

# Selektive Markierung von cysteinhaltigen Domänen und Proteinen mit ESR-Sonden

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
des Fachbereiches Chemie der Technischen Universität Dortmund

Angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

Eingereicht von

Dipl.-Chem. Kester Lausecker  
Aus Hamm/Westf.

Dortmund, Mai 2009

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass diese Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den 03.05.2009

Die eingereichte Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2004 bis Februar 2008 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung Biophysik unter der Anleitung von Prof. Dr. Martin Engelhard und Prof. Dr. Roger S. Goody durchgeführt.

1. Gutachter : Prof. Dr. Engelhard
2. Gutachter : Prof. Dr. Mootz

Meiner Familie und meinen Freunden

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	X
Ein- und Dreibuchstabencode der 20 codierenden Aminosäuren	XII
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Modellsysteme	6
1.1.1 Das Ras-RBD-System	6
1.1.2 NpHtrII – Mitglied der phototaktischen Signaltransduktionskaskade in Natronomonas pharaonis	9
<b>2. Experimenteller Teil – Material, Methoden und Synthesen</b>	<b>11</b>
2.1 Chemikalien	11
2.2 Instrumentation	11
2.3 Chemische Methoden	13
2.3.1 Festphasensynthese von Peptiden	13
2.3.1.1 Boc-Strategie	13
2.3.2 Entschützung der Aloc-Gruppe	14
2.3.3 Markierung von Peptiden an der festen Phase	14
2.3.4 Entschützung und Abspaltung der Peptide	15
2.3.5 Aufreinigung der Peptide	15
2.3.6 Chemische Ligation der Peptide	15
2.3.7 Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe in Lösung	16
2.4 Biochemische Methoden	17
2.4.1 Faltung der chemisch generierten RBDs	17
2.4.2 Nukeotidaustausch an H-Ras	17
2.4.3 Expression von rekombinanten NpHtrII-Konstrukten	17
2.4.4 Aufreinigung der rekombinanten Proteinen	18
2.4.5 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	18
2.4.6 Kopplung von Cysteinmutanten mit Spinproben	18
2.4.7 Rekonstitution der Membranproteine	19
2.4.8 Expressed Protein Ligation von NpHtrIII-114	19
2.4.9 Peptid- und Proteinanalytik	20

2.4.9.1 RP-HPLC	20
2.4.9.2 Massenspektrometrie	20
2.5 Biophysikalische Methoden	21
2.5.1 ESR-Messungen	21
2.5.2 CD-Spektroskopie	22
2.5.3 Gelfiltrationschromatographie	22
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>23</b>
3.1 Synthesen der Spinlabel	23
3.1.1 Retrosynthetische Analyse	23
3.1.2 Durchgeführte Synthesen	25
3.1.2.1 Synthese von 3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on Hydrobromid (2)	25
3.1.2.2 Synthese von 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-tert.-Butylester (3)	26
3.1.2.3 Synthese von 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-pyrrol-3-tert.-butylester (4)	27
3.1.2.4 Synthese von 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-pyrrol-3-carbonsäure (DTOPC) (5)	28
3.1.2.5 Synthese von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-tert.-butylester (6)	29
3.1.2.6 Synthese von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-carbonsäure (oNV-DTOPC) (7)	30
3.1.2 Zusammenfassung der Synthese der Spinlabelcarbonsäure	31
3.1.3 Zusammenfassung der Synthese des geschützten Spinlabels	32
3.2.1 Synthese von markiertem Ras(40-50)-Thioester	33
3.2.2 Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe im Ras(40-50)-Thioester Testpeptid	35
3.3 Auswahl der Markerposition in der RBD	42
3.4 Chemische Synthesen der modifizierten Ras-Bindungsdomäne von C-Raf1	43
3.4.1 Synthese von RBD(96-131)	44
3.4.2 Synthese der modifizierten RBD(51-95)/L91Marker Thioester	47
3.4.2.1 Synthese durch direkten Einbau einer künstlichen spinmarkierten Aminosäure	47
3.4.2.2 Synthese durch nachträglichen Einbau des Spinlabels	48
3.4.2.3 Synthese von RBD(51-95/91Dpr(Aloc))	50
3.4.2.4 Synthese von RBD(51-95/91Dpr(SL))	51
3.4.2.5 Synthese von RBD(51-95/91Dpr(cSL))	52

3.4.3	Chemische Ligation der RBD-Peptide	54
3.4.3.1	Ligation von RBD(51-95/91Dpr(SL)) und RBD(96-131)	54
3.4.3.2	Ligation von RBD(51-95/91Dpr(cSL)) und RBD(96-131) zu RBD(51-131/91Dpr(cSL))	56
3.4.4	Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe in der RBD	57
3.4.5	Faltung der modifizierten RBD	58
3.5	Bindungsstudie mittels Gelfiltration	59
3.6	Synthese und Ligation der NpHtrII-Peptide	62
3.6.1	Auswahl der Markerposition in NpHtrII	62
3.6.2	Synthese von NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr)	63
3.6.2	Synthese von NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr(cSL))	64
3.6.3	Expression und Aufreinigung von NpHtrII(1-94)-MXE-His	65
3.6.4	Ligation der NpHtrII-Peptide	67
3.6.4.1	Ligation von NpHtrII1-94-Mesna Thioester mit NpHtrII95-114 (A95C/M110Dpr)	67
3.6.4.2	Expressed Protein Ligation mit NpHtrII(1-94)-MXE-His	68
3.4.7	Photolyse von NpHtrII(1-114/M100Dpr(cSL))	69
3.4.7	Expression und Aufreinigung von NpHtrII(1-114/M100C)-His	70
3.4.8	Spinlabeling von NpHtrII(1-114/M100C)-His	72
3.5.1	ESR-Spektroskopische Untersuchungen	74
3.5.1.1	Ras-RBD-Systems	74
3.5.1.2	NpHtrII-NpSRII-System	76
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	78
4.1	Chemische Synthese	78
4.2	Peptid- und Proteinsynthese	82
4.2.1	Peptidsynthese	82
4.2.2	Entschützungs- und Markierungsreaktion(en)	82
4.2.3	Ligationen	82
4.2.3.1	Ligation von RBD(51-131/95X); X= Dpr(SL), Dpr(cSL)	82
4.2.3.2	Ligation von NpHtrII(1-114/M100Dpr(cagedSL))	84
4.2.4	Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe	85
4.2.4.1	Zusammenfassung der chemischen Eigenschaften der synthetisierten Spinlabel	86
4.2.4.2	Ras/RBD-System	87

