

4 Å.^[7] **gA** transportiert einwertige Kationen. Innerhalb dieser Gruppe von Kationen sinkt die Permeabilität mit steigender Dehydratationsenergie (Eisenman-I-Selektivität),^[8] da die Passage des Kations durch den Kanal ein teilweises Entfernen der Hydrathülle erfordert. Die aufgewendete Dehydratationsenergie am Kanaleingang wird zum Teil durch die Bindungsenergie infolge von Wechselwirkungen des Kations mit den Carbonylsauerstoffatomen, die das Innere der Pore auskleiden, ausgeglichen. Dieses klassische Konzept der elektrostatischen Anziehung als Ursache von Ionenselektivität wird durch neuere theoretische Untersuchungen zur Selektivität von Proteinkanälen gestützt.^[9] Vergleicht man den K⁺-Transport mit dem Cs⁺-Transport, führt die höhere Dehydratationsenergie von K⁺ zu einer Cs⁺/K⁺-Selektivität von 3:2 (basierend auf Leitfähigkeitsmessungen).

Ionenkanäle

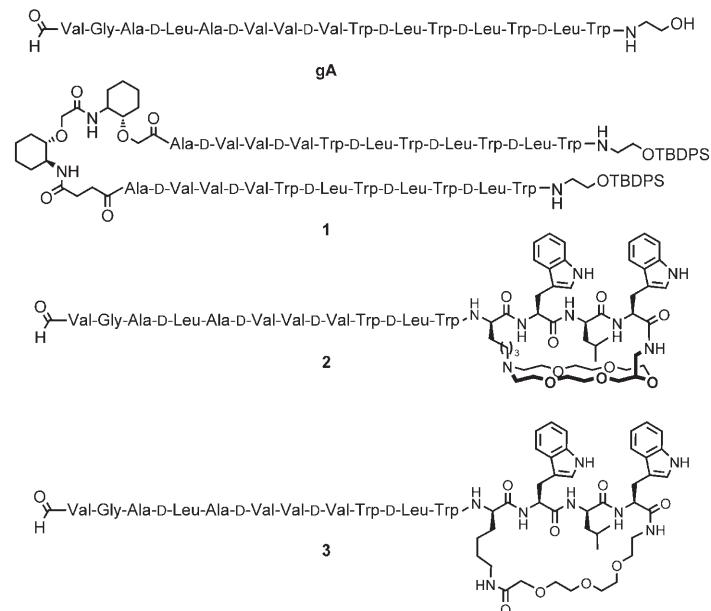
DOI: 10.1002/ange.200502570

Ionenkanäle aus Kronenether-Gramicidin-Hybriden: Ionenselektivität durch Unterstützung des Dehydratationsvorgangs**

Jochen R. Pfeifer, Philipp Reiß und Ulrich Koert*

Ionenselektivität ist eine Grundvoraussetzung für die Funktion natürlicher Ionenkanäle bei der zellulären Regulation und Kommunikation.^[1] In biologischen Ionenkanalproteinen finden sich daher Ionen-Selektivitätsfilter, die durch passgenaues Arrangement von Proteinuntereinheiten gebildet werden.^[2] Eine vorhersagbare Ionenselektivität ist dementsprechend eine der zentralen Anforderungen für den Einsatz synthetischer Kanäle in biologischen Systemen, z. B. zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Ionenkanaldefekte hervorgerufen werden („channelopathies“). Auch wenn in den letzten Jahren beträchtliche Fortschritte bei der Synthese und Charakterisierung künstlicher Ionenkanäle gemacht wurden,^[3] beschränken sich ionenselektive Kanäle noch auf sehr wenige Beispiele.^[4,5]

Gramicidin A (**gA**) ist eine geeignete Leitstruktur für das Design synthetischer Ionenkanäle.^[6] Die kanalaktive Konformation ist eine β^{6,3}-Helix mit einem Durchmesser von



Der präparative Einbau von zwei Cyclohexylether-δ-Aminosäure-Einheiten in den zentralen Bereich eines Bernsteinsäure-verknüpften Gramicidinderivats führte zu Verbindung **1** (TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl), die eine Cs⁺/K⁺-Selektivität von 10:1 aufweist.^[5] Die beiden Ether-sauerstoffatome wirken darin als zusätzliche Kationenbindungsstellen im Kanalinneren und führen so zu der erhöhten Cs⁺/K⁺-Selektivität.

