature* **2015**, *528*, 585.
- [131] K. Fujiwara, H. Toda, M. Ikeguchi, Dependence of α -helical and β -sheet amino acid propensities on the overall protein fold type, *BMC Struct. Biol.* **2012**, *12*, 18.
- [132] L. Li, I. Vorobyov, T. W. Allen, The Different Interactions of Lysine and Arginine Side Chains with Lipid Membranes, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 11906.
- [133] K. A. Lorenz-Ochoa, E. Lee, C. R. Baiz, Beyond Electrostatic Interactions: H-Bond Dynamics in Arginine- versus Lysine-Rich Biocondensates, *J. Phys. Chem. Lett.* **2025**, *16*, 9288.
- [134] M. R. Bhatt, H. K. Ganguly, N. J. Zondlo, Acyl Capping Group Identity Effects on α -Helicity: On the Importance of Amide-Water Hydrogen Bonds to α -Helix Stability, *Biochem.* **2024**, *63*, 1118.
- [135] B. C. Poschner, D. Langosch, Stabilization of conformationally dynamic helices by covalently attached acyl chains, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 1801.
- [136] T. Heim, Peptide Membranes From de novo Designed Helix-Loop-Helix Peptides, Masterarbeit, Universität Heidelberg **2022**.
- [137] C. Remuzgo, G. F. S. Andrade, M. L. A. Temperini, M. T. M. Miranda, Acanthoscurrin fragment 101–132: Total synthesis at 60°C of a novel difficult sequence, *Pept. Sci.* **2009**, *92*, 65.
- [138] R. B. Merrifield, J. Singer, B. T. Chait, Mass spectrometric evaluation of synthetic peptides for deletions and insertions, *Anal. Biochem.* **1988**, *174*, 399.
- [139] V. Reusche, Untersuchungen zur Aggregation des ALS-relevanten TDP-43(307-347), Dissertation, Universität Göttingen **2022**, <http://dx.doi.org/10.53846/goediss-9615>.
- [140] L. M. Varanda, M. T. M. Miranda, Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystinin-12, *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 102.
- [141] I. Shuklov, N. Dubrovina, A. Börner, Fluorinated alcohols as solvents, co-solvents and additives in homogeneous catalysis, *Synthesis* **2007**, *19*, 2925.
- [142] D.-P. Hong, M. Hoshino, R. Kuboi, Y. Goto, Clustering of Fluorine-Substituted Alcohols as a Factor Responsible for Their Marked Effects on Proteins and Peptides, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8427.
- [143] A. Abedini, G. Singh, D. P. Raleigh, Recovery and purification of highly aggregation-prone disulfide-containing peptides: Application to islet amyloid polypeptide, *Anal. Biochem.* **2006**, *351*, 181.
- [144] J. Pazzi, A. B. Subramaniam, Dynamics of giant vesicle assembly from thin lipid films, *J. Colloid Interface Sci.* **2024**, *661*, 1033.
- [145] B. J. H. Kuipers, H. Gruppen, Prediction of Molar Extinction Coefficients of Proteins and Peptides Using UV Absorption of the Constituent Amino Acids at 214 nm To Enable Quantitative Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5445.
- [146] W. Schärtl, *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*, Springer, **2007**.
- [147] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1751*, 119.

- [148] N. J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2876.
- [149] W. C. Johnson Jr., Protein Secondary Structure and Circular Dichroism: A Practical Guide, *Proteins* **1990**, *7*, 205.
- [150] A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E3095.
- [151] A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W315.
- [152] A. Micsonai, É. Bulyáki, J. Kardos, in *Structural Genomics: General Applications* Springer US, New York, **2021**, pp. 175.
- [153] R. O. Crooks, T. Rao, J. M. Mason, Truncation, Randomization, and Selection: GENERATION OF A REDUCED LENGTH c-Jun ANTAGONIST THAT RETAINS HIGH INTERACTION STABILITY*, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 29470.
- [154] S. C. Kwok, R. S. Hodges, Clustering of Large Hydrophobes in the Hydrophobic Core of Two-stranded α -Helical Coiled-Coils Controls Protein Folding and Stability*, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35248.
- [155] A. Kefala, M. Amprazi, E. Mylonas, D. Kotsifaki, M. Providaki, C. Pozidis, M. Fotiadou, M. Kokkinidis, Probing Protein Folding with Sequence-Reversed α -Helical Bundles, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1955.
- [156] R. F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy, Vol. 2*, Springer, **2016**.
- [157] N. R. Zaccai, I. N. Serdyuk, J. Zaccai, *Methods in Molecular Biophysics, Vol. 2*, Cambridge University Press, **2017**.
- [158] W. C. Johnson, K. E. van Holde, P. S. Ho, *Principles of Physical Biochemistry, Vol. 2*, Pearson Education, **2006**.
- [159] A. Meister, A. Blume, (Cryo)Transmission Electron Microscopy of Phospholipid Model Membranes Interacting with Amphiphilic and Polyphilic Molecules, *Polymers* **2017**, *9*, 521.
- [160] F. Ostendorf, C. Schmitz, S. Hirth, A. Kühnle, J. J. Kolodziej, M. Reichling, How flat is an air-cleaved mica surface?, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 305705.
- [161] D. J. Müller, M. Amrein, A. Engel, Adsorption of Biological Molecules to a Solid Support for Scanning Probe Microscopy, *J. Struct. Biol.* **1997**, *119*, 172.
- [162] C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton, Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids, *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2006**, *30*, 3.22.1.
- [163] B. György, T. G. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, V. László, É. Pállinger, E. Pap, Á. Kittel, G. Nagy, A. Falus, E. I. Buzás, Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles, *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2667.
- [164] S. Drescher, V. M. Garamus, C. J. Garvey, A. Meister, A. Blume, Aggregation behaviour of a single-chain, phenylene-modified bolalipid and its miscibility with classical phospholipids, *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 995.
- [165] L. Rubio, G. Rodríguez, C. Alonso, C. López-Iglesias, M. Cócera, L. Coderch, A. De la Maza, J. L. Parra, O. López, Structural effects of flufenamic acid in DPPC/DHPC bicellar systems, *Soft Matter* **2011**, *7*, 8488.
- [166] Y. Yuana, T. H. Oosterkamp, S. Bahatyrova, B. Ashcroft, P. Garcia Rodriguez, R. M. Bertina, S. Osanto, Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles, *J. Thromb. Haemost.* **2010**, *8*, 315.
- [167] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *J. Control. Release* **2016**, *235*, 337.
- [168] S. Kamble, S. Agrawal, S. Cherumukkil, V. Sharma, R. V. Jasra, P. Munshi, Revisiting Zeta Potential, the Key Feature of Interfacial Phenomena, with Applications and Recent Advancements, *ChemistrySelect* **2022**, *7*, e202103084.
- [169] C. N. Lunardi, A. J. Gomes, F. S. Rocha, J. De Tommaso, G. S. Patience, Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential, *Can. J. Chem. Eng.* **2021**, *99*, 627.

- [170] J. C. Millare, B. A. Basilia, Dispersion and electrokinetics of scattered objects in ethanol-water mixtures, *Fluid Ph. Equilibria* **2019**, *481*, 44.
- [171] A. Disalvo, M. A. Frias, Surface Characterization of Lipid Biomimetic Systems, *Membranes* **2021**, *11*, 821.
- [172] G. Midekessa, K. Godakumara, J. Ord, J. Viil, F. Lättekivi, K. Dissanayake, S. Kopanchuk, A. Rincken, A. Andronowska, S. Bhattacharjee, T. Rincken, A. Fazeli, Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability, *ACS Omega* **2020**, *5*, 16701.
- [173] A. Martín-Molina, L. Lue, M. Quesada-Pérez, K. Bohinc, Interaction between charged lipid vesicles and point- or rod-like trivalent ions, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2019**, *178*, 525.
- [174] M. A. Morini, M. B. Sierra, V. I. Pedroni, L. M. Alarcon, G. A. Appignanesi, E. A. Disalvo, Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC, DPPC and DMPE lipid vesicles, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2015**, *131*, 54.
- [175] Helgi I. Ingólfsson, Olaf S. Andersen, Alcohol's Effects on Lipid Bilayer Properties, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 847.
- [176] D. L. Minor, P. S. Kim, Measurement of the β -sheet-forming propensities of amino acids, *Nature* **1994**, *367*, 660.
- [177] B. Ciani, E. G. Hutchinson, R. B. Sessions, D. N. Woolfson, A Designed System for Assessing How Sequence Affects α to β Conformational Transitions in Proteins*, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 10150.
- [178] F. Zhuang, K. Oglecka, C. A. Hauser, Self-Assembling Peptide Surfactants A6K and A6D Adopt α -Helical Structures Useful for Membrane Protein Stabilization, *Membranes* **2011**, *1*, 314.
- [179] H. Mihara, Y. Takahashi, Engineering peptides and proteins that undergo α -to- β transitions, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 501.
- [180] J. T. Pelton, L. R. McLean, Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure, *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 167.
- [181] J. A. Jackman, N.-J. Cho, Supported Lipid Bilayer Formation: Beyond Vesicle Fusion, *Langmuir* **2020**, *36*, 1387.
- [182] A. Yamada, A. Mitsueda, M. Hasan, M. Ueda, S. Hama, S. Warashina, T. Nakamura, H. Harashima, K. Kogure, Tri-membrane nanoparticles produced by combining liposome fusion and a novel patchwork of bicelles to overcome endosomal and nuclear membrane barriers to cargo delivery, *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 439.
- [183] J. J. Panda, V. S. Chauhan, Short peptide based self-assembled nanostructures: implications in drug delivery and tissue engineering, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4418.
- [184] B. Dupuy, M. Montagu, Spectral Properties of a Fluorescent Probe, all-trans-1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene. Solvent and Temperature Effects, *Analyst* **1997**, *122*, 783.
- [185] R. D. Kaiser, E. London, Location of Diphenylhexatriene (DPH) and Its Derivatives within Membranes: Comparison of Different Fluorescence Quenching Analyses of Membrane Depth, *Biochem.* **1998**, *37*, 8180.
- [186] C.-x. Li, J.-c. Li, J. Lai, Y. Liu, The pharmacological and pharmacokinetic properties of esculin: A comprehensive review, *Phytother. Res.* **2022**, *36*, 2434.
- [187] T. Cai, B. Cai, Pharmacological activities of esculin and esculetin: A review, *Medicine* **2023**, *102*, e35306.
- [188] C. S. Karamitros, J. Lim, M. Konrad, An Amplex Red-based fluorometric and spectrophotometric assay for L-asparaginase using its natural substrate, *Anal. Biochem.* **2014**, *445*, 20.
- [189] S. Witt, G. Wohlfahrt, D. Schomburg, H.-J. Hecht, H. M. Kalisz, Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose, *Biochem. J.* **2000**, *347*, 553.
- [190] G. V. Porcal, C. M. Previtali, S. G. Bertolotti, Photophysics of the phenoxazine dyes resazurin and resorufin in direct and reverse micelles, *Dyes Pigments* **2009**, *80*, 206.
- [191] O. Yanshyna, M. J. Białek, O. V. Chashchikhin, R. Klajn, Encapsulation within a coordination cage modulates the reactivity of redox-active dyes, *Commun. Chem.* **2022**, *5*, 44.

- [192] R. Csepregi, B. Lemli, S. Kunsági-Máté, L. Szente, T. Kőszegi, B. Németi, M. Poór, Complex Formation of Resorufin and Resazurin with B-Cyclodextrins: Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay?, *Molecules* **2018**, *23*, 382.
- [193] J. J. Morsby, M. Dharmarwardana, H. McGarraugh, B. D. Smith, Supramolecular optimization of the visual contrast for colorimetric indicator assays that release resorufin dye, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 9296.
- [194] B. Strodel, Energy Landscapes of Protein Aggregation and Conformation Switching in Intrinsically Disordered Proteins, *J. Mol. Biol.* **2021**, *433*, 167182.
- [195] N. E. Charron, K. Bonneau, A. S. Pasos-Trejo, A. Guljas, Y. Chen, F. Musil, J. Venturin, D. Gusew, I. Zaporozhets, A. Krämer, C. Templeton, A. Kelkar, A. E. P. Durumeric, S. Olsson, A. Pérez, M. Majewski, B. E. Husic, A. Patel, G. De Fabritiis, F. Noé, C. Clementi, Navigating protein landscapes with a machine-learned transferable coarse-grained model, *Nat. Chem.* **2025**, *17*, 1284.
- [196] X. Cai, W. Han, Development of a Hybrid-Resolution Force Field for Peptide Self-Assembly Simulations: Optimizing Peptide–Peptide and Peptide–Solvent Interactions, *J. Chem. Inf. Model.* **2022**, *62*, 2744.
- [197] P. L. Stewart, Cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography of nanoparticles, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9*, e1417.
- [198] E. H. Egelman, The Current Revolution in Cryo-EM, *Biophys. J.* **2016**, *110*, 1008.
- [199] K. Vogele, T. Pirzer, F. C. Simmel, Genetically Encoded Membranes for Bottom-Up Biology, *ChemSystemsChem* **2019**, *1*, e1900016.
- [200] O. Carny, E. Gazit, A model for the role of short self-assembled peptides in the very early stages of the origin of life, *FASEB J.* **2005**, *19*, 1051.
- [201] V. Navarkhele, A. Navarkhele, Static Dielectric Constants, Densities, Refractive Indices and Related Properties of Binary Mixtures at Various Temperatures Under Atmospheric Pressure, *Int. J. Thermodyn.* **2022**, *25*, 1.
- [202] J. Wyman, THE DIELECTRIC CONSTANT OF MIXTURES OF ETHYLALCOHOL AND WATER FROM -5 TO 40°, *J. Am. Chem. Soc.* **1931**, *53*, 3292.
- [203] U. Kaatze, A. Schumacher, R. Pottel, The Dielectric Properties of tert.-Butanol/Water Mixtures as a Function of Composition, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 585.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Å	Angström
Ac	Acetyl
Amplex®Red	1-(3,7-Dihydroxy-10 <i>H</i> -phenoxazin-10-yl)ethan-1-on
α-CHCA	4-hydroxy-α-cyano-Zimtsäure
a.u.	beliebige Einheit (<i>arbitrary units</i>)
BuOH	Buthanol
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
cm	Zentimeter
CMC	kritische Micellenkonzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
d	Tage
<i>d</i>	Weglänge
Da	Dalton (kDa = kilo Dalton)
DCM	Dichlormethan
DCPC	Dicaprylphosphatidylcholin
deg	Grad (mdeg = Milligrad) (<i>degree</i>)
<i>d_H</i>	hydrodynamischer Durchmesser
ddH ₂ O	Reinstwasser
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
dmol	Decimol
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOTMA	<i>N</i> -[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethyl ammoniumchlorid
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien
ε	Extinktionskoeffizient
ELP	Elastin-ähnliche Peptide

	<i>(elastin-like peptides)</i>
Esculin	7-Hydroxy-6-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxichromen-2-on
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
Gl	Gleichung
Gly	Glycin
GOx	Glucoseoxidase
GUV	gigantische unilamellare Vesikel <i>(giant unilamellar vesicles)</i>
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HFiP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
HLH	Helix-Loop-Helix
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie <i>(high-performance liquid chromatography)</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase <i>(horseradish peroxidase)</i>
I	Intensität
Korr. Koeff. (g ₂ -1)	Korrelationskoeffizient
λ	Wellenlänge
LLPS	Flüssig-Flüssig-Phasentrennung <i>(liquid-liquid phase separation)</i>
LP	linear positiv
LUV	große unilamellare Vesikel <i>(large unilamellar vesicles)</i>
M	g/mol
M	Molar
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation <i>(matrix-assisted laser desorption/ionization)</i>
mbar	Millibar
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute

mL	Milliliter
MLV	multilamellare Vesikel
µL	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
MRE ([θ])	mittlere Restelliptizität (<i>mean residue ellipticity</i>)
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
<i>n</i>	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
Oxyma	Ethylcyano(hydroxyimino)acetat
PA	peptidische Amphiphile (<i>lipidated peptides</i>)
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
res	<i>residue</i>
Resorufin	7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on
RKM	Rasterkraftmikroskopie (<i>atomic force microscopy</i>)
RP	Reflektor positiv
RT	Raumtemperatur
sccm	standard cubic centimeters per minute
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
sek	Sekunde
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>solid-phase peptide synthesis</i>)
STEM	Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie (<i>scanning/transmission electron microscopy</i>)
SUV	kleine unilamellare Vesikel (<i>small unilamellar vesicles</i>)