4.2.4.2 NpSRII/NpHtrII-System	88
4.2.5 Komplexbildung von Ras(1-180)GppNHp und RBD nach der Photolyse	88
4.3 Spektroskopische Charakterisierung	89
<b>5. Zusammenfassung</b>	92
<b>6. Literatur</b>	93
<b>Danksagung</b>	98
<b>Lebenslauf</b>	100
<b>Publikationen</b>	101
<b>Appendix A – zusätzlich durchgeführte Synthesen</b>	102
Synthese von (1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-yl)methanol ( <b>8</b> )	102
Synthese von (1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-yl)methyl-methanesulfonat ( <b>9</b> )	103
Synthese von (4-Nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-yl)methanol ( <b>11</b> )	104
<b>Appendix B – Molekülverzeichnis</b>	105
<b>Appendix C – NMR-Spektrenanhang</b>	106
C.1 – <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) von ( <b>2</b> )	106
C.2 – <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) von ( <b>3</b> )	107
C.3 – <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) von ( <b>6</b> )	108
C.4 – <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) von ( <b>7</b> )	109
C.5 – <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) von ( <b>8</b> )	110
C.6 – <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) von ( <b>9</b> )	111
C.7 – <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ) von ( <b>11</b> )	112



# Abkürzungsverzeichnis

## 0-9

2-Cl-Z      2-Chloro-Benzoyloxycarbonyl

## A

AA      Aminosäure  
abs      absolut  
AcOH      Essigsäure  
Aloc      Allyloxycarbonyl  
amu      atomare Masseneinheit  
Äq      Äquivalente  
arom      aromatisch  
AS      amphipatische Sequenz

## B

B      Magnetfeld / Magnetfeldstärke  
Boc      tertiärbutyloxycarbonyl  
BOM      Benzoyloxycarbonyl  
Bzl      Benzyl(ether)

## C

CD      Zirkulardichroismus  
CMC      Kritische Mizellbildungskonstante

## D

d.Th.      der Theorie  
Da      Dalton (Masseneinheit)  
DCM      Dichlormethan  
DDM      Dodecyl-d-Maltosid  
DibAlH      Diisobutylaluminiumhydrid  
DIEA      Diisopropylethylamin  
DMF      Dimethylformamid  
DMSO      Dimethylsulfoxid  
DNP      Dinitrophenyl  
Dpr      Diaminopropionsäure  
DTE      Dithioerythritol / (2S,3R)-1,4-Bis-sulfanylbutan-2,3-diol

## E

*E. coli*      *Escherichia Coli*  
EDTA      Ethylendiamintetraessigsäure  
EPL      Expressed Protein Ligation  
ESI      Elektrospray Ionisation  
ESR      Elektronen Spin Resonanz  
Et      Ethyl

## G

GAP      GTPase Activating Protein  
GdnHCl      Guanidium Hydrochlorid  
GDP      Guanosindiphosphat  
GEF      Guanine Nucleotide Exchange Faktor  
GTP      Guanosintriphosphat

## H

HAMP	histidine Kinases, adenylyl cyclases, methyl-accepting chemotaxis proteins and phosphatases
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexaphosphate
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Htr	Halobacterial transducer of rhodopsin

## I-L

IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
J	Kopplungskonstante
KPi	Kaliumphosphat
Lac	Lactose
LC	Flüssigkeitschromatographie

## M

MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (Kaskade)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Mesna	Natrium-2-Sulfanylethansulfonat
MHz	Megahertz
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPAA	4-Mercaptophenylethansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrum
MTSSL	Methylthiosulfonat Spinlabel
MWCO	Molecular weight cutoff

## N

NaOAc	Natriumacetat
NaPi	Natriumphosphat
NCL	Native Chemische Ligation
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<i>Np</i>	<i>Natronomonas Pharaonis</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure

## O

OcHx	Cyclohexylester
OD	Optische Dichte
(O)Ms	Mesylat

## P

PAGE	Polyacryl Gelelektrophorese
PAM	Phenylacetamidomethyl
Ph	Phenyl
p-MeBzl	para-Methylbenzylthioether
ppm	parts per million

## R

Raf	Rapid growing fibrosarcoma (Protein)
Ras	Rat Sarcoma (Protein)
RBD	Ras Bindungsdomäne
RP	reversed phase
rpm	rounds per minute

RT Raumtemperatur

### S

SA Sinapinic Acid  
SDS Natrium Dodecylsulfat  
SDSL Site Directed Spin Labeling  
SL Spinlabel  
SPPS Solid phase peptide synthesis  
SRII Sensorisches Rhodopsin II  
SV Säulenvolumina

### I

tBu tertiärbutyl  
TCA Trichloressigsäure  
TCEP tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride  
Temp. Temperatur  
TEMPO 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy  
tert. tertiär  
TFA Trifluoressigsäure  
TFE Trifluorethanol  
tof time of flight  
Tos Tosyl  
TrisHCl 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol  
tRNA Transfer Ribonukleinsäure  
Trt Trityl

### U-X

u.A. unter Anderem  
UV-VIS Ultraviolet-Visible  
wt Wildtype  
Xan Xanthyl

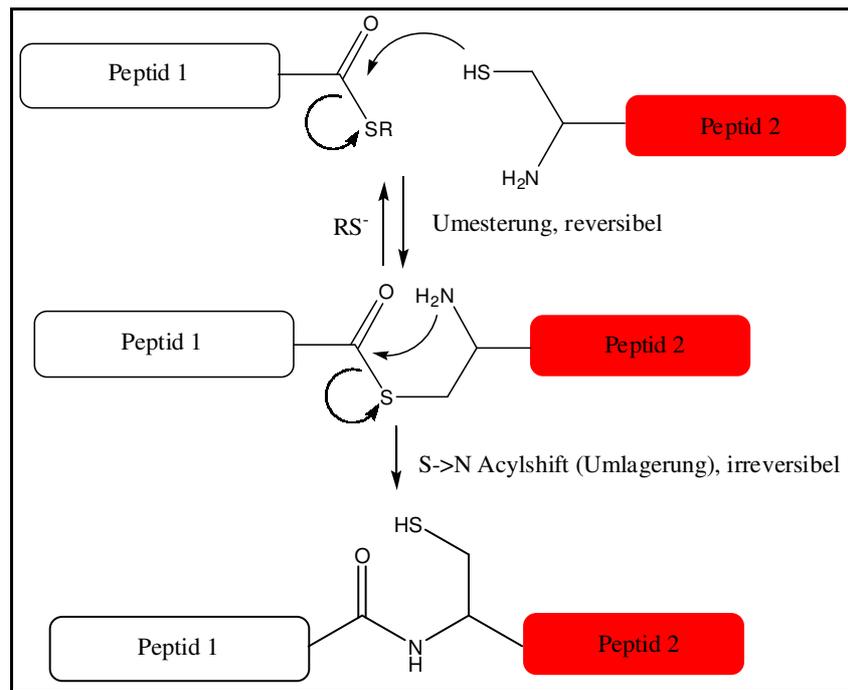
### *Ein- und Dreibuchstabencode der 20 codierenden Aminosäuren*