Kronenether sind einerseits in der Lage, Alkalimetallkationen in Abhängigkeit von ihrem Durchmesser selektiv zu komplexieren, andererseits sind ihre Komplexierungs- und Dekomplexierungsgeschwindigkeiten kompatibel mit dem Ionenfluss von 10⁷ s⁻¹ durch den Kanal.^[10] Daher sind Kronenether prinzipiell interessante Bausteine für synthetische Ionenkanäle – allerdings wurden bisher noch keine bedeutsamen Auswirkungen von Kronenethern auf die Ionenselektivität beobachtet.^[11]

Mit dem Ziel, zusätzliche Bindungsstellen am Kanaleingang zu schaffen und so Einfluss auf die Kationendesolvataion zu nehmen, wurde das Kronenether-Gramicidin-Hybrid

[*] Dipl.-Chem. J. R. Pfeifer, Dr. P. Reiß, Prof. Dr. U. Koert
Fachbereich Chemie
Philipps-Universität Marburg
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+49) 6421-28-25677
E-mail: koert@chemie.uni-marburg.de

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, den Fonds der Chemischen Industrie, die Volkswagen-Stiftung und die Pinguin-Stiftung gefördert. Wir danken Dr. U. Linne für ESI-TOF-Massenspektren sowie N. Jede und Prof. U. Diederichsen (Universität Göttingen) für den Zugang zu ihrem CD-Spektrometer.

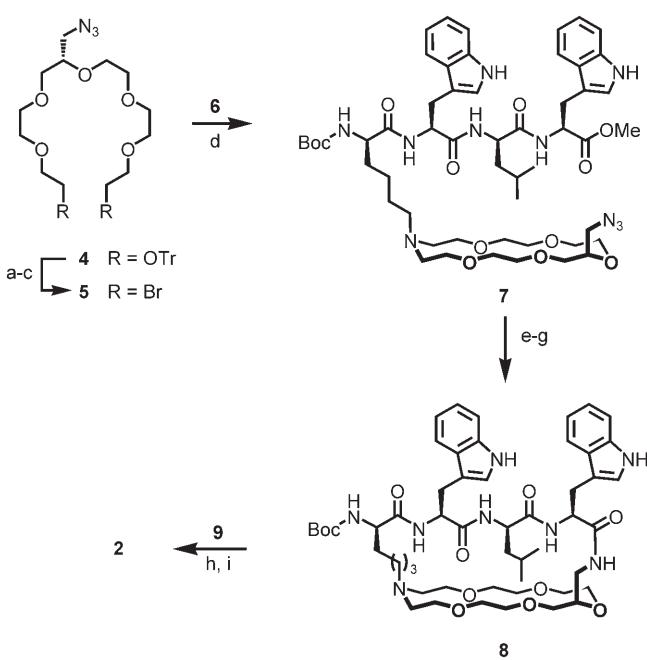
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

2 entworfen. In **2** ist ein D-Leucin^[12] der **gA**-Sequenz durch D-Lysin ersetzt. Sowohl dessen ε-Stickstoffatom als auch der C-terminale 2-Hydroxyethylamino-Rest von **gA** sind hier Teil eines Aza[18]kronen-6-Ethers (Zweipunktanknüpfung). Für eine wirksame Funktion muss der Kronenether an mindestens zwei Positionen mit dem Kanal verbunden werden.^[12] Das Oligoethylenglycolbügel-**gA**-Hybrid **3** wurde zu Vergleichszwecken synthetisiert.