<i>t</i>	Zeit
TFA	Trifluoressigsäure
TG	TentaGel®
TIPS	Triisopropylsilan
TOF	<i>time of flight</i>
t_R	Retentionszeit
TRP	<i>tandem repeat proteins</i>
u	Masseneinheit
ULV	unilamellare Vesikel
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbares Licht
WW	Wechselwirkung
ζ	Zeta-Potential

9 Anhang

9.1 Übersicht der Peptide

9.1.1 HLHP1

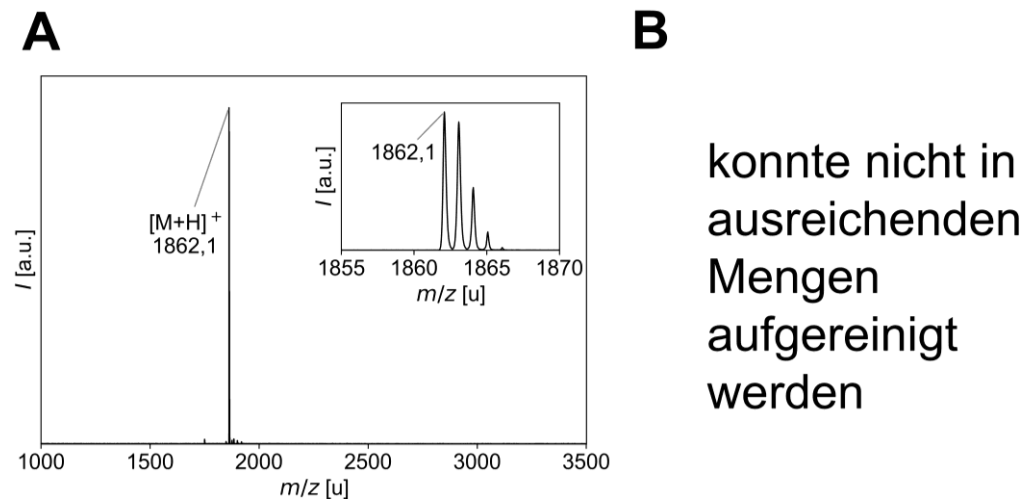


Abbildung 52. A MALDI-TOF Spektrum von reinem **HLHP1**. Messmethode: RP_300 - 3500. **B** Ein analytisches HPLC-Chromatogramm konnte aufgrund von Löslichkeits- und Aufreinigungsproblemen nicht aufgenommen werden.

Sequenz: Ac - AAA AAA AAA GPRRG AAA AAA AAA - NH₂

Summenformel: C₇₇H₁₃₂N₃₀O₂₄

monoisotopische Masse ([M+H]⁺): errechnet: 1862,0 u; gemessen: 1862,1 u

analyt. HPLC: konnte nicht aufgereinigt werden

9.1.2 HLHP1.1

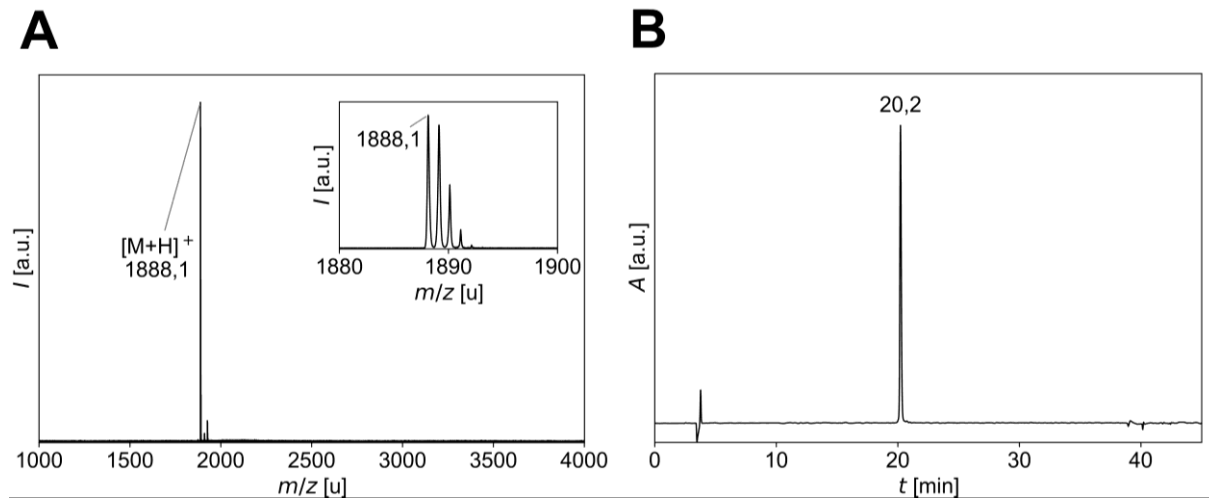


Abbildung 53. A MALDI-TOF Spektrum von reinem **HLHP1.1**. Messmethode: RP_450 - 4000. **B** Analytisches HPLC-Chromatogramm von reinem **HLHP1.1**.

Sequenz: Ac - AAA PAA AAA GPRRG AAA AAA AAA - NH₂

Summenformel: C₇₉H₁₃₄N₃₀O₂₄

monoisotopische Masse ([M+H]⁺): errechnet: 1888,0 u; gemessen: 1888,1 u

analyt. HPLC: Gradient: 10 – 40 % MeCN in ddH₂O (+ 0,1 % TFA) in 30 Minuten,
 $t_R = 20,2$ min

9.1.3 HLHP2

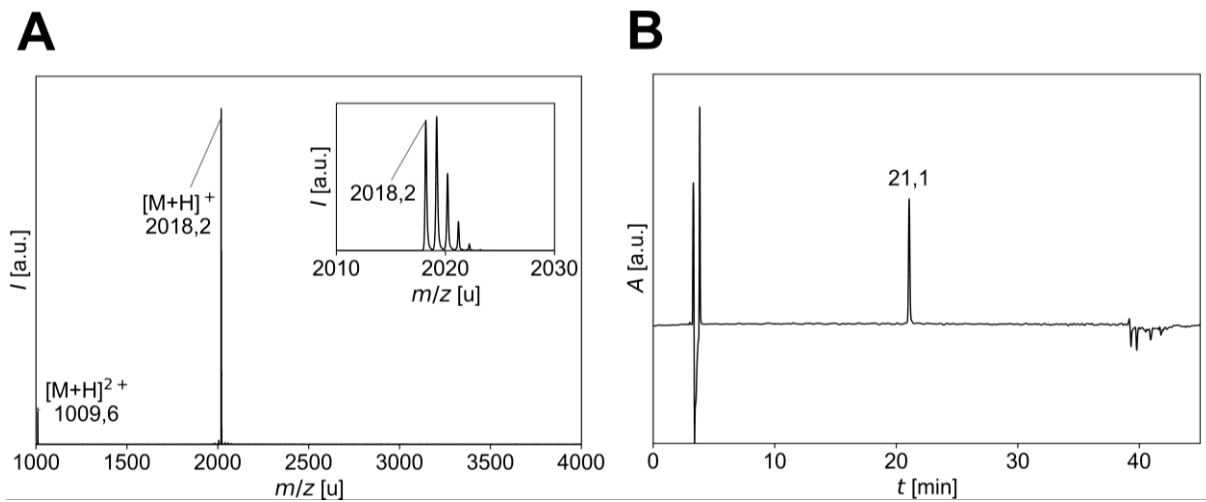


Abbildung 54. **A** MALDI-TOF Spektrum von reinem **HLHP2**. Messmethode: RP_450 - 4000. **B** Analytisches HPLC-Chromatogramm von reinem **HLHP2**.

Sequenz: Ac - AAA AAA AAA GPRRRG AAA AAA AAA - NH₂

Summenformel: C₈₃H₁₄₄N₃₄O₂₅

monoisotopische Masse ([M+H]⁺): errechnet: 2018,1 u; gemessen: 2018,2 u

analyt. HPLC: Gradient: 10 – 40 % MeCN in ddH₂O (+ 0,1 % TFA) in 30 Minuten,
 $t_R = 21,1$ min

9.1.4 HLHP2.1

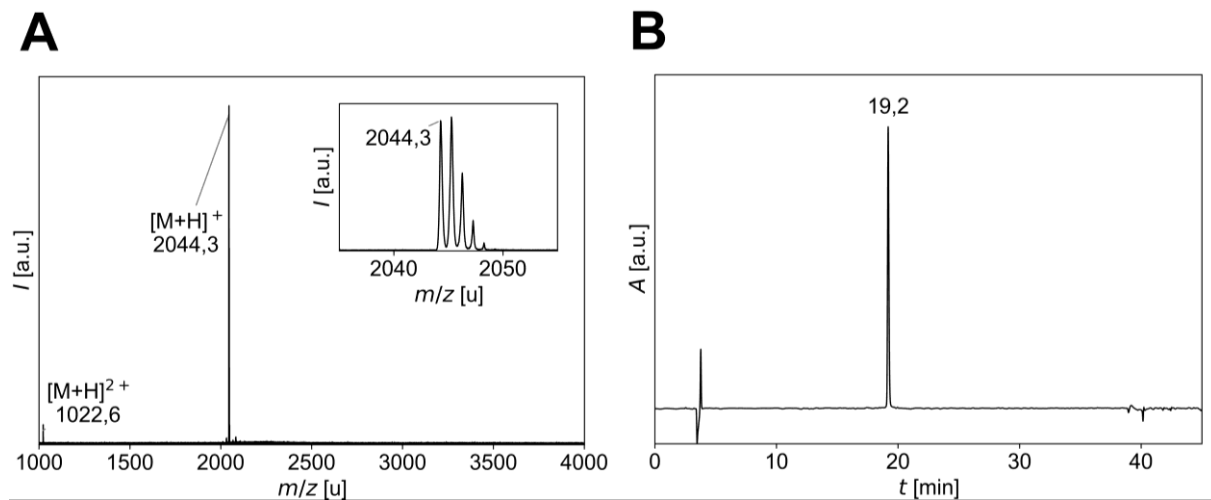


Abbildung 55. A MALDI-TOF Spektrum von reinem **HLHP2.1**. Messmethode: RP_450 - 4000. **B** Analytisches HPLC-Chromatogramm von reinem **HLHP2.1**.

Sequenz: Ac - AAA PAA AAA GPRRRG AAA AAA AAA - NH₂

Summenformel: C₈₅H₁₄₆N₃₄O₂₅

monoisotopische Masse ([M+H]⁺): errechnet: 2044,1 u; gemessen: 2044,3 u

analyt. HPLC: Gradient: 10 – 40 % MeCN in ddH₂O (+ 0,1 % TFA) in 30 Minuten,
 $t_R = 19,2$ min

9.1.5 HLHP3

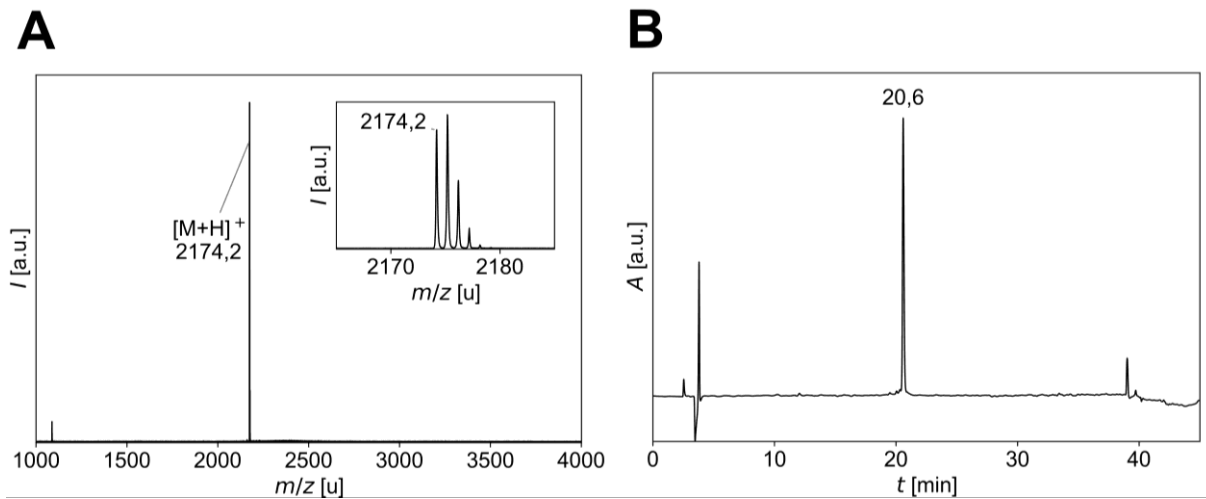


Abbildung 56. A MALDI-TOF Spektrum von reinem **HLHP3**. Messmethode: RP_450 - 4000. **B** Analytisches HPLC-Chromatogramm von reinem **HLHP3**.

Sequenz: Ac - AAA AAA AAA GPRRRRG AAA AAA AAA - NH₂

Summenformel: C₈₉H₁₅₆N₃₈O₂₆

monoisotopische Masse ([M+H]⁺): errechnet: 2174,2 u; gemessen: 2174,2 u

analyt. HPLC: Gradient: 10 – 40 % MeCN in ddH₂O (+ 0,1 % TFA) in 30 Minuten,
 $t_R = 20,6$ min

9.1.6 HLHP3.1

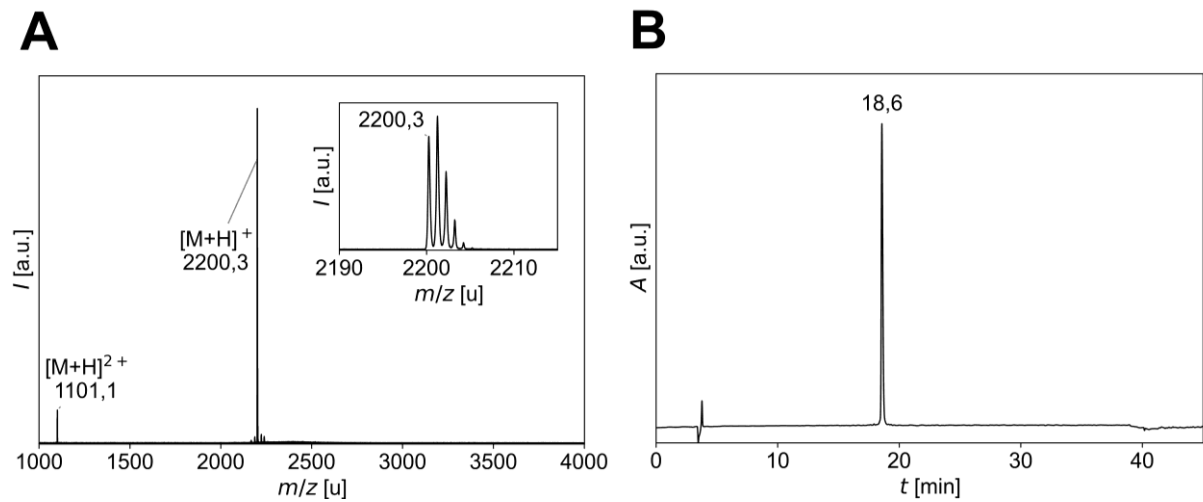


Abbildung 57. A MALDI-TOF Spektrum von reinem **HLHP3.1**. Messmethode: RP_450 - 4000. **B** Analytisches HPLC-Chromatogramm von reinem **HLHP3.1**.