Alanin	A	Ala	Leucin	L	Leu
Arginin	R	Arg	Lysin	K	Lys
Asparagin	N	Asn	Methionin	M	Met
Aspartat	D	Asp	Phenylalanin	F	Phe
Cystein	C	Cys	Prolin	P	Pro
Glutamin	Q	Gln	Serin	S	Ser
Glutamat	E	Glu	Threonin	T	Thr
Glycin	G	Gly	Tryptophan	W	Trp
Histidin	H	His	Tyrosin	Y	Tyr
Isoleucin	I	Ile	Valin	V	Val



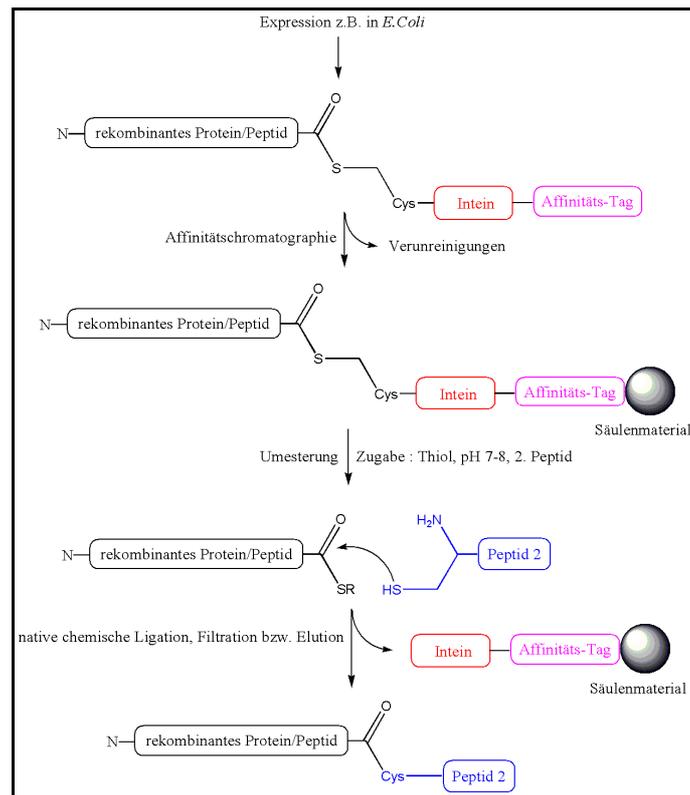
# 1. Einleitung

Der Fokus der biowissenschaftlichen Forschung lag in der näheren Vergangenheit auf der Erforschung von Aufbau, Funktion und Organisation der Zellen und der daran beteiligten Proteine und deren Wechselwirkungen. Durch viele Eigenschaften der in Proteinen eingebauten 20 natürlichen Aminosäuren und die Manipulationsmöglichkeiten durch moderne mikrobiologische Methoden können bereits eine Vielzahl an Fragestellungen bearbeitet werden. Dennoch stellt die alleinige Beschränkung auf die Eigenschaften der codierenden Aminosäuren eine Limitierung dar, denn viele Informationen und analytische Techniken sind gar nicht, eingeschränkt oder nur mit hohem Aufwand zugänglich (NMR, Röntgenkristallographie). Zur Klärung von Mechanismen und strukturellen Eigenschaften ist der selektive Einbau von Reportern und Markern notwendig. Durch die Vielzahl gleicher chemischer Gruppen (Amino-, Carboxy-, Hydroxy- und Sulfhydryl-) in Proteinen ist die gezielte Markierung oftmals erschwert. Um dieses Problem zu umgehen, können entweder Cysteinmutanten (relativ selten vorkommend im Vergleich zu den anderen Aminosäuren) verwendet werden, oder ein bereits vielfach angewandter kombinierter chemisch-biologischer Ansatz. Dieser besteht aus der Anwendung der chemischen Synthese von Peptiden an der festen Phase basierend auf den Arbeiten von Merrifield (Merrifield, 1963, 1985). Diese Methode liefert eine vollständige Kontrolle über die Synthese, wodurch beliebige Modifikationen möglich sind. Die Synthese großer Proteine ist hierbei jedoch bislang nicht geglückt, weil die Akkumulation einander ähnlicher Nebenprodukte und steigende Wechselwirkung der Peptidketten untereinander den Syntheseaufwand bei großen Peptidketten (>50 Aminosäuren) stark ansteigen läßt (Sakakibara, 1999). Um in den Bereich kleiner Proteine und Domänen vorzustoßen, wird häufig die native chemische Ligation (NCL) verwendet (Dawson et al., 1994). Grundlage ist eine chemische Umlagerungsreaktion, die bereits 1953 beschrieben wurde (Wieland et al., 1953), und zur Ausbildung einer Amidbindung führt. Im Fall der NCL werden 2 Peptide benötigt, eines mit einem C-terminalen Thioester, und als Reaktionspartner ein Peptid mit einem N-terminalen Cystein. Nach Reaktion und Umlagerung liegt ein Peptid mit nativer Peptidbindung vor, das nicht mehr von einem natürlichen Peptid zu unterscheiden ist.



**Abb. 1:** schematische Darstellung der nativen chemischen Ligation

Realistisch ist unter Anwendung dieser Techniken die Darstellung von Proteinen im Bereich um 250 Aminosäuren, da durch die Beschränkungen in der Peptidsynthese und die Aufreinigungsverluste nach der NCL selten mehr als 3 oder 4 Ligationsschritte möglich sind (Kochendoerfer et al., 1999). Für die Darstellung modifizierter Proteine wurde dieser Ansatz zur Expressed Protein Ligation (EPL) erweitert. Die EPL basiert auf dem Proteinsplicing (Yoshihisa und Anraku, 1990; Kane et al., 1990), welches mittels mutierter Inteine die Darstellung von rekombinanten Thioestern, sowie von Proteinen und Peptiden mit N-terminalem Cystein gestattet, welche anschließend mit chemisch synthetisierten Peptiden ligiert werden können.