Die Synthese von **2** ging von (*S*)-Glycidoltsosylat^[13] aus, das zunächst in den Bistriylether **4** umgewandelt wurde (siehe Hintergrundinformationen). Um eine wässrige Aufarbeitung zu vermeiden, erfolgte die Spaltung der Tritylether in **4** mithilfe von Triethylsilan und einer katalytischen Menge TES-Triflat^[14] sowie anschließender Zugabe von 5 % HF in CH₃CN (Schema 1). Nach dem Entfernen der Lösungsmittel wurde das Diol als Rohprodukt über das Bismesylat in das Dibromid **5** überführt. Bei der Cyclisierung zum Azakronenetherpeptid **7** wurde der Templateffekt des Kaliumkations genutzt, indem eine Lösung des Dibromids **5** in CH₃CN tropfenweise zu einer siedenden Lösung des Tetrapeptids **6** und K₂CO₃ in CH₃CN gegeben wurde.^[15] Um eine Cyclisierungsausbeute von 50 % zu erreichen, war dabei die Gegen-

wart von zusätzlichem, löslichem KPF₆ erforderlich. Nach Reduktion des Azids und Verseifung des Methylesters konnte das Azakronenetherpeptid **8** durch Peptidcyclisierung in 10⁻³ M Lösung in einer sehr guten Ausbeute von 67 % erhalten werden. Boc-Entschützung und anschließende Peptidkuppelung mit dem Undecamer **9** (alle Peptide wurden durch eine Fragmentkupplungsstrategie in Lösung synthetisiert,^[16] siehe Hintergrundinformationen) schlossen die Synthese der Zielverbindung **2** ab. Um die Epimerisierung des aus **9** gebildeten Aktivesters zurückzudringen, war in diesem letzten Schritt die Desaktivierung des basischen tertiären Aminstickstoffs des Azakronenethers zwingend erforderlich. Dies gelang durch Versetzen mit zehn Äquivalenten KPF₆.

Die Ionenkanalaktivität wurde in planaren Lipiddoppelschichten untersucht.^[17] Abbildung 1 zeigt repräsentative Einzelkanal-Stromspuren für a) **gA**, b) **2** und c) **3**, gemessen in 1 M CsCl- (linke Spalte) und 1 M KCl-Lösung (rechte Spalte). Die Cs⁺-Leitfähigkeit von **2** ist geringer als die von **gA**, wogegen die K⁺-Leitfähigkeit gestiegen ist. Verbindung **2** ist damit das erste **gA**-Derivat mit einer veränderten Leitfähigkeitsreihenfolge (K⁺ > Cs⁺)!



Schema 1. Synthese von **2**: a) 1. Et₃SiH, TES-OTf (0.01 Äquiv.), CH₂Cl₂, 20 °C, 1 h; 2. 5 % HF in CH₃CN, RT, 30 min; b) MsCl, NEt₃, CH₂Cl₂, 0 °C; c) LiBr, Aceton, 56 °C, 4 h, 79 % (drei Stufen); d) **6**, K₂CO₃, KPF₆, CH₃CN, 81 °C, 16 h, 50%; e) H₂, Pd/C, MeOH, 40 °C, 2 h, 82%; f) LiOH, THF/H₂O (4:1), 0 °C, 4 h, 99%; g) HATU, HOAt, EtNiPr₂, CH₂Cl₂/DMF (3:1), -18 → 0 °C, 12 h, 67%; h) 50 % TFA in CH₂Cl₂, EDT, 20 °C, 20 min, 80%; i) **9**, HATU, HOAt, EtNiPr₂, KPF₆ (10 Äquiv.), CH₂Cl₂/DMF (3:1), 25 °C, 15 min, 64%. Tr = Triphenylmethyl, TES = Triethylsilyl, Tf = Trifluormethansulfonyl, Ms = Methansulfonyl, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, HATU = O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, HOAt = 7-Aza-1-hydroxy-1*H*-benzotriazol, DMF = N,N-Dimethylformamid, TFA = Trifluoressigsäure, EDT = Ethandithiol.