Sequenz: Ac - AAA PAA AAA GPRRRRG AAA AAA AAA - NH₂

Summenformel: C₉₁H₁₅₈N₃₈O₂₆

monoisotopische Masse ([M+H]⁺): errechnet: 2200,2 u; gemessen: 2200,3 u

analyt. HPLC: Gradient: 10 – 40 % MeCN in ddH₂O (+ 0,1 % TFA) in 30 Minuten,
 $t_R = 18,6$ min

9.1.7 HLHP4

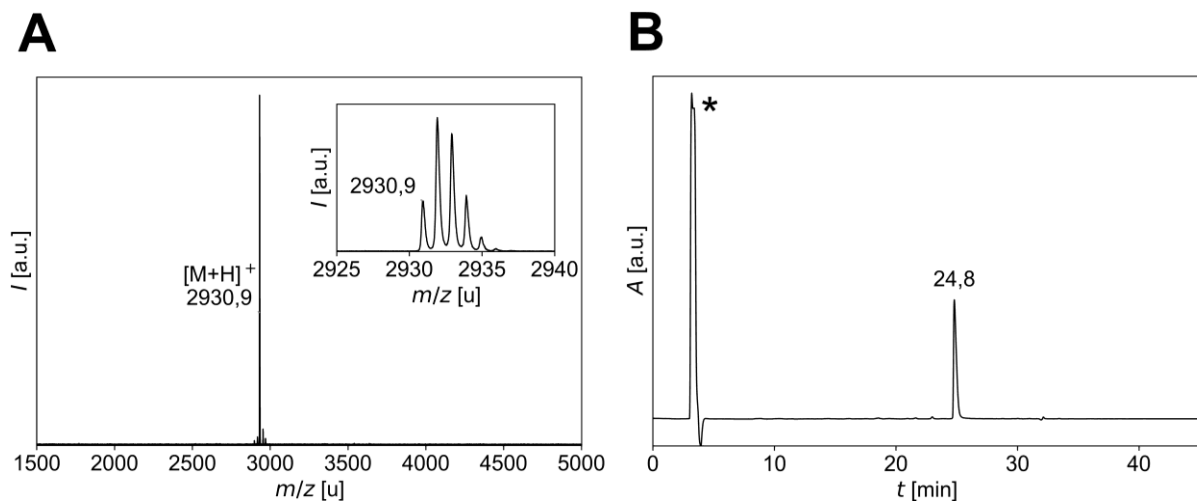


Abbildung 58. **A** MALDI-TOF Spektrum von reinem **HLHP4**. Messmethode: RP_550 - 5000. **B** Analytisches HPLC-Chromatogramm von reinem **HLHP4**. * Injektionssignal durch HFiP.

Sequenz: Ac - LLL LLL LLL GPRRRRG LLL LLL LLL - NH₂

Summenformel: C₁₄₃H₂₆₄N₃₈O₂₆

monoisotopische Masse ([M+H]⁺): errechnet: 2931,0 u; gemessen: 2930,9 u

analyt. HPLC: Gradient: 60 – 100 % MeOH in ddH₂O (+ 0,1 % TFA) in 30 Minuten,
 $t_R = 24,8$ min

9.1.8 HLHP4.1

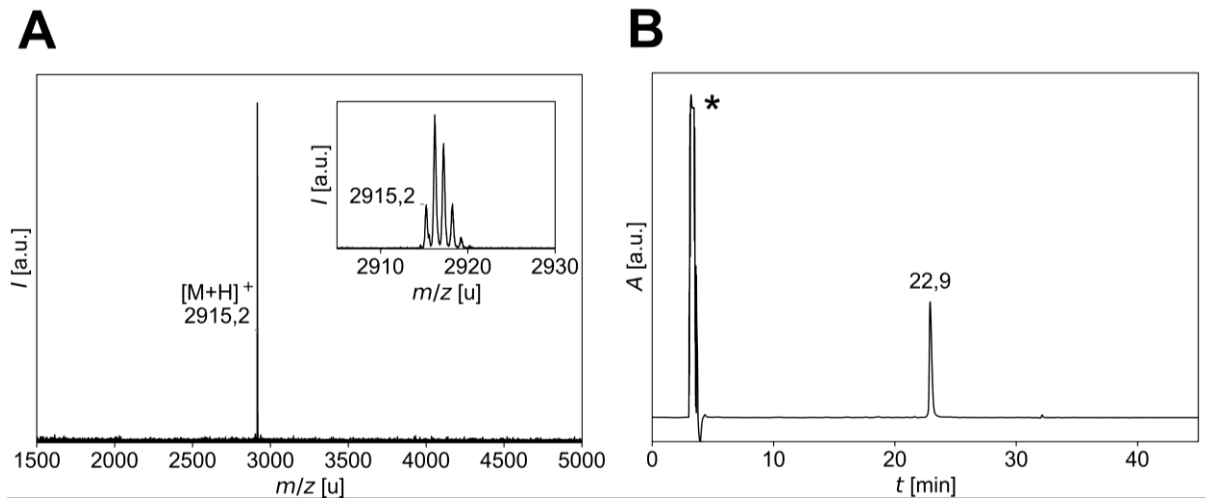


Abbildung 59. **A** MALDI-TOF Spektrum von reinem **HLHP4.1**. Messmethode: RP_550 - 5000. **B** Analytisches HPLC-Chromatogramm von reinem **HLHP4.1**. * Injektionssignal durch HFiP.

Sequenz: Ac - LLL PLL LLL GPRRRRG LLL LLL LLL - NH₂

Summenformel: C₁₄₂H₂₆₀N₃₈O₂₆

monoisotopische Masse ([M+H]⁺): errechnet: 2915,0 u; gemessen: 2915,2 u

analyt. HPLC: Gradient: 60 – 100 % MeOH in ddH₂O (+ 0,1 % TFA) in 30 Minuten,
 $t_R = 22,9$ min

9.1.9 HLHP5

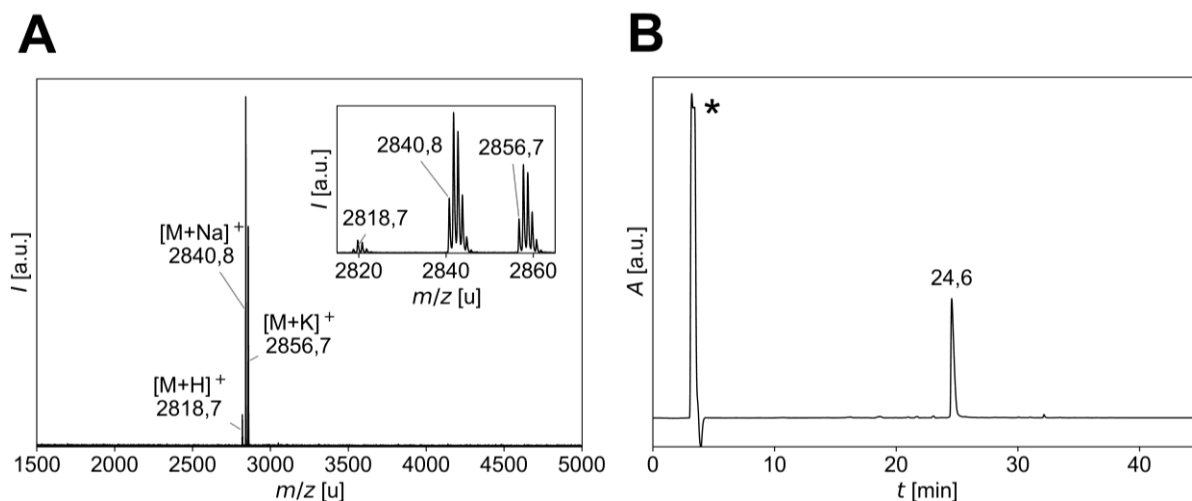


Abbildung 60. **A** MALDI-TOF Spektrum von reinem **HLHP5**. Messmethode: RP_550 - 5000. **B** Analytisches HPLC-Chromatogramm von reinem **HLHP5**. * Injektionssignal durch HFIP.

Sequenz: Ac - LLL LLL LLL GPKKKKG LLL LLL LLL - NH₂

Summenformel: C₁₄₃H₂₆₄N₃₀O₂₆

monoisotopische Masse ([M+H]⁺): errechnet: 2819,0 u; gemessen: 2818,7 u

analyt. HPLC: Gradient: 60 – 100 % MeOH in ddH₂O (+ 0,1 % TFA) in 30 Minuten

$t_R = 24,6$ min

9.1.10 HLHP6

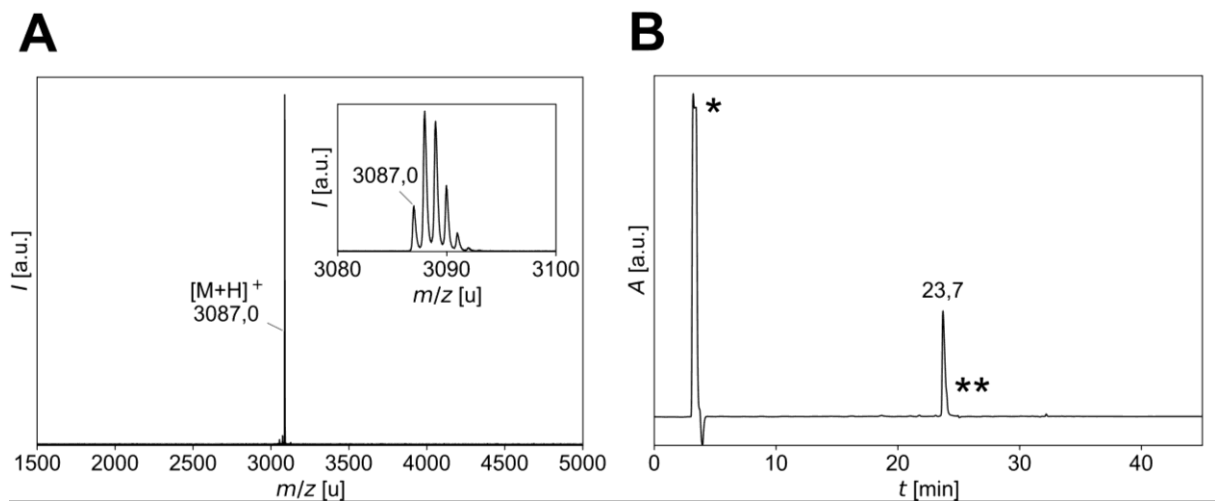


Abbildung 61. **A** MALDI-TOF Spektrum von reinem **HLHP6**. Messmethode: RP_550 - 5000. **B** Analytisches HPLC-Chromatogramm von reinem **HLHP6**. * Injektionssignal durch HFIP. ** Eine Signalverbreiterung ist auch in den analytischen Chromatogrammen vorhanden.

Sequenz: Ac - LLL LLL LLL GPRRRRRG LLL LLL LLL - NH₂

Summenformel: C₁₄₉H₂₇₆N₄₂O₂₇

monoisotopische Masse ([M+H]⁺): errechnet: 3087,1 u; gemessen: 3087,0 u

analyt. HPLC: Gradient: 60 – 100 % MeOH in ddH₂O (+ 0,1 % TFA) in 30 Minuten,
 $t_R = 23,7$ min

9.2 Synthese und Aufreinigung der Monomere

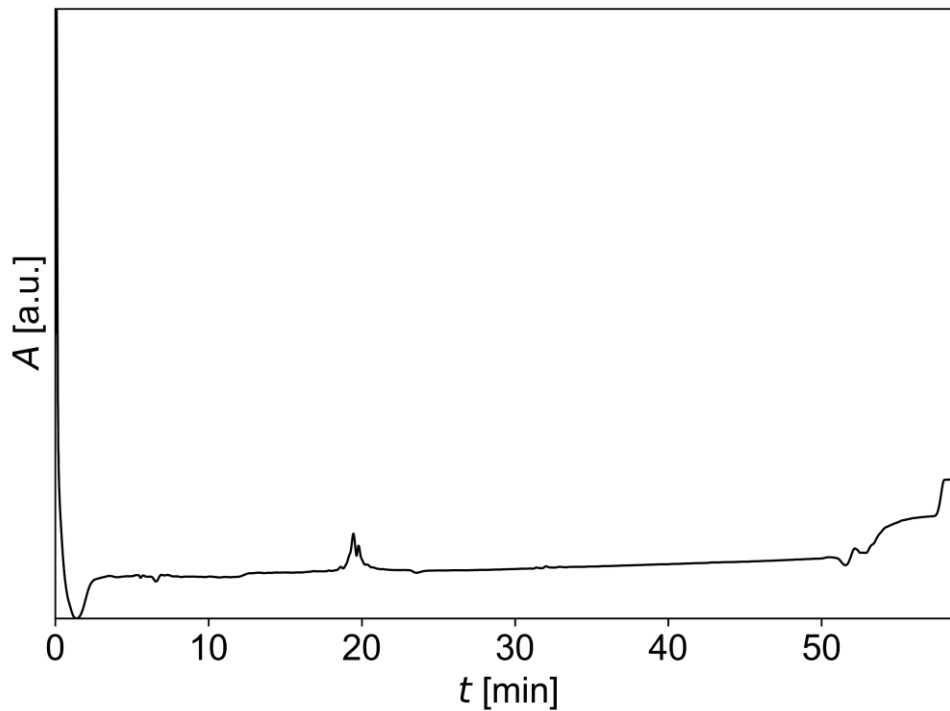


Abbildung 62. Beispielchromatogramm aus der semi-präparativen Aufreinigung von **HLHP6**. In diesem Durchlauf wurde gezielt keine Essigsäure zugegeben. Im Vergleich zu den unten gezeigten Chromatogrammen wird die geringe Signalintensität und die schlechte Trennung der Signale deutlich.

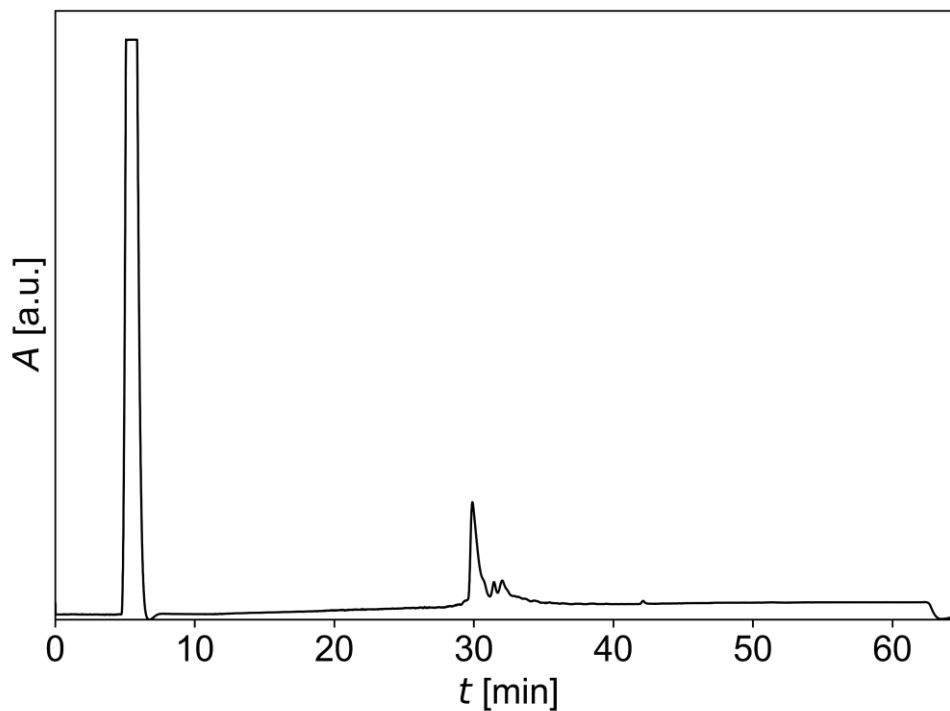


Abbildung 63. Beispielchromatogramm aus der semi-präparativen Aufreinigung von **HLHP6**. Die Signale sind identisch zum Chromatogramm von **HLHP4** in Abbildung 14B. Allerdings zeigt sich für dieses Peptid trotz optimiertem Präparationsprotokoll eine Schulter am Hauptpeak, die in Abbildung 64 nochmal vergrößert dargestellt ist.