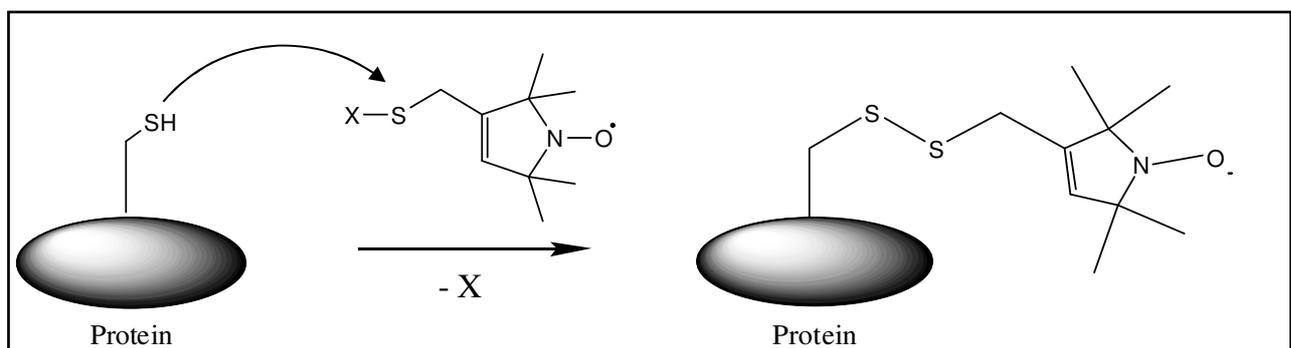
**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Semisynthese von Proteinen (Muir et al., 1998)

Durch die Kombination von SPPS, NCL, EPL und geschickte Wahl der Ligationsstellen können viele Probleme, die bei der Darstellung eines chemisch modifizierten Peptides auftreten können, umgangen werden. Die Schwierigkeiten bei diesem als EPL (Muir et al., 1998) bezeichneten Ansatz finden sich hauptsächlich in der Expression der Inteinstrukturen, der Zugänglichkeit der Ligationsschnittstelle, der Synthese „schwieriger“ Peptidsequenzen und der Isolierung des Ligationsproduktes. Durch die Anwendung dieser Methoden wurden bereits vielfach künstliche Aminosäuren selektiv in Proteine eingebracht (Cornish et al., 1994; Iakovenko et al., 1999; Becker et al., 2005).

Eine weitere erfolgreiche Methode zur Einführung nicht natürlicher Aminosäuren in Proteine nutzt spezielle Eigenschaften des biologischen Syntheseapparates aus. Durch eine veränderte tRNA wird hierbei die Suppression des Stop-Codons ausgenutzt. Notwendig für diese Technik sind die DNA oder mRNA des Zielproteins mit einer Mutation an der zu markierenden Position, die mit der modifizierten Aminosäure beladene tRNA und wichtige Bestandteile des Proteinsyntheseapparates. Durch die niedrige Suppressionsrate und Nebenreaktionen sind die erzielbaren Proteinmengen jedoch gering (Cornish und Schultz, 1994; Cornish et al., 1994). Die Fortführung dieser Arbeiten durch Schultz und Mitarbeiter führte als Weiterentwicklung zur „In Vivo Protein Mutagenesis“, bei welcher entweder der

genetische Code von Zellen um nicht natürliche Aminosäuren erweitert wird oder eine mutierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase eingesetzt wird (Wang und Schultz, 2005). Dieser Ansatz ist technisch aufwändig, liefert aber gute Ausbeuten an modifizierten Proteinen.

Neben den klassischen biophysikalischen Markern wie z.B. Chromophore und Fluorophore werden durch den technischen Fortschritt in der Analytik auch Markierungen wie Isotopen- oder Spinmarkierungen immer wichtiger. Die Elektronen Spin Resonanz (ESR) Spektroskopie fand in der nahen Vergangenheit immer stärkere Anwendung, da sie es ermöglicht auch schwer zugängliche Proteine (z.B. membrangebunden oder –durchspannend) zu untersuchen. Die ESR-Spektroskopie ist auf die Anwesenheit paramagnetischer Spezies angewiesen. Sie kann daher nur an wenigen unmodifizierten Systemen angewandt werden, bei denen entweder paramagnetische Spezies während einer Reaktion entstehen (z.B. Photosystem I und II) oder in Form von paramagnetischen Übergangsmetallionen (jedoch häufig nur bei niedrigen Temperaturen messbar) vorhanden sind (Snyder, 1993; Hemminga, 2007). Bei einem System ohne diese Voraussetzung muss ein sogenannter Spinlabel eingeführt werden. Die am häufigsten verwendete Methode ist dazu das „site directed spin labeling“ (SDSL) (Hubbel et al., 1998). Hierbei wird ein Cystein chemoselektiv mit dem Markermolekül zu einem Disulfid umgesetzt. Hierbei ist das Vorhandensein eines Cysteines an der zu markierenden Position im Protein Voraussetzung. Vorher müssen weitere vorhandene Cysteine eliminiert werden. Durch Anwendung der Proteinmutagenese können diese Voraussetzungen erfüllt werden (Hubbel et al., 1998; Fanucci und Cafiso, 2006). Anschließend muss jede Mutante auf ihre natürliche Funktion untersucht werden (Crane et al., 2005).



**Abb. 3:** schematische Darstellung des „site directed spin labelings“, X - Abgangsgruppe

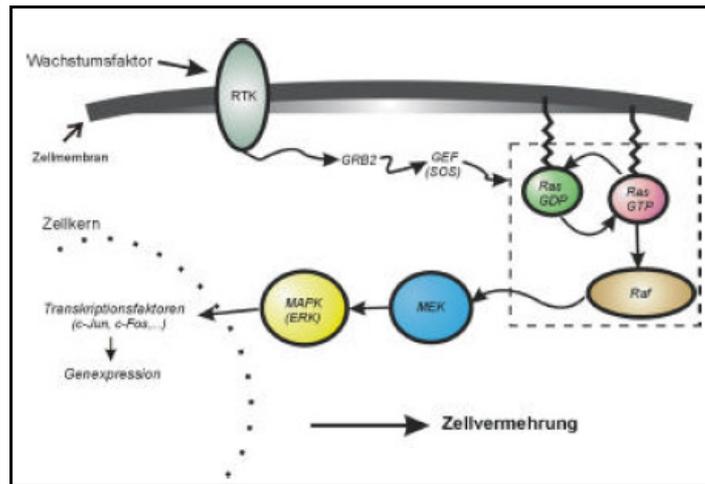
Durch Analyse der jeweiligen ESR-Spektren kann eine Vielzahl an Informationen gewonnen werden. Die Konzentrationsbestimmung der paramagnetischen Spezies ist über die Intensität des ESR-Spektrum einfach möglich. Durch Analyse der Linienformen und Kopplungen