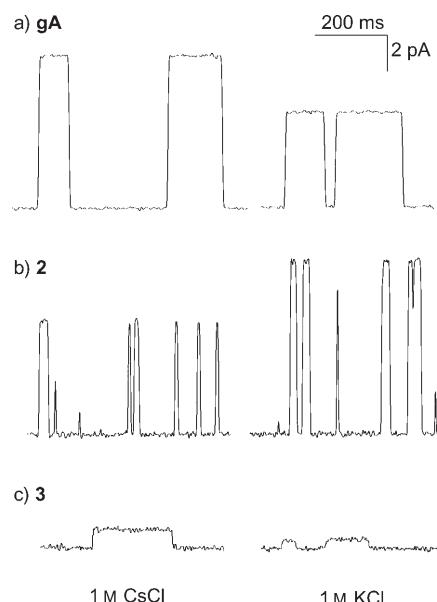


Abbildung 1. Einzelkanal-Stromspuren für **gA**, Azakronenether-Gramicidin **2** und Oligoethylenglycolbügel-Gramicidin **3**. 1 M MCl, 200 mV, DPhPC/DPhPG (4:1).

Vier Beobachtungen zur Leitfähigkeit von **2** sind bemerkenswert (Tabelle 1):

- Trotz der umfangreichen Modifikationen der Gramicidinstruktur liegen die Leitfähigkeiten in der gleichen Größenordnung wie für **gA**. Üblicherweise führen der Einbau künstlicher Strukturen^[5,18] ebenso wie einfache Substitutionen von Aminosäuren^[19] zu drastisch reduzierten Leitfähigkeiten; siehe die Einzelkanal-Stromspur für den Oligoethylenglycolbügel-Hybridkanal **3** (Abbildung 1c).
- Die Leitfähigkeiten für Cs⁺ sind um 19 % in DPhPC/DPhPG (4:1) und sogar um 54 % in DOPC gegenüber den

Tabelle 1: Leitfähigkeiten $\Lambda^{[a]}$ für **2** und **gA**, bestimmt für verschiedene Kationen und Phospholipide.

Membran	$\Lambda(2)$	$\Lambda(gA)$	$\Lambda(2)$	$\Lambda(gA)$	$\Lambda(2)$	$\Lambda(gA)$	$\Lambda(2)$	$\Lambda(gA)$
DOPC ^[b]	11.4	14.6	22.4	20.6	27.0	38.4	16.0	36.7
DPhPC/DPhPG ^[c]	18.8	14.3	37.7	27.8	55.8	47.2	33.3	40.9

[a] Leitfähigkeiten in [μ S], bestimmt aus den Steigungen der Strom-Spannungs-Kurven (siehe Hintergrundinformationen). Der Fehlerbereich beträgt $\pm 5\%$, wie durch mindestens zwei unabhängige Messungen ermittelt wurde. [b] DOPC = 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin; [c] DPhPC = 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin, DPhPG = 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerin)], 4:1-Mischung.

Werten für **gA** vermindert. Dagegen ist die K^+ -Leitfähigkeit in DPhPC/DPhPG (4:1) um 36 % und in DOPC um 9 % erhöht.

- 3) Offensichtlich ist der Einfluss des Kronenethers durch die intrinsische Ionenpräferenz von **gA** überlagert. Dies erklärt auch die hohen Leitfähigkeiten für Rb^+ . Zur Verdeutlichung des Kronenethereinflusses auf die Ionenselektivität wurden relative Leitfähigkeiten berechnet (Abbildung 2). Das Diagramm verdeutlicht, dass K^+ das einzige Kation ist, dessen Transport von dem Kronenether profitiert. K^+ passt am besten in den Aza[18]krone-6-Ether, was zu einer optimalen Unterstützung der Dehydratation und damit zu der erhöhten Leitfähigkeit führt.
- 4) Die Veränderungen in den Leitfähigkeiten sind von der Rigidität und Ladung der Lipiddoppelschicht abhängig. Außer bei Cs^+ ist die Leitfähigkeit von **2** in der geladenen und rigideren Membran aus DPhPC/DPhPG (4:1) höher als die von **gA**.