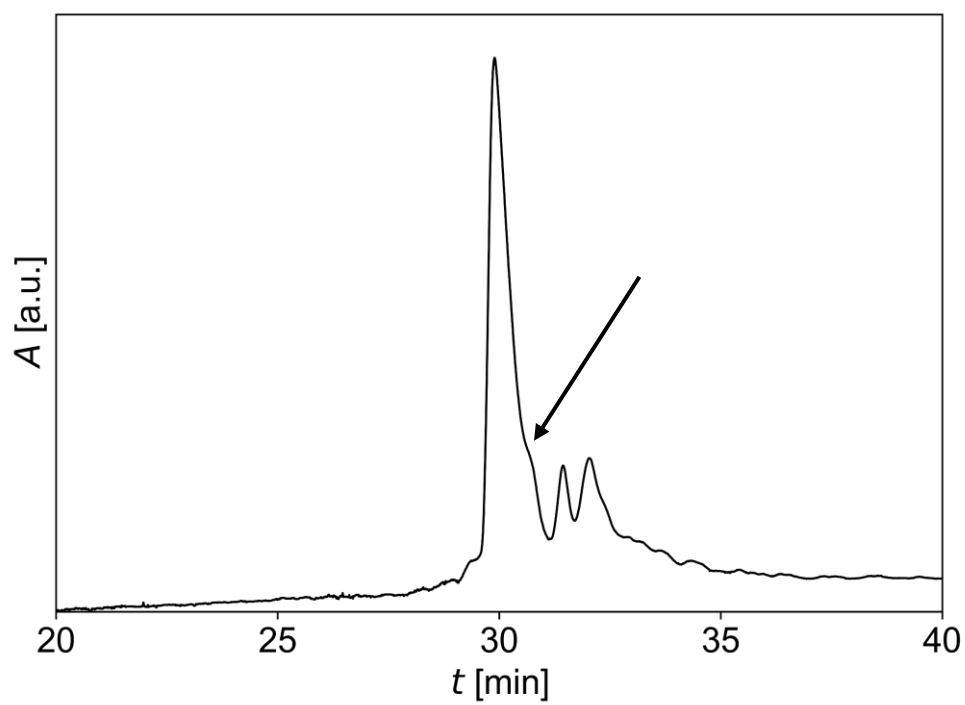


Abbildung 64. Vergrößerte Darstellung der Schulter am Hauptpeak (markiert), die bei allen Aufreinigungen von **HLHP6** sichtbar war.

9.3 Charakterisierung der Leucin Helix-Loop-Helix-Peptide

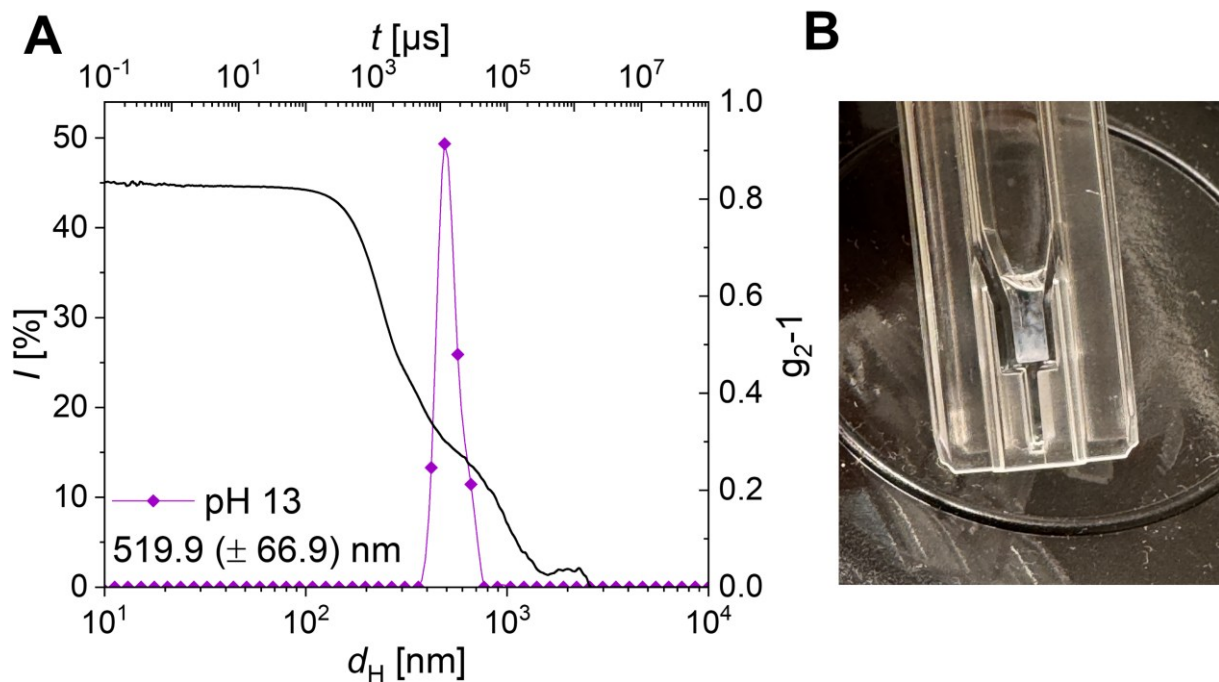


Abbildung 65. **A** DLS-Messung von **HLHP4** nach Zugabe von 1 M Natronlauge zur Partikelsuspension (lila). Trotz der engen Größenverteilung zeigt die Korrelationskurve (schwarz) eindeutig eine Aggregation an. **B** Foto der Küvette nach Zugabe von 1 M Natronlauge zur Partikelsuspension.

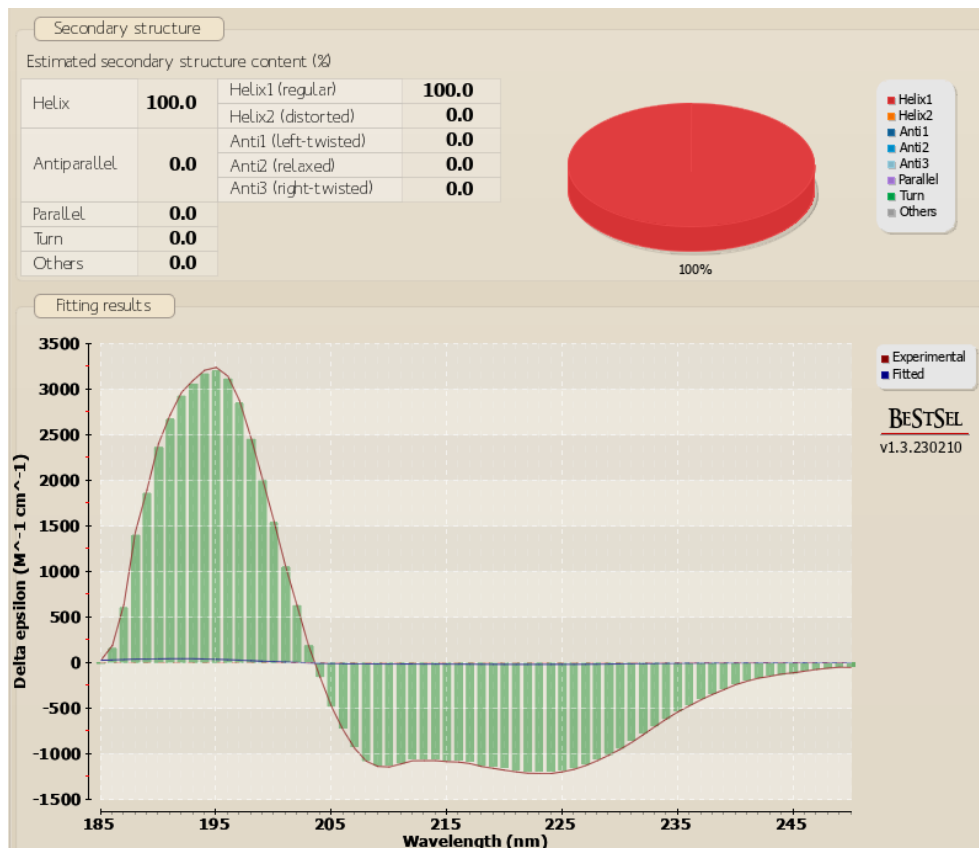


Abbildung 66. *BeStSel*-Analyse der CD-Daten von α -helikalem **HLHP4** bei pH 3 (aus Abbildung 16A). Es wurde kein weiteres Sekundärstrukturelement neben der α -Helix gefunden.

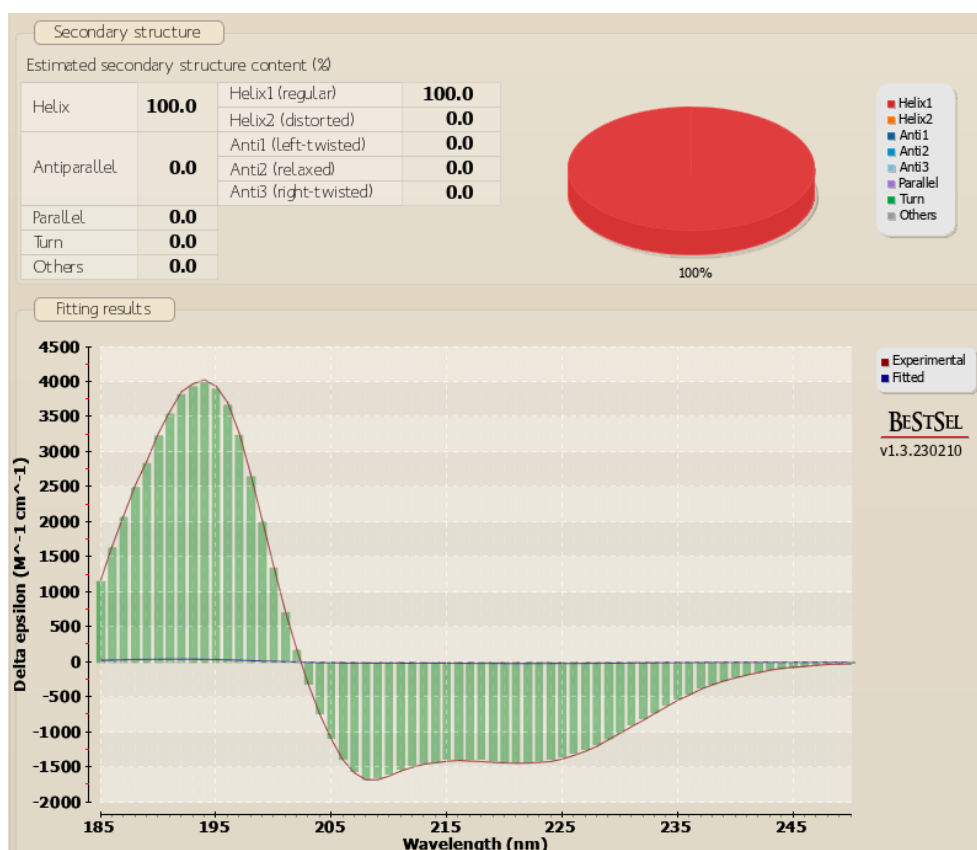


Abbildung 67. BeStSel-Analyse der CD-Daten von α -helikalem HLHP4 bei pH 7 (aus Abbildung 16A). Es wurde kein weiteres Sekundärstrukturelement neben der α -Helix gefunden.

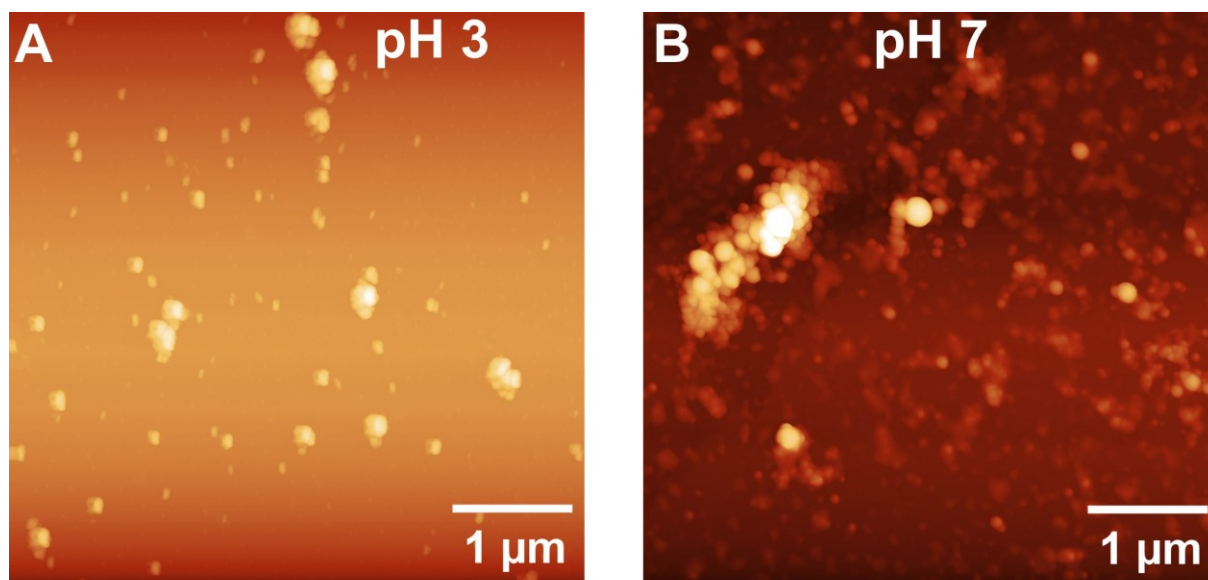


Abbildung 68. **A** Zweidimensionale RKM-Aufnahme ($5 \times 5 \mu\text{m}$) α -helikaler HLHP4-Partikel bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) direkt nach Präparation und Lagerung über Nacht im Vakuum. **B** Zweidimensionale RKM-Aufnahme ($5 \times 5 \mu\text{m}$) α -helikaler HLHP4-Partikel bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) direkt nach Präparation und Lagerung über Nacht im Vakuum. Alle Aufnahmen wurden im intermittierenden Modus (*tapping mode*) aufgenommen.