können auch Aussagen über die Tensoren  $\mathbf{g}$  und  $\mathbf{A}$ , sowie deren Anisotropie getroffen werden. Hieraus lassen sich anschließend Informationen über die Beweglichkeit des Spinlabels, der Seitenkette und des Peptidrückgrates ableiten. Ausserdem können Informationen über die Umgebung des Labels, wie die lokale Polarität, lokale Ordnungsparameter und die lokale Topologie gewonnen werden (Hemminga, 2007). Es können auch Aussagen über die Orientierung einer Helix und das Rotations- und Diffusionsverhalten eines Proteins getroffen werden. Zusätzlich können Experimente mit Quenchern (z.B. Chromoxalat, Sauerstoff) Aussagen über die Zugänglichkeit des Labels liefern, hieraus können Aussagen über die Umgebung des Spinlabels getroffen werden. Es kann nur zu einem Quenchvorgang mit Chromoxalat kommen, wenn der Label zugänglich für Wasser ist; eine Zugänglichkeit für Sauerstoff deutet an, dass dieser Label sich innerhalb einer Lipidschicht befindet. Ist der Label für keinen Quencher zugänglich, so befindet er sich im Protein (Bordignon und Steinhoff, 2007). Eine weitere Alternative stellen Doppelmarkierungsexperimente dar, mit denen der Abstand zweier Spinlabel voneinander von 0.8 bis derzeit ca. 80 nm ermittelt werden kann. Eine Kombination dieser Experimente mit Vergleichsmessungen und zeitaufgelösten Spektren ermöglicht es auch Konformationsänderungen und die Bindung von Liganden und Bindungspartner zu detektieren (Hemminga, 2007; Bordignon und Steinhoff, 2007). Durch Anwendung dieser Methoden wurden Aussagen über sekundär Strukturmerkmale von Proteinen (Cuello et al., 2004), Konformationsänderungen, Protein-Protein-Wechselwirkungen (Fanucci et al., 2003; Crane et al., 2005), Wechselwirkung mit Lipidmembranen (Altenbach et al., 1994) und die Zugänglichkeit für Quencher-moleküle (Nelson et al., 2005) getroffen (Wegener et al., 2001b; Klare, 2002), aus denen abschließend Strukturmodelle erarbeitet werden konnten.

Um die Problematik von Mutationen und Mehrfachmarkierungen bei cysteinhaltigen Proteinen zu umgehen, ist daher ein geänderter Ansatz notwendig. Wie Cornish und Mitarbeiter bereits zeigen konnten, ist es möglich durch Anwendung von Suppression einen Spinlabel als unnatürliche Aminosäure in ein Protein einzubauen (Cornish et al., 1994). Die erzielbaren Proteinmengen sind jedoch hierbei gering.

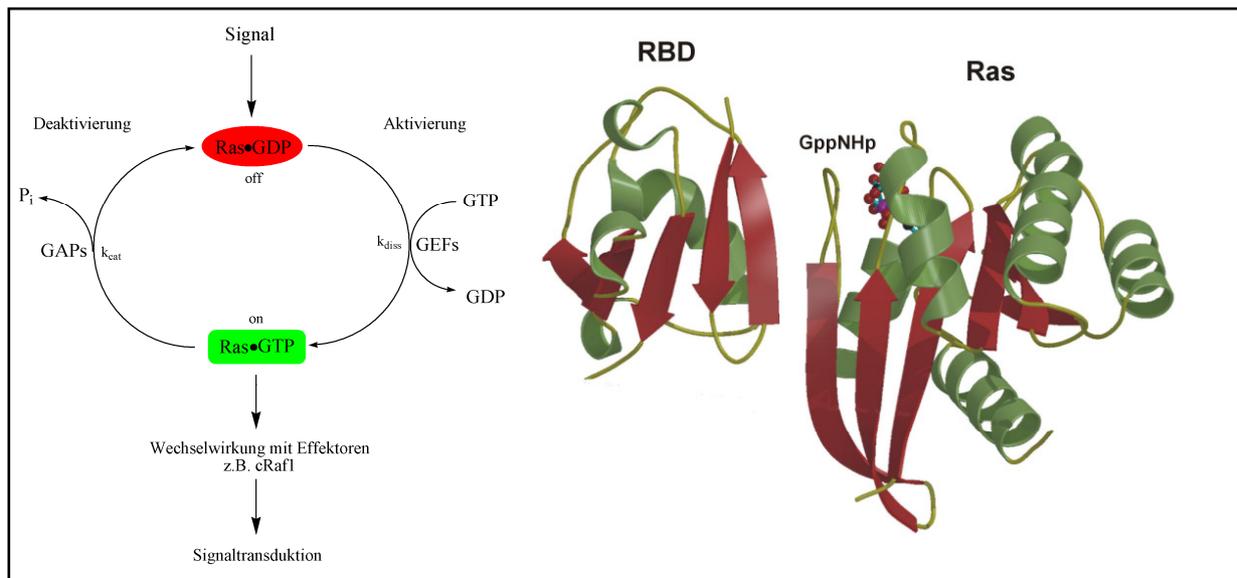
Die Anwendung der Peptidsynthese an der festen Phase, welche eine vollständige Kontrolle über die Markierung gestattet, verspricht höhere Ausbeuten. Die Kombination mit den gezeigten Ligationstechniken (NCL und EPL) ermöglicht die Darstellung selektiv markierter (cysteinhaltiger) Proteine im Milligramm Maßstab. Daher ist diese Strategie interessant, um große Mengen spinlabelter Peptide und Proteine darzustellen und wurde für diese Arbeit