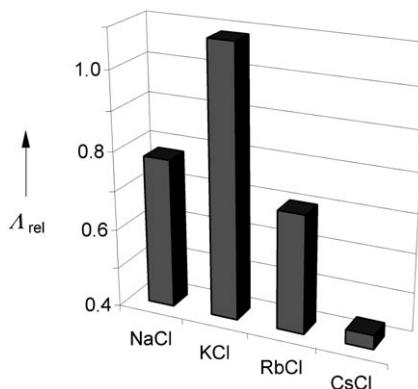


Abbildung 2. Relative Leitfähigkeiten Λ_{rel} für **2**, bezogen auf **gA** in DOPC.

CD-Messungen in Lipidumgebung (Abbildung 3) zeigen, dass die Bildung der kanalaktiven $\beta^{6,3}$ -Helix durch die Zweipunktanknüpfung des Kronenethers nicht verhindert wird.^[20]

Die beobachteten Einzelkanal-Ströme können prinzipiell nach zwei Szenarien zustande kommen: Der Ionenfluss kann durch den Kronenether hindurch (wie in Abbildung 4b für K^+ gezeigt) oder an ihm vorbei (wie in Abbildung 4c exemplarisch für Cs^+ gezeigt) erfolgen.

Auf den ersten Blick mag erstaunen, dass Cs^+ (Ionen-durchmesser 326–372 pm) ein [18]Krone-6-Derivat (Innen-durchmesser 260–320 pm) passieren soll.^[21] Aus zahlreichen Röntgenkristallstrukturanalysen ist bekannt, dass sich K^+ im Zentrum des Makrocyclus befindet, während die größeren

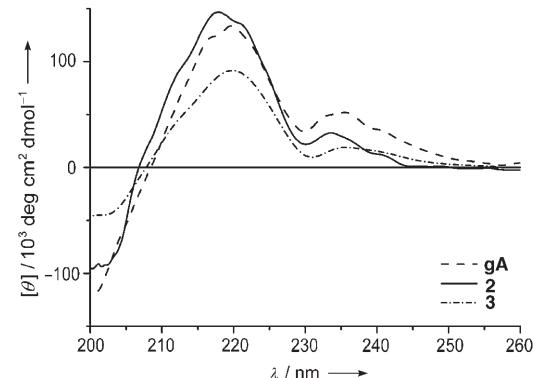


Abbildung 3. CD-Spektren in DMPC-Vesikeln für **2**, **3** und **gA** ($22^\circ C$, $10^{-4} M$).

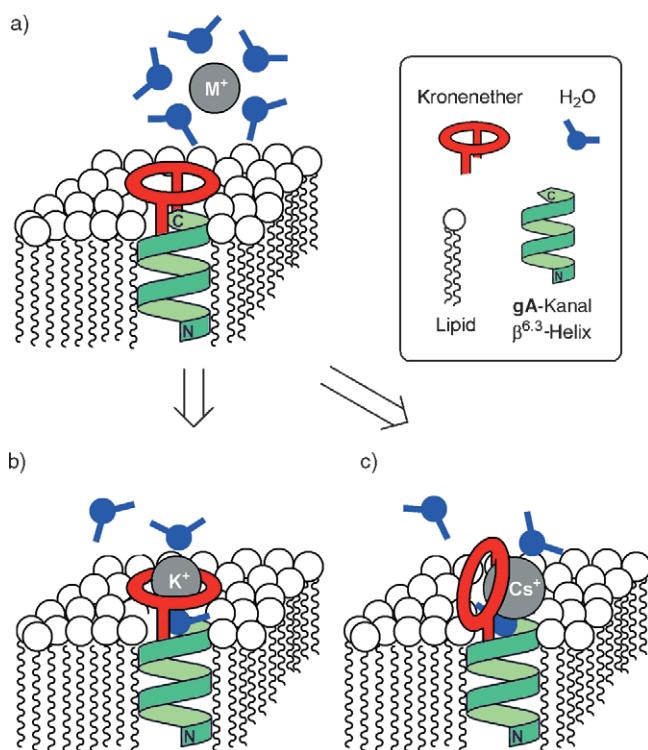


Abbildung 4. Eintritt eines solvatisierten Kations in den durch **2** gebildeten Kanal. Annäherung eines hydratisierten Kations (a). Die unterstützende Dehydratation kann mittels Durchtritt durch den Kronenether (b) oder Passage am Kronenether vorbei (c) erfolgen.