9.4 Untersuchungen zur Langzeitstabilität der Partikel von α -helikalem HLHP4

Tabelle 22. Entwicklung der hydrodynamischen Durchmesser der Hauptspezies der Partikel von α -helikalem HLHP4 bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) im Verlauf der DLS-Langzeitstudie über eine Woche unter verschiedenen Lagerbedingungen. *Messqualität durch geringe Signalintensität beeinträchtigt.

	pH 3 (4 °C)	pH 3 (RT)	pH 7 (4 °C)	pH 7 (RT)
Tag 0	187 (\pm 11) nm	187 (\pm 11) nm	222 (\pm 32) nm	222 (\pm 32) nm
Tag 1	231 (\pm 18) nm	206 (\pm 17) nm	247 (\pm 36) nm	180 (\pm 73) nm
Tag 3	232 (\pm 52) nm	238 (\pm 12) nm	319 (\pm 20) nm	152 (\pm 46) nm
Tag 5	315 (\pm 44) nm	197 (\pm 53) nm	323 (\pm 60) nm	252 (\pm 141)* nm
Tag 7	338 (\pm 205) nm	254 (\pm 29) nm	429 (\pm 15) nm	425 (\pm 91)* nm

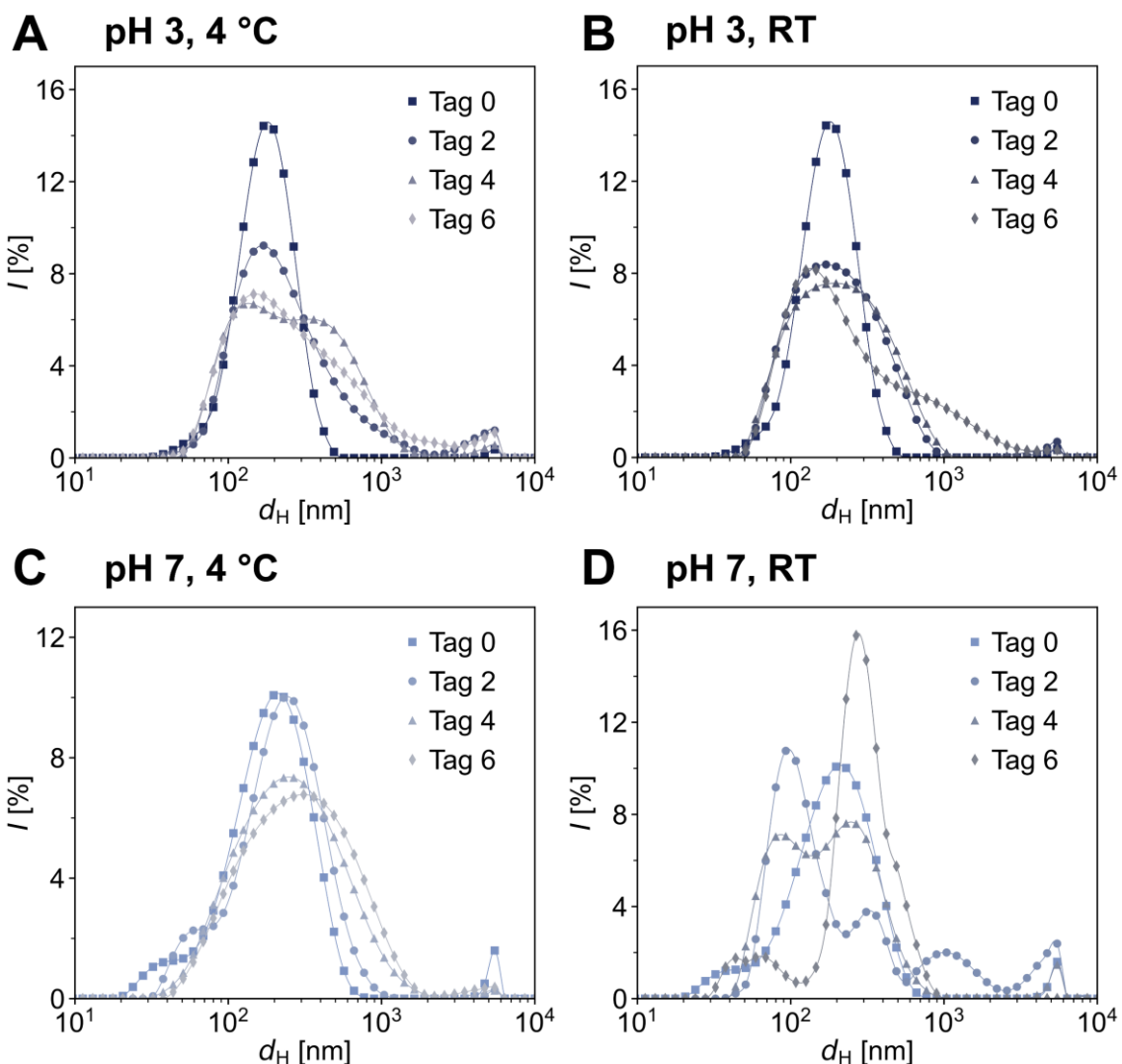


Abbildung 69. Ergänzung: DLS-Größenverteilungen nach Intensität für Peptidpartikel von α -helikalem HLHP4 über den Zeitraum von einer Woche unter verschiedenen Bedingungen. **A** Präparation bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und Lagerung bei 4 °C. **B** Präparation bei pH 3 und Lagerung bei Raumtemperatur. **C** Präparation bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) und Lagerung bei 4 °C. **D** Präparation bei pH 7 und Lagerung bei Raumtemperatur. Dargestellt sind Messungen nach Präparation (Tag 0), Tag 2, Tag 4 und Tag 6. Die Größenwerte der Hauptspezies sind tabellarisch in Tabelle 23 dargestellt. Alle gezeigten Werte sind Mittelwerte von Triplettmessungen.

Tabelle 23. Entwicklung der hydrodynamischen Durchmesser der Hauptspezies der Partikel von α -helikalem **HLHP4** bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) und pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) im Verlauf der DLS-Langzeitstudie über eine Woche unter verschiedenen Lagerbedingungen. Dargestellt sind die ungeraden Tage an denen keine STEM-Messungen durchgeführt wurden. *Messqualität durch geringe Signalintensität beeinträchtigt. **Fehlerwerte sind erhöht, da die Hauptsignale gegeneinander verschoben sind.

	pH 3 (4 °C)	pH 3 (RT)	pH 7 (4 °C)	pH 7 (RT)
Tag 0	187 (\pm 11) nm	187 (\pm 11) nm	222 (\pm 32) nm	222 (\pm 32) nm
Tag 2	223 (\pm 41) nm	265 (\pm 76)* nm	257 (\pm 21) nm	118 (\pm 23) nm
Tag 4	278 (\pm 101)* nm	255 (\pm 18) nm	324 (\pm 30) nm	274 (\pm 57) nm
Tag 6	218 (\pm 70) nm	287 (\pm 122) nm	406 (\pm 101)** nm	328 (\pm 54)* nm

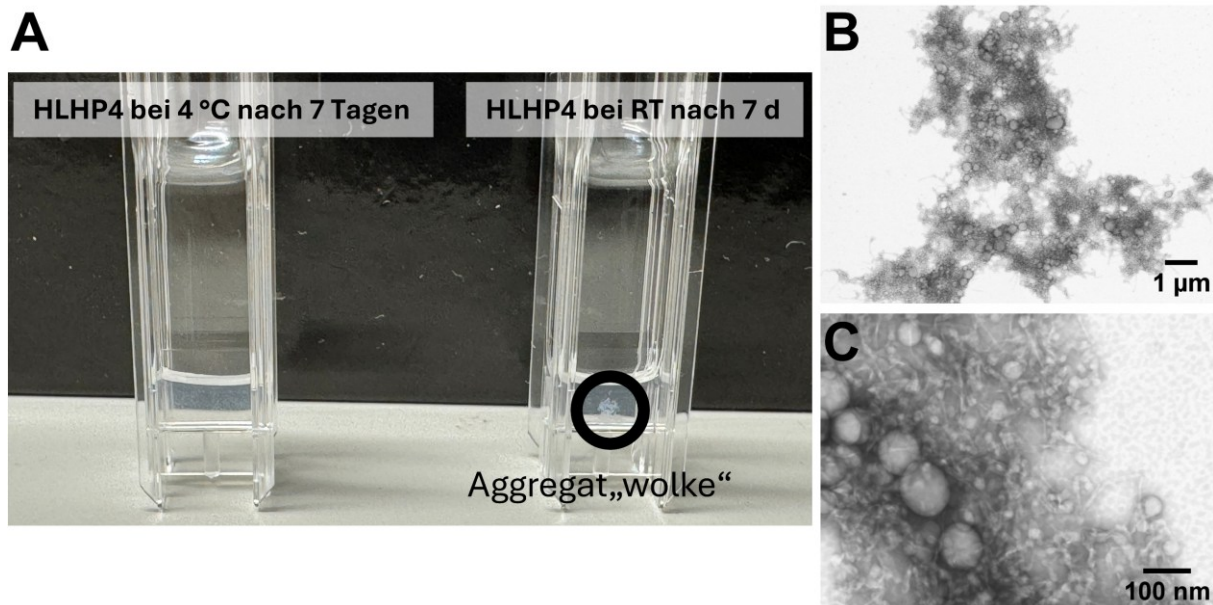


Abbildung 70. A Foto zweier Proben von Partikeln von α -helikalem **HLHP4** nach sieben Tagen Lagerung unter verschiedenen Bedingungen bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). Die linke Probe wurde bei 4 °C gelagert und zeigt leichte Flokkulation. Die rechte Probe wurde bei Raumtemperatur gelagert und zeigt eindeutig Aggregation. B STEM-Mikrographie einer Probe der Aggregatansammlung. C Detailaufnahme eines Bereichs der Aggregatstruktur. Es sind einzelne Partikel und kurze fibrilläre Strukturen zu erkennen.

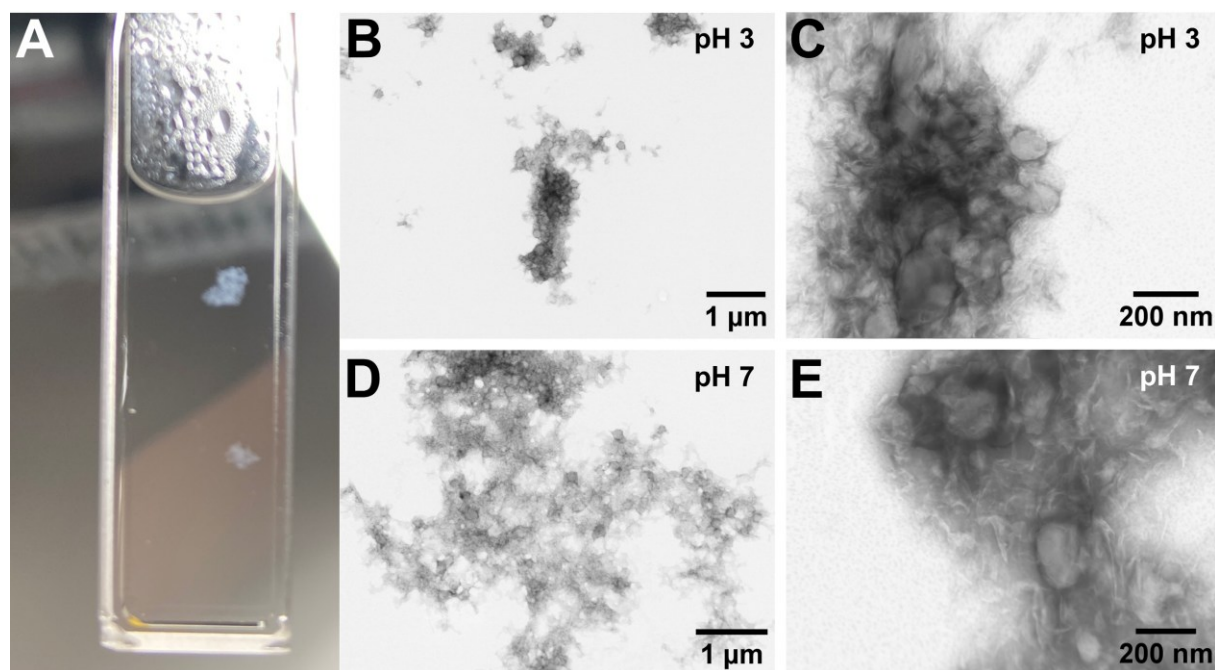


Abbildung 71. A Foto einer CD-Küvette von **HLHP4** nach dem Erhitzen auf 80 °C. **B-C** Niederschlag von **HLHP4** bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mm Citratpuffer) nach Umwandlung der α -helikalen zur β -Faltblatt-Sekundärstruktur. **D-E** Niederschlag von **HLHP4** bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mm Phosphatpuffer) nach Umwandlung der α -helikalen zur β -Faltblatt-Sekundärstruktur.

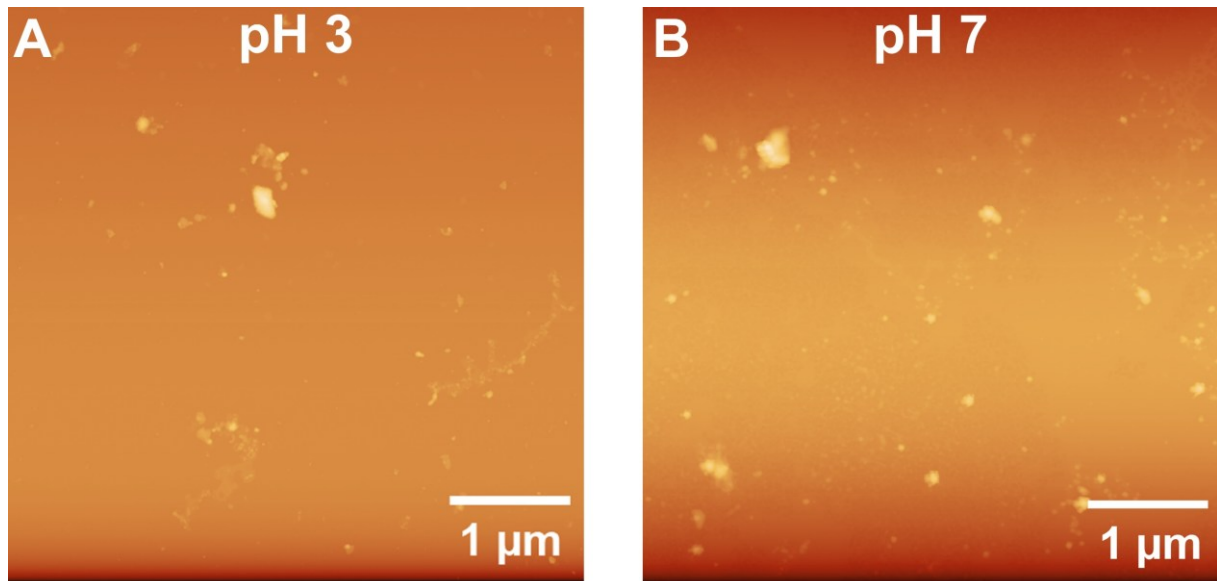
9.5 Charakterisierung der β -Faltblatt-Konformere

Abbildung 72. **A** Zweidimensionale RKM-Aufnahme (5 x 5 μm) der Partikel der β -Faltblatt-Konformere von **HLHP4** bei pH 3 (10 mM Citratpuffer) direkt nach Präparation und Lagerung im Vakuum über Nacht. **B** Zweidimensionale RKM-Aufnahme (5 x 5 μm) der Partikel der β -Faltblatt-Konformere von **HLHP4** bei pH 7 (10 mM Citratpuffer) direkt nach Präparation und Lagerung im Vakuum über Nacht.