**Abb. 5:** schematische Darstellung der MAPK Kaskade (Becker, 2001)

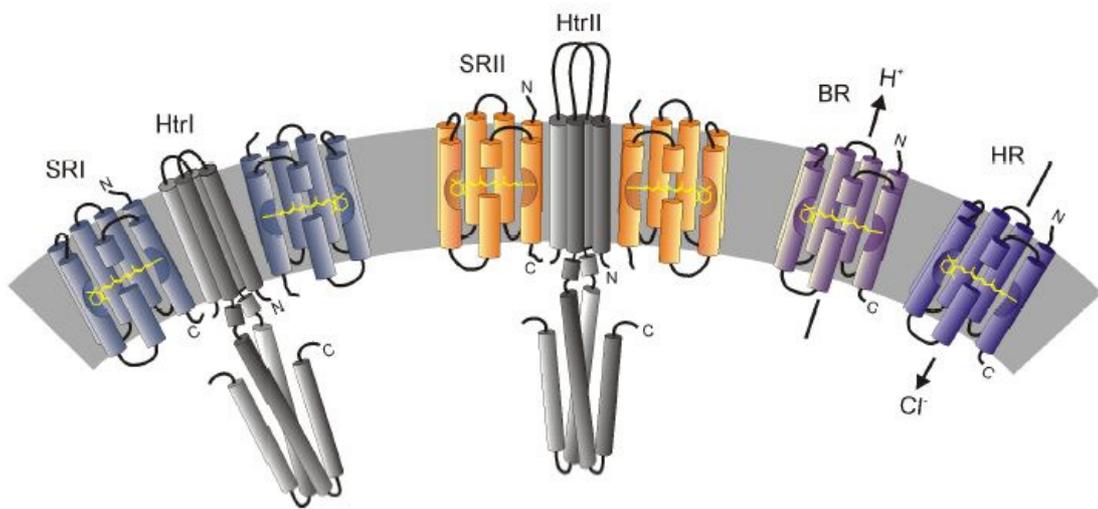
Das Protein H-Ras ist ein Vertreter der Proteinfamilie der kleinen rasähnlichen GTPasen, die unter anderem das gemeinsame Charakteristikum einer molekularen Masse zwischen 20 und 25 kDa besitzen. Weiterhin besitzen diese Proteine die Fähigkeit GDP und GTP mit hoher Affinität zu binden. H-Ras erfüllt in der MAPK Kaskade eine Funktion, die sich anschaulich als molekularer Schalter beschreiben lässt. Die MAPK Kaskade wird durch Bindung eines extrazellulären Signals (z.B. Wachstumsfaktor EGF; epidermal growth factor) gestartet und führt zu einer Dimerisierung und Phosphorylierung des Tyrosin Kinase Rezeptors. Hierdurch wird die Bindung von Adaptorproteinen wie Grb2 (growth receptor binding Protein 2) möglich, welches im Komplex mit SOS (son of sevenless, benannt nach einem Drosophila Gen) vorliegt. Beide Proteine werden so an die Membran rekrutiert, wo sie mit dem durch Lipidierung membranassoziierten H-Ras wechselwirken. Durch die katalytische Unterstützung von SOS kommt es zum Austausch des Nukleotides GDP gegen GTP und H-Ras wird in seine aktive Konformation überführt.



**Abb. 6:** schematische Darstellung des Ras Zyklus (Wittinghofer und Waldmann, 2000) und Rap1A·GppNHp:RBD-Komplex (Nassar et al., 1995)

In der aktiven GTP Konformation ist H-Ras in der Lage mit seinem Effektor cRaf1 zu wechselwirken. Eine besondere Rolle kommt hierbei der Ras bindenden Domäne (RBD) von cRaf1 zu. Die RBD bindet mit hoher Affinität an H-Ras, dies ist neben Phosphorylierungen und Protein-Protein-Wechselwirkungen in anderen Bereichen der Proteine, der Schlüsselschritt in der Signaltransduktion der MAPK Kaskade. Für die Bindung zwischen Ras und der RBD sind die zwei antiparallelen  $\beta$ -Sheets  $\beta 2$  von Ras und B2 (RBD) besonders wichtig. Es konnte gezeigt werden, dass für experimentelle Untersuchungen ein nicht lipidiertes und auf 166 Aminosäuren verkürztes Ras, sowie die RBD von cRaf1 bestehend aus 88 Aminosäuren (51 bis 131) ausreichend ist (John et al., 1990; Vojtek et al., 1993; Nassar et al. 1995). Sydor (1999) und Becker (2001) führten mit an Position 91 fluoreszenzmarkierten RBD Mutanten kinetische Messungen durch. Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine Mutation der Position 91 in der RBD die Faltung der RBD nicht verhindert. Es wurde weiterhin belegt, dass die Bindung zwischen Ras und RBD weiterhin möglich ist und nicht gestört wird. Weiterhin konnten Sydor sowie Becker zeigen, dass die Bindung zwischen Ras und der RBD mit einer Fluoreszenzmarkierung an Position 91 detektiert werden kann. Daher wurde auch für die ESR Markierung die Position 91 ausgewählt.

### 1.1.2 *NpHtrII* – Mitglied der phototaktischen Signaltransduktionskaskade in *Natronomonas pharaonis*



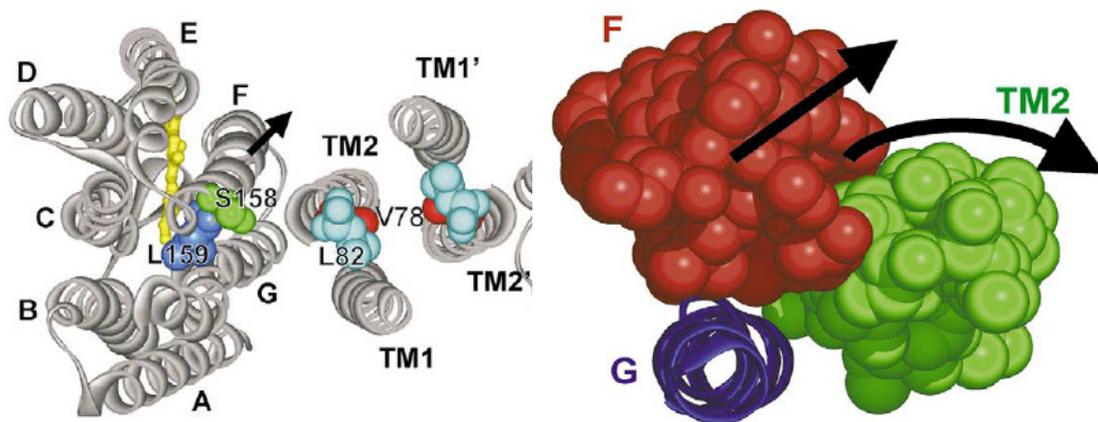
**Abb. 7:** Schematische Darstellung der vier archaebakteriellen Rhodopsine (Wegener, 2000; Klare, 2002; Chen und Spudich, 2002)

Das zweite Modellsystem entstammt dem Archaeon *N. pharaonis* und ist ein für die Steuerung und Regulation der photophoben phototaktischen Reaktion verantwortliches Rezeptor/Transducer-System. Das Lichtsignal wird durch den Rezeptor *NpSRII* (Sensorisches Rhodopsin) detektiert und mittels des halobakteriellen Transducers *NpHtrII* in das Cytoplasma weitergeleitet (Jung, 2007; Lüttenberg, 1998). Im Zytoplasma wird das Signal durch eine Kinasekaskade zum Flagellarmotor des Organismus weitergeleitet und greift in die Drehrichtung des Flagellarmotors ein. Dieser Eingriff führt zu einer häufigeren Richtungsänderung des Organismus, welcher so photooxidativem Stress und Schädigungen entgehen kann (Jung, 2007; Klare, 2004).