Alkalimetallkationen Sunrise-Strukturen (Kation sitzt oberhalb der Ebene) oder Sandwich-Strukturen (ein Kation wird zwischen zwei Kronenethermolekülen festgehalten)

bilden.^[22,23] Kristallbildung ist meist ein thermodynamisch kontrolliert ablaufender Prozess; dagegen sind die Bedingungen, unter denen Einzelkanal-Ströme gemessen werden, fernab vom thermodynamischen Gleichgewicht. Das extrem hohe elektrische Feld (in der Größenordnung von 100 kV mm^{-1}), das über der Membran anliegt, übt auf jedes Kation starke Kräfte aus. Es ist daher zumindest vorstellbar, dass auch die größeren Alkalimetallkationen unter diesen Bedingungen durch ein [18]Krone-6-Derivat gezogen werden (Abbildung 4b). Man kann diesen Vorgang mit dem thermisch induzierten Passieren großer organischer Reste durch kleine Ringe bei der Rotaxansynthese vergleichen.^[24]

Verbindung **3** ohne eine intakte Kronenetherstruktur, aber mit einem sterisch ähnlich anspruchsvollen Oligoethylenglycolbügel über dem Kanaleingang kann die Ionendehydratation nur gemäß Abbildung 4c unterstützen. Die drastisch reduzierten Leitfähigkeiten für **3** (Abbildung 1) weisen auf einen anderen Transportmechanismus für diese Verbindung hin und stützen damit für **2** den in Abbildung 4b dargestellten Ionenfluss. Die Offenzeiten für den Transport von Cs^+ ((33 ± 4) ms) gleichen denen für K^+ ((44 ± 5) ms).

Neuartige Kronenether-**gA**-Hybridmoleküle wurden synthetisiert und auf ihre Funktion hinsichtlich des ionenselektiven Kanaltransports untersucht. Verbindung **2** weist eine höhere Präferenz für K^+ als für Cs^+ auf und ist eines der sehr wenigen Beispiele mit einer höheren Leitfähigkeit als natürliches **gA**.^[25] Dies zeigt, dass die Beeinflussung der Ionenselektivität durch erleichterte Desolvatation ein vielversprechendes Konzept ist.

Eingegangen am 22. Juli 2005

Online veröffentlicht am 8. Dezember 2005

Stichwörter: Ionenkanäle · Ionenselektivität · Kronenverbindungen · Peptide · Syntheseplanung