Tabelle 24. Entwicklung des hydrodynamischen Durchmessers der Hauptspezies von β -Faltblatt **HLHP4**-Partikeln bei pH 3 (10 mM Citratpuffer) und pH 7 (10 mM Citratpuffer) im Verlauf der DLS-Langzeitstudie über eine Woche unter verschiedenen Lagerbedingungen. **Fehlerwerte sind erhöht, da die Hauptsignale gegeneinander verschoben sind.

	pH 3 (4 °C)	pH 3 (RT)	pH 7 (4 °C)	pH 7 (RT)
Tag 0	113 (\pm 1) nm	113 (\pm 1) nm	114 (\pm 2) nm	114 (\pm 2) nm
Tag 1	113 (\pm 18) nm	143 (\pm 9) nm	295 (\pm 67) nm	287 (\pm 18) nm
Tag 3	115 (\pm 5) nm	138 (\pm 9) nm	415 (\pm 107)** nm	356 (\pm 91) nm
Tag 5	121 (\pm 11) nm	131 (\pm 10) nm	486 (\pm 148)** nm	306 (\pm 103)** nm
Tag 7	116 (\pm 4) nm	307 (\pm 40) nm	514 (\pm 213)** nm	228 (\pm 16) nm

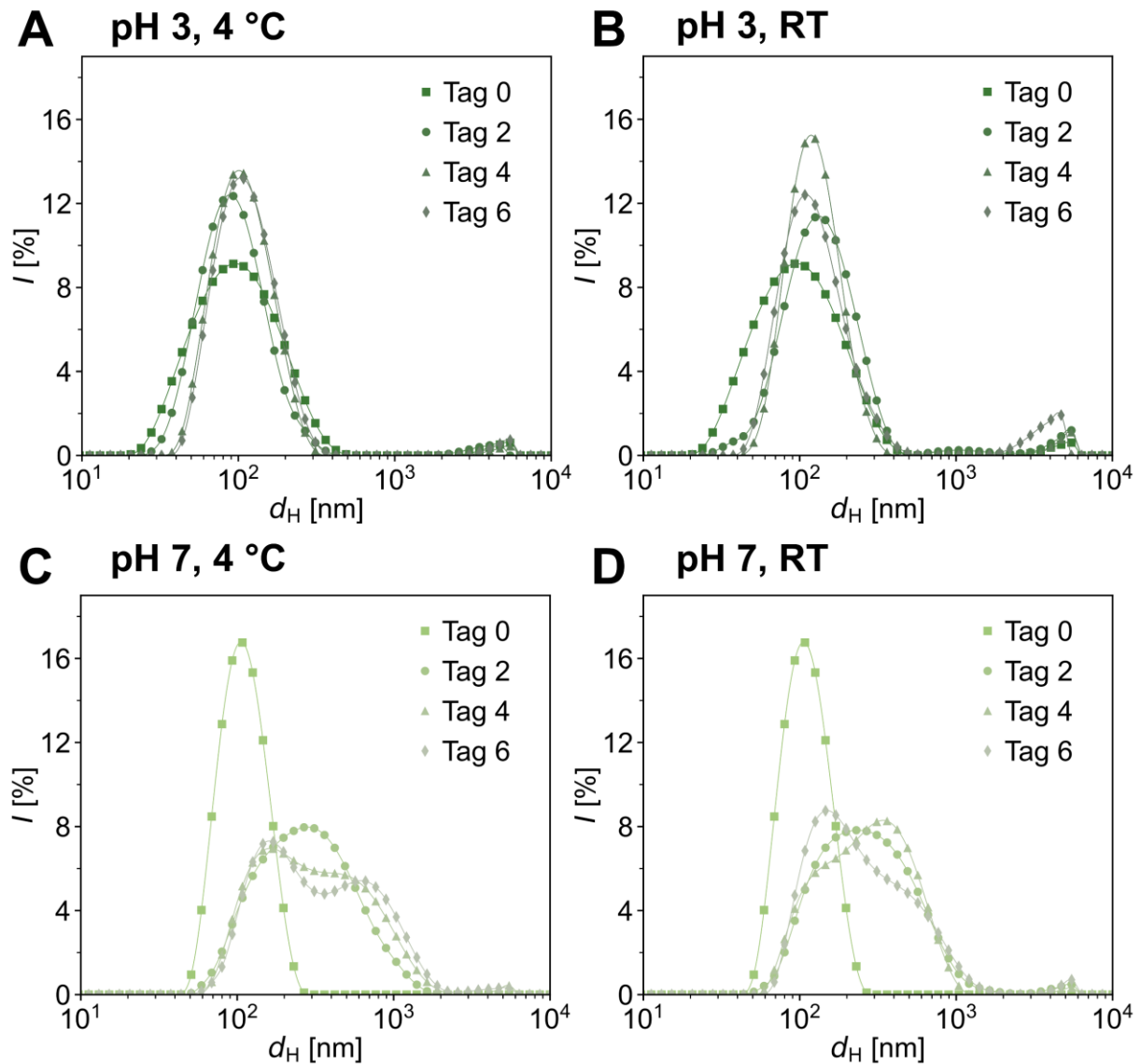


Abbildung 73. Ergänzung: DLS-Größenverteilungen nach Intensität für die Langzeitmessung der β -Faltblatt-Partikel von **HLHP4** an geraden Tagen. **A** Präparation bei pH 3 (10 mM Citratpuffer) und Lagerung bei 4 °C. **B** Präparation bei pH 3 und Lagerung bei Raumtemperatur. **C** Präparation bei pH 7 (10 mM Citratpuffer) und Lagerung bei 4 °C. **D** Präparation bei pH 7 und Lagerung bei Raumtemperatur. Dargestellt sind die Messungen direkt nach der Präparation (Tag 0), Tag 2, Tag 4, Tag 6. Der Verlauf der Größenwerte der Hauptspezies ist in Tabelle 25 dargestellt. Alle gezeigten Werte sind Mittelwerte von Triplettmessungen.

Tabelle 25. Entwicklung des hydrodynamischen Durchmessers der Hauptspezies von β -Faltblatt **HLHP4**-Partikeln bei pH 3 (10 mM Citratpuffer) und pH 7 (10 mM Citratpuffer) im Verlauf der DLS-Langzeitstudie über eine Woche unter verschiedenen Lagerbedingungen. Es sind die geraden Tage aufgeschlüsselt, an denen keine STEM-Aufnahmen gemacht wurden. **Fehlerwerte sind erhöht, da die Hauptsignale gegeneinander verschoben sind.

	pH 3 (4 °C)	pH 3 (RT)	pH 7 (4 °C)	pH 7 (RT)
Tag 0	113 (\pm 1) nm	113 (\pm 1) nm	114 (\pm 2) nm	114 (\pm 2) nm
Tag 2	119 (\pm 21) nm	145 (\pm 13) nm	271 (\pm 79) nm	275 (\pm 100)** nm
Tag 4	114 (\pm 3) nm	131 (\pm 12) nm	313 (\pm 119)** nm	312 (\pm 19) nm
Tag 6	120 (\pm 6) nm	155 (\pm 20) nm	400 (\pm 226)** nm	262 (\pm 87) nm

9.6 Wechselwirkung der Peptidpartikel mit Gast-Molekülen

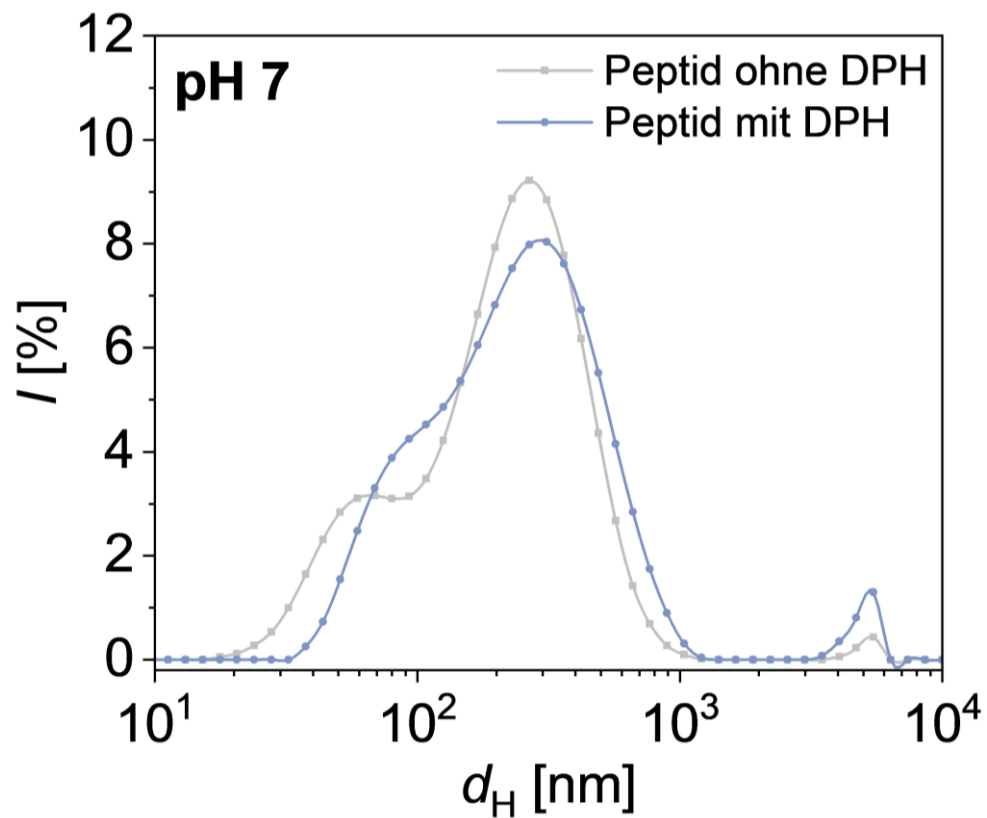


Abbildung 74. Mittelwerte von Triplettmessungen der Partikelgröße α -helikaler **HLHP4**-Partikel vor der Interkalation von DPH (grau) und nach 1 h Inkubation mit dem Farbstoff (hellblau) bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). Es ist nur eine leichte Vergrößerung der Partikel nach Zugabe des Farbstoffs zu erkennen.

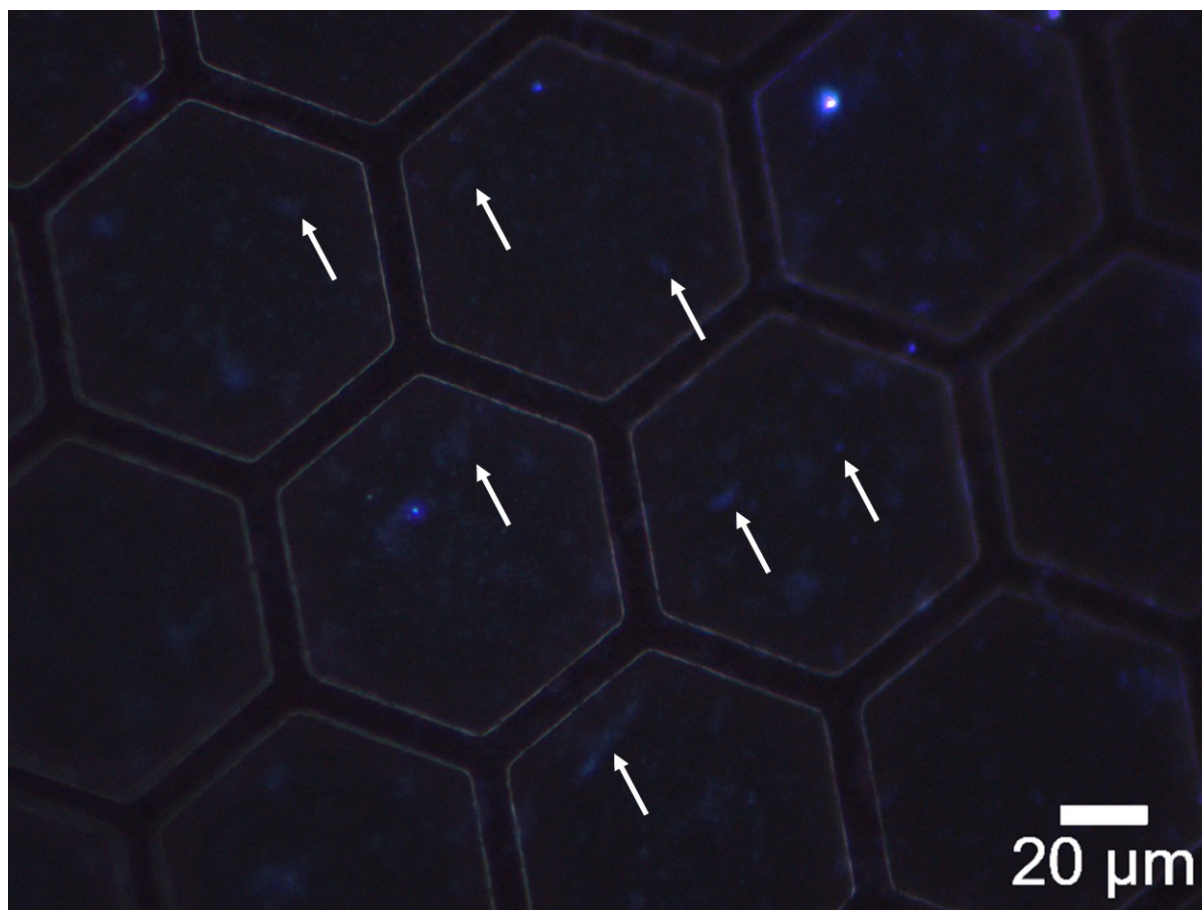


Abbildung 75. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Fluoreszenz von Esculin (5 µm) nach Enkapsulierung in α -helikale HLHP4-Partikel bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). Einige fluoreszente Stellen sind beispielhaft mit Pfeilen markiert (Kontrast angepasst, $\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$, Belichtungszeit 200 ms).

Tabelle 26. Übersicht der verwendeten Säulen bei den Abtrennungsversuchen der Glucose von den Peptidpartikeln in Vorbereitung des Amplex® Red Assay.

Nr.	Name der Säule	Art der Säule
1	PD MiniTrap G-10	Sepharose Säule (Massenlimit 700 Da)
2	PD MiniTrap G-25	Sepharose Säule (Massenlimit 5 kDa)
3	HiTrap Desalting (G-25)	Sepharose Säule (Massenlimit 5 kDa)
4	Nap-5 Sephadex G-25	Sepharose Säule (Massenlimit 5 kDa) für DNA Aufreinigung
5	Capto® Q	starker Anionentauscher mit Trimethylammonium-Gruppen
6	Capto® MMC	schwacher Kationentauscher mit komplexer Kopfgruppe
7	Capto® S	starker Kationentauscher mit Sulfonylgruppe

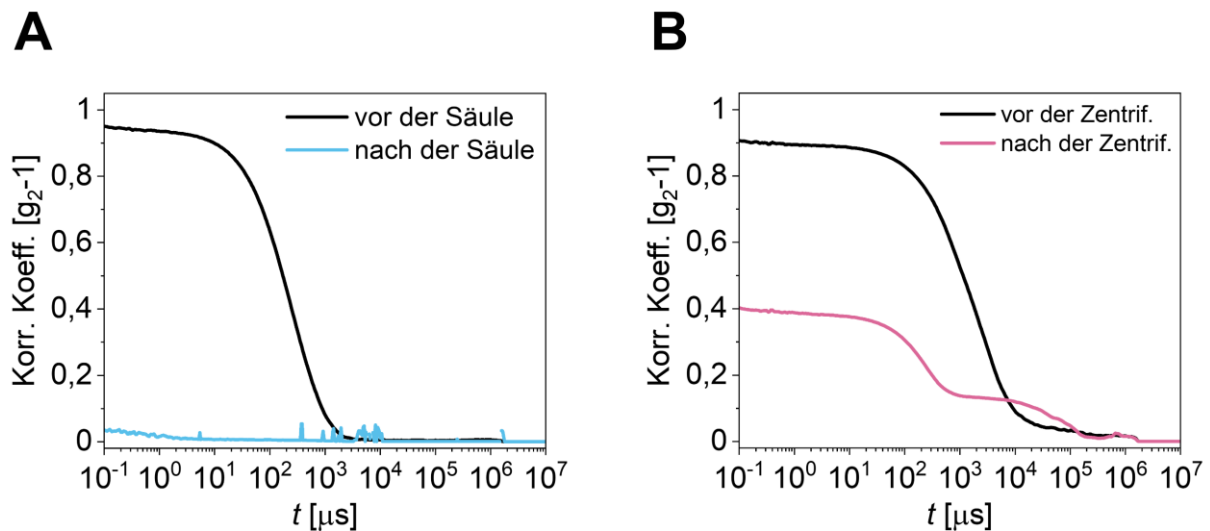


Abbildung 76. A Mittelwerte der Korrelationskurven von je einer Triplettmessung der α -helikalen Peptidpartikel von **HLHP4** vor der Aufgabe auf die Säule (schwarz) und danach/im Durchfluss (blau) bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). Nach der Auftragung auf die Säule ist im Durchfluss ein signifikanter Verlust an Signalintensität aufgrund des Fehlens der Peptidpartikel zu erkennen. **B** Mittelwerte der Korrelationskurven von je einer Triplettmessung der Peptidpartikel von α -helikalem **HLHP4** vor der Zentrifugation im Spin Konzentrador (schwarz) und nach drei Zentrifugationen (pink) bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). Es ist ein deutlicher Verlust der Signalintensität durch die Zentrifugation zu erkennen, da die Partikel während des Zentrifugationsvorgangs zerstört wurden.