Der Rezeptor *NpSRII* ist ein Siebenhelix Membranprotein (Helices A bis G) und liegt in einem 2 zu 2 Komplex mit seinem Transducer *NpHtrII* vor (Chen, 2002). Als Chromophor ist in Helix G an Lysin 205 Retinal über eine protonierte Schiff Base kovalent gebunden. Das gebundene Transducermolekül *NpHtrII* ist ebenfalls ein transmembranes Protein und weist neben 2 transmembranen Helices (TM1 und TM2) eine große cytoplasmatische Domäne auf. *NpHtrII* weist hohe Sequenzhomologien zu eubakteriellen Chemorezeptoren (Asp- und Ser-Rezeptoren) auf, so dass eine strukturelle Verwandtschaft vermutet wird. Abweichend zu den Chemorezeptoren besitzt *NpHtrII* eine zusätzliche zweite HAMP-Domäne (**H**istidine-Kinase, **A**denylyl-Cyclase, **M**ethyl-accepting chemotaxis proteins, **P**hosphatases (Aravind und Ponting,

1999)).

Wird *Np*SRII Licht einer Wellenlänge kleiner als 500 nm ausgesetzt, isomerisiert das Retinal aus der *all-trans* in die *13-cis* Konformation, gefolgt von strukturellen Veränderungen im Rezeptor und Protonentransfers. Diese Abfolge wird als Photozyklus bezeichnet. Im Photozyklus werden der M2-, sowie der nachfolgende O-Zustand als signalgebend angesehen. Es konnte durch Anwendung von SDSL und ESR-Spektroskopie gezeigt werden, dass eine Auswärtsbewegung der Helix F stattfindet (Klare et al., 2004), durch den Kontakt mit der transmembranen Helix 2 (TM2) von *Np*HtrII wird das Signal auf den Transducer übertragen.



**Abb. 8 :** Darstellung der Signalübertragung vom Rezeptor *Np*SRII auf die TM2 des Transducers *Np*HtrII (Klare, 2004)

Das Signal kann hierbei entweder in Form einer Drehbewegung oder einer vertikalen Translokation auf die TM2 übertragen werden. Zusätzlich wäre auch eine Kombination beider Modelle denkbar (Wegener et al., 2001a; Klare, 2002). Es ist bisher unklar, wie die schwache strukturelle Änderung im Rezeptor die signalweiterleitenden Bereiche im Cytoplasma erreicht. Ebenso ist unbekannt, ob das Signal auf seinem Weg verstärkt wird. Bisher gibt es hierzu lediglich Vermutungen, die sich aus der NMR-Struktur der HAMP Domäne von Hulko et al. (2006) ableiten lassen. Hulko et al. interpretieren die Daten so, dass ein Signaltransfer zwischen der ersten amphipatischen Sequenz (AS1) und der AS2 innerhalb der HAMP Domäne stattfindet. Bei diesem beschreiben Sie die Möglichkeit eines Rotationsprozesses. Diese Vermutung wird durch bisher unveröffentlichte ESR Daten von Klare gestützt, der in diesem Bereich Konformationsveränderungen detektieren konnte.

## 2. Experimenteller Teil – Material, Methoden und Synthesen

### 2.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel werden in der jeweils höchsten kommerziell verfügbaren Reinheit bezogen und ohne weitere Aufreinigungsschritte verwendet. Quellen für die verwendeten Chemikalien sind folgende Unternehmen: Acros (Geel/Bel), Applichem (Darmstadt), Applied Biosystems (Darmstadt), Baker (Deventer/NL), Bachem (Weil am Rhein), Biorad (München), Biosolv (Valkenswaard/NL), CalBiochem (Schwalbach), Deutero (Kastellaun), Fluka (Steinheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Novabiochem (Schwalbach), Promochem (Wesel), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Seelze), Toronto Research Chemicals (TRC, Toronto/Can).

Das polymere Trägermaterial für die Peptidsynthese stammt von Novabiochem (Schwalbach). Die Hefe und Peptonextrakte für die Expression von Proteinen stammen von GibcoBRL. Für die Aufreinigung der His-Tag-Proteine wird Ni<sup>2+</sup>-NTA-Superflow von Qiagen (Hilden) verwendet.

Der Protein-Molekulargewichtsmarker (Pharmacia, Freiburg) setzt sich aus den Proteinen Phosphorylase b (97 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20 kDa) und Lactalbumin (14,4 kDa) zusammen.

Der Spinlabel (1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat (MTSSL) stammt von Toronto Research Chemicals.

Bei allen %-Angaben in dieser Arbeit handelt es sich bei Feststoffen um Gewichtsprozent, bei Flüssigkeiten um Volumenprozent.

### 2.2 Instrumentation

Die automatisierte Peptidsynthese wird auf einem Peptidsynthesizer 412 von Applied Biosystems (Foster City/USA) durchgeführt.

Die Gefriertrocknung der Peptide erfolgt mit einer Christ (Osterode) Alpha I-5 Gefriertrocknungsanlage.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wird im analytischen Maßstab mit einem Beckman (Krefeld) Gold System (Module 126, 168, 508) durchgeführt, im

präparativen Maßstab unter Verwendung eines Waters System (Eschborn) bestehend aus Controller 600, Dual 1 Absorbancedetector 2487 und einem Waters Fraktionssammler unter Verwendung von Säulen der Firma Vydac (Temecula/USA).

UV-VIS-Absorptionsmessungen werden an einem UV-2401PC von Shimadzu (Duisburg) durchgeführt.

Das verwendete CD Spektrometer ist ein Modell J-710 von Jasco (Groß-Umstadt).

Der verwendete UV-Reaktor RPR200 stammt von Rayonet (Branford/USA) und ist mit acht RPR3500 Leuchtmitteln mit jeweils 20 Watt Lichtleistung ausgestattet.

Die dargestellten Massenspektren werden auf einem LCQ-System von Finnigan (Bremen) ausgestattet mit einem Agilent (Santa Clara/USA) LC System gemessen.