- [1] a) E. Neher, B. Sakman, *Nature* **1976**, *260*, 799–802; b) B. Hille, *Ion Channels of Exitable Membranes*, 3. Aufl., Sinauer, Sunderland, **2001**.
- [2] a) D. A. Doyle, J. H. Moraes-Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, *280*, 69–77; b) J. H. Moraes-Cabral, Y. Zhou, R. MacKinnon, *Nature* **2001**, *414*, 37–42; c) Y. Zhou, J. H. Moraes-Cabral, K. Amelia, R. MacKinnon, *Nature* **2001**, *414*, 43–48; d) R. MacKinnon, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4363–4376; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4265–4277.
- [3] Ausgewählte Übersichtsartikel zu künstlichen Ionenkanälen:
 - a) G. W. Gokel, O. Murillo, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 425–432;
 - b) K. S. Åkerfeldt, J. D. Lear, Z. R. Wasserman, L. A. Chung, W. F. DeGrado, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 191–197; c) N. Voyer, *Top. Curr. Chem.* **1996**, *184*, 1–37; d) G. W. Gokel, A. Mukhopadhyay, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 274–286; e) U. Koert, L. Al-Momani, J. R. Pfeifer, *Synthesis* **2004**, 1129–1146; f) S. Matile, A. Som, N. Sordé, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6405–6435.
- [4] a) Y. Tanaka, Y. Kobuke, M. Sokabe, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 717–719; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 693–694; b) T. M. Fyles, D. Loock, W. F. van Straaten-Nijenhuis, X. Zhou, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8866–8874; c) A. J. Wright, S. E. Matthews, W. B. Fischer, P. D. Beer, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3474–3481.
- [5] H.-D. Arndt, A. Knoll, U. Koert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2137–2140; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2076–2078.
- [6] *Gramicidin and Related Ion Channel-Forming Peptides*, Wiley, Chichester, **1999**.
- [7] R. R. Ketchem, B. Roux, T. A. Cross, *Structure* **1997**, *5*, 1655–1669.
- [8] G. Eisenman, R. Horn, *J. Membr. Biol.* **1983**, *76*, 197–225.
- [9] S. Y. Noskov, S. Bernèche, B. Roux, *Nature* **2004**, *431*, 830–834.
- [10] J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, A. V. Bordunov, C. Y. Zhu, J. K. Hathaway in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 1 (Hrsg.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle, G. W. Gokel), Pergamon, Oxford, **1996**, S. 35–95.
- [11] a) M. J. Pregel, L. Jullien, J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1695–1697; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1637–1640; b) G. G. Cross, T. M. Fyles, T. D. James, M. Zojaji, *Synlett* **1993**, 449–460; c) J.-C. Meillon, N. Voyer, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1004–1006; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 967–969; d) E. Biron, F. Otis, J.-C. Meillon, M. Robitaille, J. Lamothe, P. Van Hove, M.-E. Cormier, N. Voyer, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1279–1290; e) G. W. Gokel, *Chem. Commun.* **2000**, 1–9; f) G. W. Gokel, R. Ferdani, J. Liu, R. Pajewski, H. Shabany, P. Utrecht, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 33–39; g) J.-Y. Winum, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7961–7962; h) A. C. Hall, C. Suarez, A. Hom-Choudhury, A. N. A. Manu, C. D. Hall, G. Kirkovits, I. Ghiriviga, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2973–2982.
- [12] D. C. J. Jaikaran, Z. Zhang, G. A. Woolley, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1234*, 133–138.
- [13] J. M. Klunder, T. Onami, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1295–1304.
- [14] H. Imagawa, T. Tsuchihashi, R. K. Singh, H. Yamamoto, T. Sugihara, M. Nishizawa, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 153–155.
- [15] K. E. Krakowiak, J. S. Bradshaw, D. J. Zamecka-Krakowiak, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 929–972.
- [16] H.-D. Arndt, A. Vescovi, A. Schrey, J. R. Pfeifer, U. Koert, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2789–2801.
- [17] a) P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, *Nature* **1962**, *194*, 979–980; b) P. Mueller, D. O. Rudin, *Nature* **1968**, *217*, 713–719.
- [18] A. Vescovi, A. Knoll, U. Koert, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2983–2997.
- [19] R. E. Koeppe II, J. Hatchett, A. R. Jude, L. L. Providence, O. S. Andersen, D. V. Greathouse, *Biochemistry* **2000**, *39*, 2235–2242, zit. Lit.
- [20] B. A. Wallace, *J. Struct. Biol.* **1998**, *121*, 123–141.
- [21] C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 386–391.
- [22] a) J. W. Steed, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *215*, 171–221; b) A. V. Bajaj, N. S. Poonia, *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *87*, 55–213.
- [23] Domasevitch et al. haben eine (leicht fehlgeordnete) Struktur publiziert, in der Rb^+ exakt innerhalb eines [18]Krone-6-Ethers positioniert ist: K. V. Domasevitch, V. V. Ponomareva, E. B. Rusanov, T. Gelbrich, J. Sieler, V. V. Skopenko, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *268*, 93–101.
- [24] P. R. Ashton, M. Bělohradský, D. Philp, J. F. Stoddart, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1269–1274.
- [25] a) K. U. Prasad, S. Alonso-Romanowski, C. M. Venkatachalam, T. L. Trapani, D. W. Urry, *Biochemistry* **1986**, *25*, 456–463; b) D. A. Busath, C. D. Thulin, R. W. Hendershot, L. R. Phillips, P. Maughan, C. C. Cole, N. C. Bingham, S. Morrison, L. C. Baird, R. J. Hendershot, M. Cotten, T. A. Cross, *Biophys. J.* **1998**, *75*, 2830–2844.