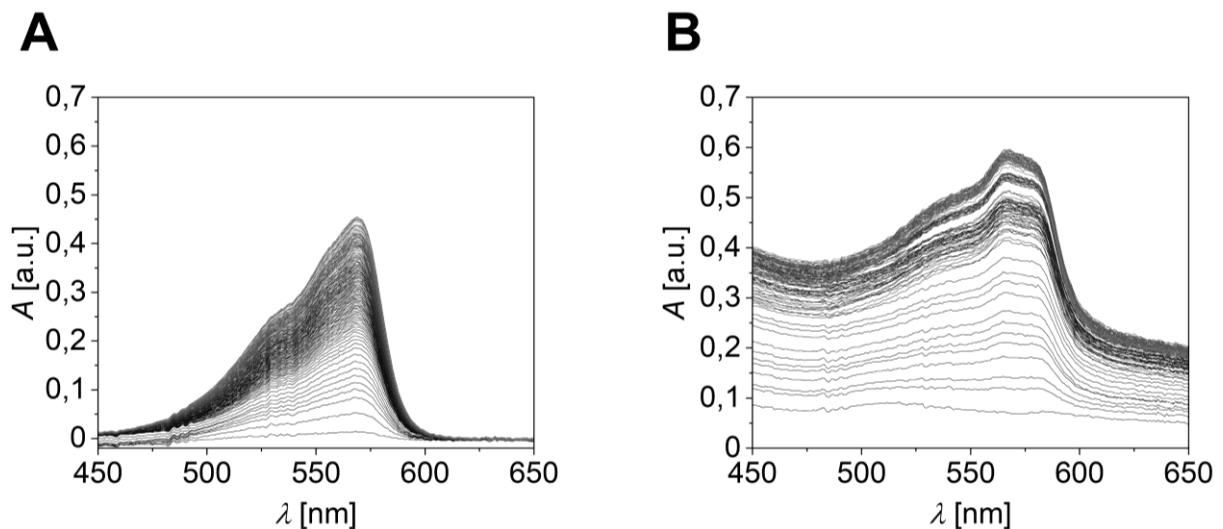


Abbildung 77. A UV/Vis-Spektren einer Referenzmessung des vollständigen Amplex® Red Assay unter Anwesenheit von Glucoseoxidase ohne Peptid. **B** UV/Vis-Spektren einer Messung des vollständigen Amplex® Red Assay unter Anwesenheit von Glucoseoxidase und **HLHP4**. Es ist eine Erhöhung der Basislinie aufgrund der Aggregation des Peptids zu erkennen.

9.7 Änderung der Membranfluidität der HLHP4-Partikel

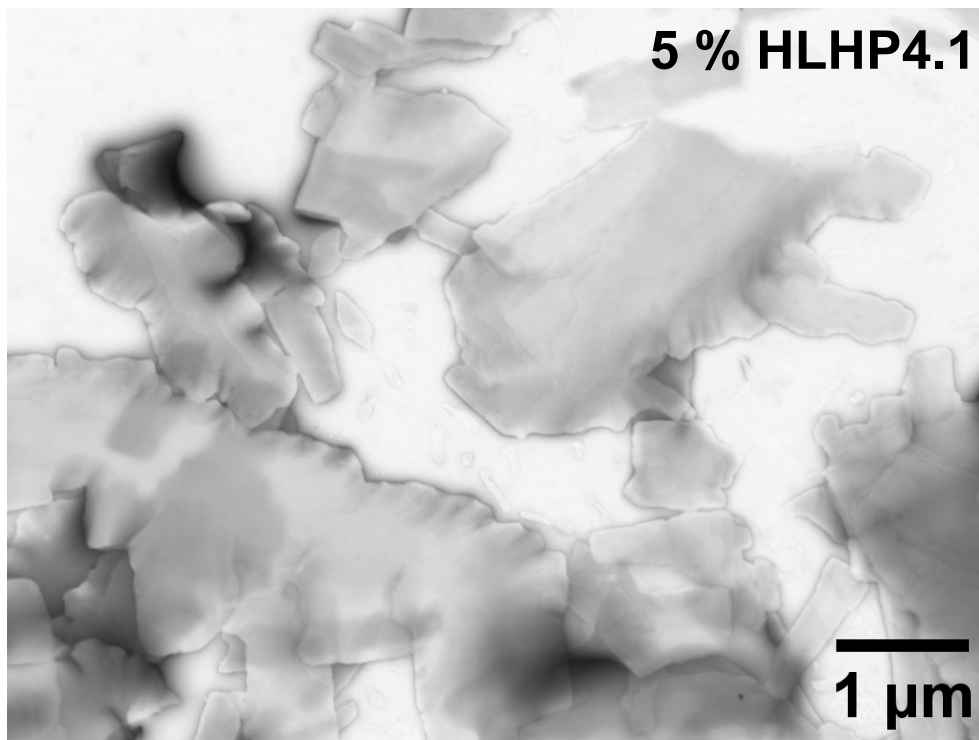


Abbildung 78. STEM-Mikrographie einer Probe von 5 % **HLHP4.1** in **HLHP4** bei pH 7 (10 mM Citratpuffer). Es lässt sich die Bildung von Peptidschichten beobachten, wie sie bei der Probe von reinem **HLHP4** nach fünf Tagen Lagerung bei Raumtemperatur aufgetreten sind. Die Bildung dieser Schichten direkt nach der Präparation der Partikel mit gemischten Anteilen deutet auf die deutlich höhere Membranfluidität und die damit verbundene Instabilität der Assemblate hin.

9.8 Modifikationen der Loop-Sequenz

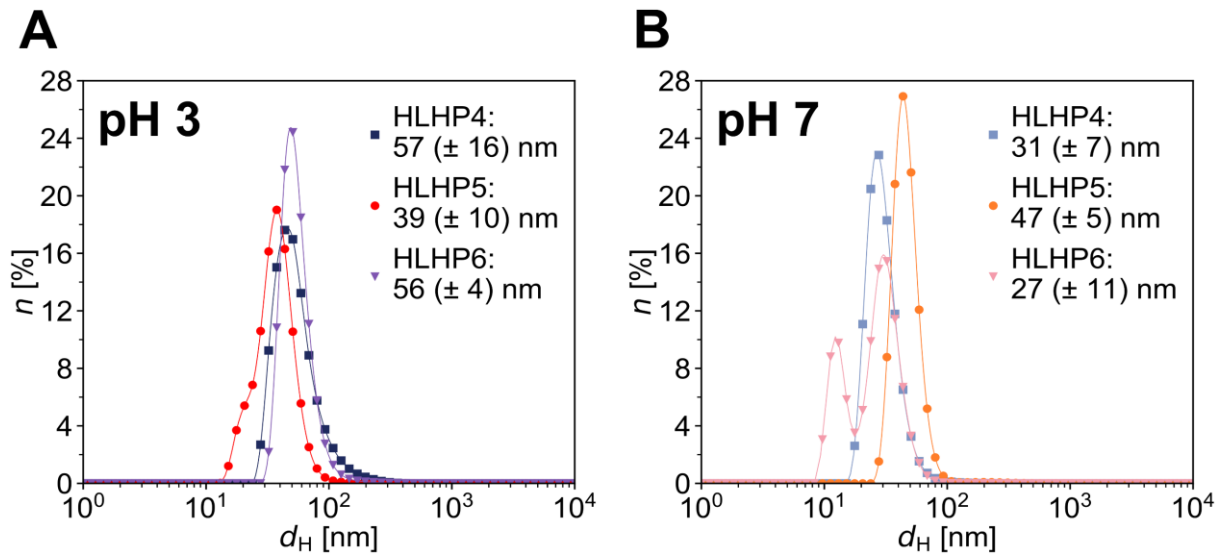


Abbildung 79. **A** Größenverteilungen nach Anzahl n für Partikel von **HLHP4** (blau), **HLHP5** (rot) und **HLHP6** (violett) direkt nach der Präparation bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer). **B** Größenverteilungen nach Anzahl n für Partikel von **HLHP4** (hellblau), **HLHP5** (orange) und **HLHP6** (pink) direkt nach der Präparation bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer). Dargestellt sind Mittelwerte von Triplettmessungen einer repräsentativen Probe.

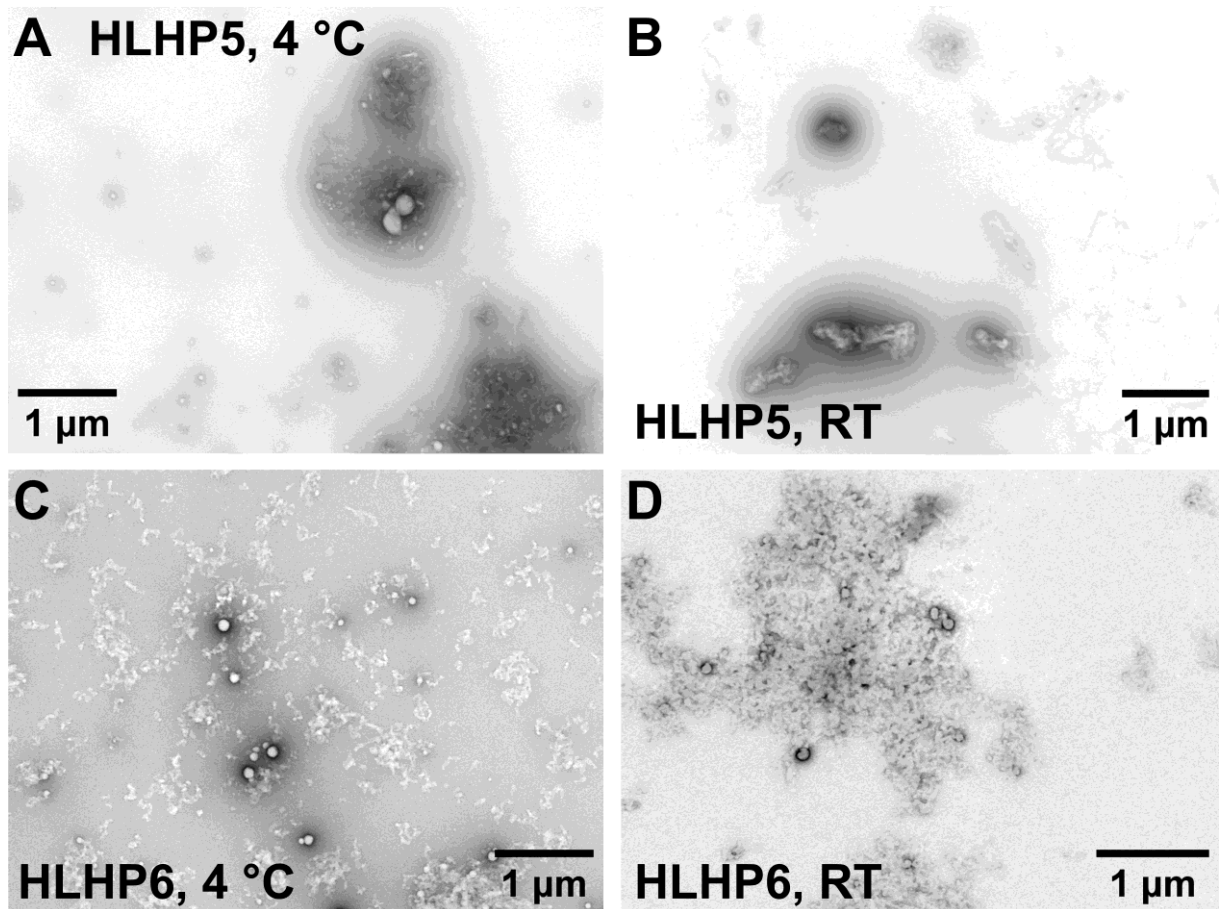


Abbildung 80. **A** STEM-Mikrographie von α -helikalen Partikeln von **HLHP5** bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) nach Lagerung bei 4 °C für 24 Stunden. **B** STEM-Mikrographie von α -helikalen Partikeln von **HLHP5** bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) nach Lagerung bei Raumtemperatur für 24 Stunden. **C-D** STEM-Mikrographien der α -helikalen Partikel von **HLHP6** bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) nach einer Lagerung für 24 Stunden bei 4 °C (**C**) oder Raumtemperatur (**D**). In allen Fällen ist eine signifikante Anzahl an Aggregaten zu erkennen.

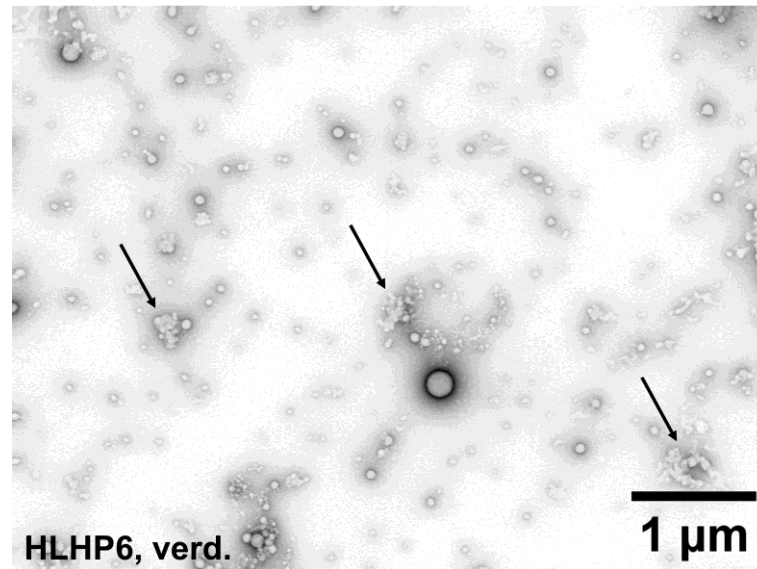


Abbildung 81. STEM-Mikrographie einer Probe von α -helikalen **HLHP6**-Partikeln bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) direkt nach der Präparation. Die Peptidkonzentration war vor dem Auftragen auf das Substrat auf 50 % der Ausgangskonzentration verdünnt worden. Aggregate sind mit Pfeilen markiert.

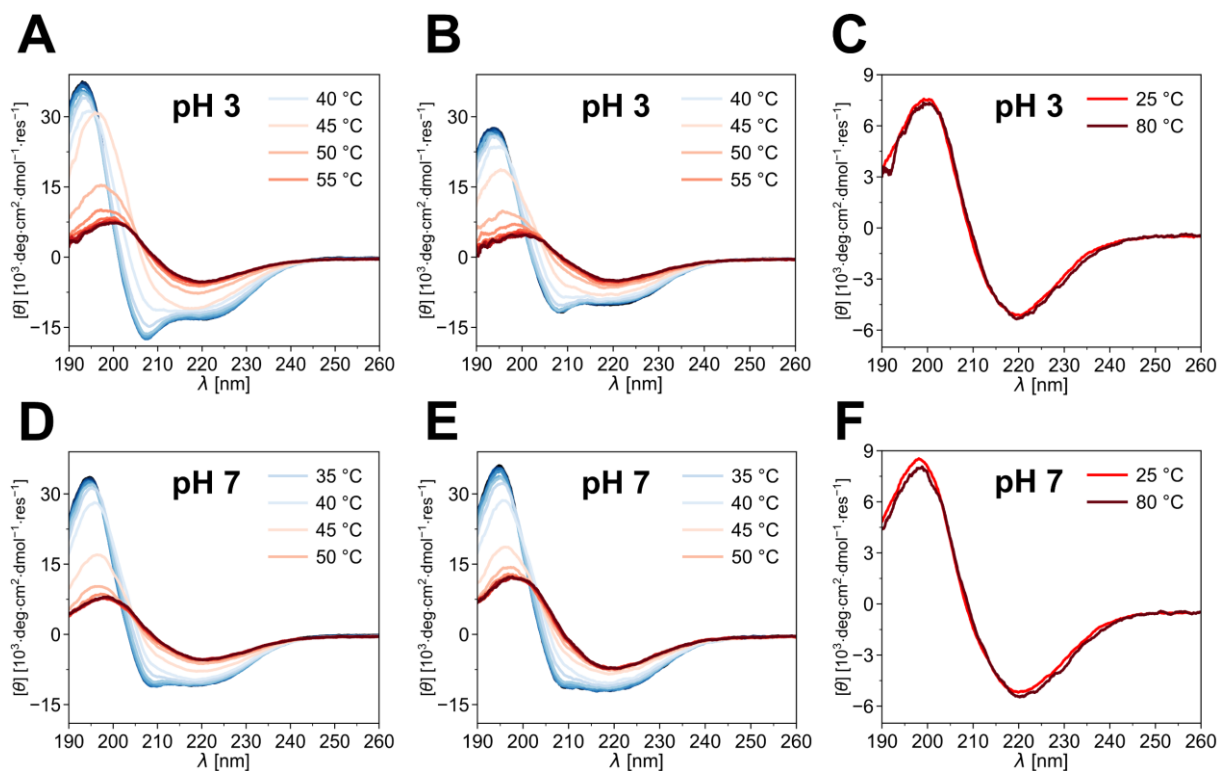


Abbildung 82. A-B CD-Spektren zur Sekundärstrukturumwandlung von α -helikalem **HLHP5** bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) für einen Temperaturanstieg von 0 °C bis 80 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min. Die markierten Kurven zeigen die Bereiche der signifikanten Sekundärstrukturänderung in Richtung β -Faltblatt-Sekundärstruktur. C CD-Spektrum von **HLHP5** bei pH 3 nach Erhitzen auf 80 °C (dunkelrot) und anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur (rot). D-E CD-Spektren zur Sekundärstrukturumwandlung von α -helikalem **HLHP5** bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) für einen Temperaturanstieg von 0 °C bis 80 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min. Die markierten Kurven zeigen die Bereiche der signifikanten Sekundärstrukturänderung in Richtung β -Faltblatt-Sekundärstruktur. F CD-Spektrum von **HLHP5** bei pH 7 nach Erhitzen auf 80 °C (dunkelrot) und anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur (rot).

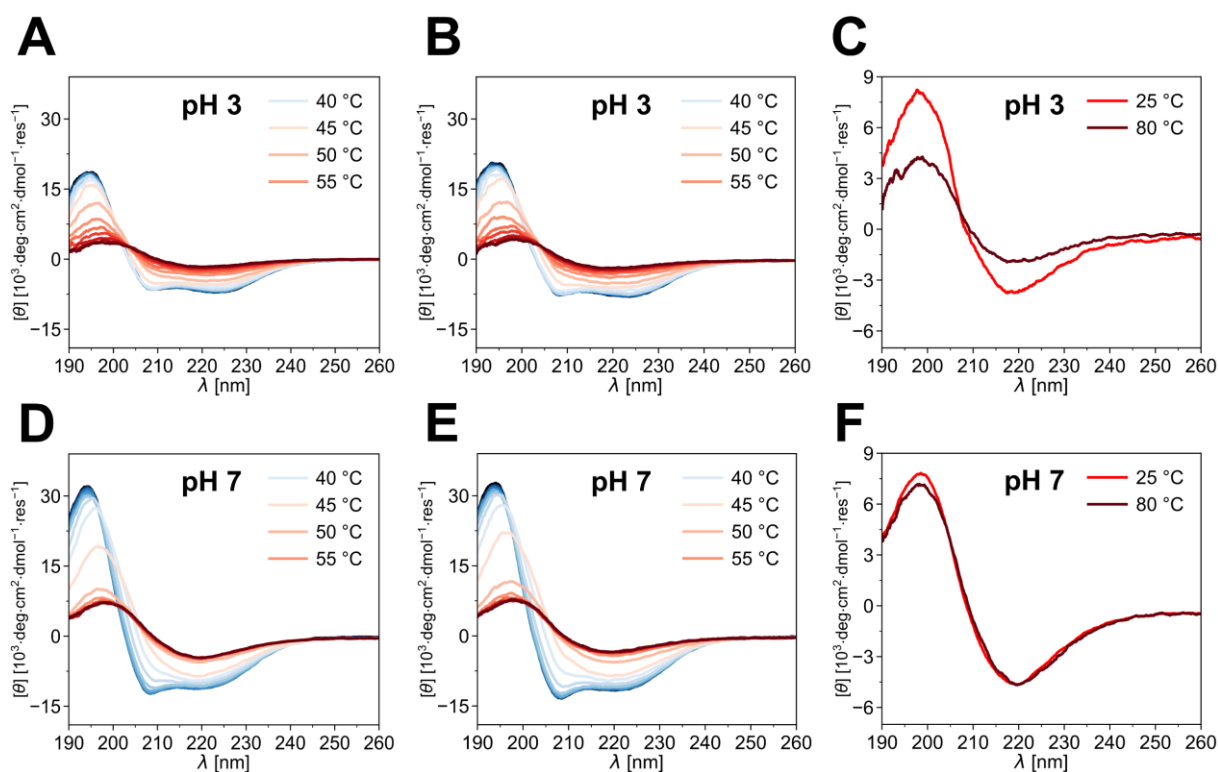


Abbildung 83. A-B CD-Spektren zur Sekundärstrukturumwandlung von α -helikalem **HLHP6** bei pH 3 (5 % EtOH in 10 mM Citratpuffer) für einen Temperaturanstieg von 0 °C bis 80 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min. Die markierten Kurven zeigen die Bereiche der signifikanten Sekundärstrukturänderung in Richtung β -Faltblatt-Sekundärstruktur. C CD-Spektrum von **HLHP6** bei pH 3 nach Erhitzen auf 80 °C (dunkelrot) und anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur (rot). D-E CD-Spektren zur Sekundärstrukturumwandlung von α -helikalem **HLHP6** bei pH 7 (5 % EtOH in 1 mM Phosphatpuffer) für einen Temperaturanstieg von 0 °C bis 80 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min. Die markierten Kurven zeigen die Bereiche der signifikanten Sekundärstrukturänderung in Richtung β -Faltblatt-Sekundärstruktur. F CD-Spektrum von **HLHP6** bei pH 7 nach Erhitzen auf 80 °C (dunkelrot) und anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur (rot).

Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Franziska Thomas für die ganze Unterstützung im Laufe der Jahre bedanken. Es war ein langer Weg vom ersten Praktikum bis hierher. Aber es hat mir viel Freude bereitet, gemeinsam an diesem Thema zu arbeiten. Manchmal mag es nicht so ausgesehen haben, aber ich habe es nie bereut mich damals für dieses Thema entschieden zu haben. Meine Peptide sind mir wirklich ans Herz gewachsen und ich möchte mich bei Dir für das Vertrauen bedanken, das Du mir vom ersten Moment an bei diesem Projekt entgegengebracht hast. Das Thema hat viel Zeit gebraucht sich zu entwickeln; trotzdem hast Du mich nie getrieben und mir irgendwelche Zwänge auferlegt. Wenn ich Hilfe gebraucht habe, hattest Du immer ein offenes Ohr für mich und hast mich, im Zweifel, in die richtige Richtung gestupst.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Eva Blasco für die sehr schnelle und unkomplizierte Übernahme der Zweitprüferin-Rolle und für die Bereitschaft sich mit meinem Thema auseinanderzusetzen. An dieser Stelle geht auch ein großer Dank an den AK Blasco als Ganzes. Ich habe unsere gemeinsame Zeit im CAM sehr genossen. Danke an Clara für ihr Engagement im Cluster und an der Uni; danke an Clara und Samantha für ihre Vorbildfunktion, Britta für die coole gemeinsame Zeit beim Bouldern und Philipp für die vielen gemeinsamen Jahre seit unserer Ersti-Woche.

Ein Dank geht auch an die beiden weiteren Professoren des Prüfungskomitees, ohne deren Anwesenheit ein hoffentlich erfolgreicher Abschluss der Arbeit sicherlich nicht möglich wäre. Zudem geht mein Dank an die Gruppe von Prof. Rasmus Schröder für die Kooperation, die tollen Anregungen zum Projekt und besonders für den Zugang zu den Elektronenmikroskopen. Ein ganz herzlicher Dank an Ronald für die Einführung ans SEM und die vielen persönlichen Gespräche. Ohne dein Engagement hätte ich meine Leidenschaft für die Elektronenmikroskopie nicht entdeckt.

Ein Dankeschön auch an Sadi und Prof. Kerstin Göpfrich für die Hilfe mit dem Projekt und den hilfreichen Input während der Meetings. Danke auch an William, Mai und den Rest des AK Göpfrich für die Unterstützung bei den unzähligen Versuchen zur GUV-Präparation.

Das gesamte Projekt hätte nicht funktioniert ohne den Zugang zu vielen verschiedenen Messgeräten. Daher möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Jürgen Groß für den Zugang zum MALDI-TOF bedanken, bei Prof. Kemerink und Maxi für die Einführung ins AFM und bei Prof. Klein und Heiko Rudi für die Bereitstellung des CD-Spektrometers. Ein besonders herzlicher Dank geht an die Feinmechaniker des Instituts. Ohne eure tolle Arbeit und eure Fachkenntnis wären manche Reparaturen an den HPLCs nicht möglich gewesen.

Ebenso danken möchte ich Prof. Kivala und dem ganzen AK Kivala für den Zugang zum Fluoreszenzspektrometer und der tollen gemeinsamen Zeit. Besonderer Dank an Maxi für den gemeinsamen Weg seit dem Bachelor. Deine Unterstützung in den ersten Semestern hat mir

durch die schwere Anfangszeit geholfen. Danke auch an Laura für die vielen Gespräche und die tolle Zusammenarbeit im Labor.

Natürlich will ich auch die wichtigsten Leute bei der ganzen Sache nicht vergessen. Vielen, vielen Dank an den ganzen AK Thomas. Danke an alle, die meine Zeit in dieser Gruppe so unvergesslich gestaltet haben. Ihr seid die Besten überhaupt und ich hätte mir keine anderen Leute gewünscht, um diese Zeit zu erleben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Vanessa und Truc Lam. Ohne Vanessas Hilfe wäre das Projekt wahrscheinlich schon am Anfang gestorben und ich wäre nie an den Punkt gekommen darüber mal eine Doktorarbeit schreiben zu können. Danke, dass du so krass und so ein toller Mensch bist. Nicht weniger dankbar bin ich Truc Lam, den antike Quellen wahrscheinlich als den Sohn Athenes beschrieben hätten. Danke, dass du mir all die Jahre bei Fachfragen mehr als ausführlich Auskunft gegeben hast und mir meine Beschwerden in Ruhe angehört hast. Ich bin sehr dankbar für unsere gemeinsamen Gespräche über sehr viele und sehr komische Themen. Ich hoffe, dass du in Australien von giftigen Tieren verschont bleibst und die Zeit da genießen kannst.

Danke an Niklas und Marius für alles was wir gemeinsam erlebt haben und dafür, dass wir während der letzten Jahre so eng zusammengewachsen sind. Danke an Raphaela, Chandan, Marcos und Agi, dass ihr mich in eure komische Gruppe assimiliert habt. Ganz lieben Dank an Agi, die beste Technikerin an der Uni Heidelberg, für die gemeinsame Zeit an den HPLCs.

Danke an Jenny und Chiara für eure Freundschaft. Danke an Josefine für die Freundschaft und die vielen tollen Beiträge im Ruprecht. Danke an Rebeka, Hary, Mike und Julius für die gemeinsame Zeit. Danke an Vivian und Friedrich für die tolle Zeit am Hockenheimring und den Einblick in euer Projekt. Danke an Mona, Theresa, Dominik und Charlotte für die Unterstützung mit dem Projekt. Vielen Dank an Morten für die Unterstützung mit dem Projekt und vielen schönen schematischen Zeichnungen, die ich hier verwenden durfte. Danke an Ana für die drei Wochen Tropfenzählen und die vielen lustigen, ernsten und hilfreichen Gespräche.

Ein besonderer Dank geht an Marco für die vielen Erklärstunden vor den Klausuren und die vielen tiefgründigen Gespräche. Diesen Titel hättest du mindestens genauso verdient. Danke an Lukas für die sehr, sehr lange Freundschaft, die vielen Unterrichtsstunden zu Computern und die Herzlichkeit, mit der ihr mich in eure Familie aufgenommen habt.

Als letztes möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Oma bedanken. Danke, dass ihr mich immer unterstützt habt, immer an mich geglaubt habt und mich jedes Mal neu aufgebaut habt. Ohne eure Hilfe, eure Fürsorge, eure Motivation und euer Vertrauen wäre ich nie so weit gekommen. Danke für alles!

Publikationen

(ORCID-iD: 0009-0002-9541-892X)

Publikationen als Hauptautor:

„Spherical Particles from Amphiphilic Helix-Loop-Helix Peptides”

T. Heim, C. Helm, M. Mosbach, E. R. Curticean, V. Reusche, R. Schröder, F. Thomas*
(in Vorbereitung)

Enthält Teile der Arbeiten zu **HLHP4**, **HLHP5** und **HLHP6**.

Publikationen als Co-Autor:

1. „Photoredox-Responsive Self-Assembling Particles from Organohybrid-Tripeptides”

L. Brühle, **T. Heim**, K. Rösel, M. R. Conde González, E. Misselwitz, E. R. Curticean, F. Rominger, R. Schröder, M. Kivala*, F. Thomas* (in Vorbereitung)

2. „Peptide Boronic Acids by Late-Stage Hydroboration on the Solid Phase”

M. Werner, J. Brinkhofer, L. Hammermüller, **T. Heim**, T. L. Pham, J. Huber, C. Klein*, F. Thomas*, *Adv. Sci.* **2024**, 202400640.

Posterpräsentationen

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Konferenzen in Form von Posterpräsentationen mit dem Titel „Peptide Membranes From *de novo* Designed Helix-Loop-Helix Peptides“ vorgestellt:

1. Future 3D Additive Manufacturing, Schöntal, Deutschland, 2023
2. German Peptide Symposium, Jena, Deutschland, 2023
3. Life-Inspired Engineering Molecular Systems, Heidelberg, Deutschland, 2024
4. European Peptide Symposium, Florenz, Italien, 2024
5. im Rahmen mehrerer Veranstaltungen des Exzellenzclusters „3D Matter Made To Order“

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung für die Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Universität Heidelberg.

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „Peptidmembranen aus de novo designten Helix-Loop-Helix-Peptiden“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel (inkl. KI-basierter Hilfsmittel) benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Heidelberg,

Thomas Heim