Die  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren werden auf einem Varian Mercury 400 (Darmstadt) bei 400 bzw. 100,6 MHz gemessen. Die Kalibrierung der Spektren erfolgt auf das Lösungsmittelsignal der verwendeten deuterierten Lösungsmittel.

Die ESR Spektren werden auf einem Magnetech (Berlin) MS200 ESR Spektrometer gemessen.

Transformierte *E. coli*-Stämme für die Expressionen von *NpHtrII*(1-94)-MXE-His und *NpHtrII*(1-114/M100C)-His wurden freundlicherweise von Frau Swetlana Martell zur Verfügung gestellt.

*E. coli* Zellen werden unter aeroben Bedingungen in einem Schüttler von New Brunswick (Nürtingen) inkubiert.

Der Zellaufschluss erfolgt mit einem Microfluidizer M-110S der Firma Microfluidic Corporation (Newton/USA).

Zur Sedimentation von Proben und Zellen wurden folgende Zentrifugen verwendet: Eppendorf (Hamburg) 5417R Tischzentrifuge mit FA45-24-11 Rotor, sowie Beckman-Coulter (Krefeld) Optima L-80XP mit Ti45 oder Ti70 Rotor und Beckman-Coulter Avanti J-26XP mit einem JLA-8.1000 Rotor.

Die Polyacrylamidgelelektrophoresen erfolgen mit dem Mini-Protean III-System von Biorad. Proteinlösungen werden mit Centricons der Ausschlussgrößen 5 kDa und 10 kDa von Millipore (Eschborn) ankonzentriert.

## 2.3 Chemische Methoden

### 2.3.1 Festphasensynthese von Peptiden

Die in dieser Arbeit synthetisierten Peptide werden nach der Methode der Festphasensynthese dargestellt (Merrifield, 1963). Sowohl RBD(96-131), RBD(51-95/91Dpr)-COSR, RBD(51-95/91'NOPA')-COSR sowie die weiteren genannten kurzen Peptide werden hierbei manuell und/oder auf einem Peptidsynthesizer hergestellt. Bei der Synthese wird das *in situ* Neutralisations- und HBTU [2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexaphosphat] Aktivierungsprotokoll für die Boc-Schutzgruppenstrategie verwendet (Schnölzer et al., 1992). Die Synthesen nach der Boc-Strategie werden auf Boc-AS-OCH<sub>2</sub>-phenylacetamidomethyl-Harzen durchgeführt, im Fall der C-terminalen Thioester Peptide wird dieses Harz modifiziert, so dass bei der Abspaltung des Peptides vom Harz der für die Ligation benötigte Thioester freisetzt wird.

Die reaktiven Seitenketten der Aminosäuren sind bei der Boc-Strategie wie folgt geschützt : Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHx), Cys(Trt), Cys(p-MeBzl), Dpr(Aloc), Glu(OcHx), His(DNP), His(3-BOM), Lys(2-Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl). Bei den nicht genannten Aminosäuren sind die Seitenketten ungeschützt. Sämtliche Synthesen werden in den Maßstäben 0.2 oder 0.4 mmol durchgeführt, bei der manuellen Synthese erfolgte diese in Glasgefäßen mit Frittenböden (Porengröße 3) und Vakuumanschluss, sofern notwendig wird Argon als Schutzgas verwendet.

#### 2.3.1.1 Boc-Strategie

Das verwendete polymere Trägerharz wird in N,N-Dimethylformamid (DMF) für mindestens 20 Minuten gequollen. Die N-terminale Boc-Schutzgruppe der ersten Aminosäure wird durch zweimal jeweils 1 minütige Behandlung des Harzes mit 100 % Trifluoressigsäure (TFA) entfernt. Die TFA wird im Anschluss durch Waschen des Harzes mit DMF (ca. 100-120 ml) für 1 Minute entfernt. Die zu koppelnde Aminosäure (10 Äquivalente bzgl. des Synthesemaßstabes) wird mit 9.8 Äquivalenten HBTU (0.5 M Lösung in DMF) und 1 ml DIEA 3 Minuten vorinkubiert und dann zum Harz gegeben. Die übliche Reaktionszeit beträgt hierbei 12-15 Minuten. Zeigt der Kaisertest durch Blauverfärbung eine nicht vollständige Reaktion an (Sarin et al., 1981), wird der Kopplungsschritt wiederholt. Im Falle der Aminosäuren Arg, Thr und Asn wird grundlegend eine Doppelkopplung durchgeführt. Nach

der Kopplung der Aminosäure wird das Harz für eine Minute mit DMF (ca. 100-120 ml) gewaschen, anschließend wird zur Kopplung der nachfolgenden Aminosäure dieser Vorgang wiederholt. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen wird vor und nach Kopplung von Gln und Asn das Harz zusätzlich für 1 Minute mit DCM (100-120 ml) gewaschen. Die Einführung von Dpr(Aloc) erfolgt nach unverändertem Protokoll. Bei der Synthese von RBD(51-95/91Dpr)-COSR muss zuerst die Schutzgruppe des Thiols vom Linker abgespalten werden. Dies geschieht durch zweimaliges Behandeln des Harzes mit einer Lösung von 6.2 ml Piperidin, 4.8 ml 2-Mercaptoethanol in 20 ml DMF für jeweils 15 Minuten. Vor der ersten Kopplung wird das Harz 1 Minute mit DMF gewaschen, der Abspaltschritt für die Boc-Schutzgruppe entfällt.

### *2.3.2 Entschützung der Aloc-Gruppe*

Zur Entschützung der Aloc-Gruppe an der festen Phase von Dpr-91 wird das Harz unter Argon mit 250 ml DCM gewaschen und 10 Minuten in DCM gequollen. Diese Prozedur wird dreimal wiederholt. Das Harz wird mit wenig DCM bedeckt und 10 Äquivalente Phenylsilan werden hinzugefügt. Die für die Abspaltung notwendigen 0.5 Äquivalente Pd(0)(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> werden in einem möglichst kleinen Volumen DCM gelöst und zum Harz gegeben. Während der 20 minütigen Reaktionszeit muss regelmäßig durch den Argonstrom verdampftes DCM ergänzt werden. Nach 20 Minuten wird das Harz großzügig mit DCM gewaschen, bis keine Gelbfärbung mehr feststellbar ist. Diese Prozedur wird dreimal wiederholt. Der Erfolg der Aloc Abspaltung wird per Kaisertest geprüft (Grieco et al., 2000).

### *2.3.3 Markierung von Peptiden an der festen Phase*

Zur Markierung von RBD(51-95/91Dpr)-COSR wird das Harz im Anschluss an die Aloc Entschützung in DMF aufgenommen und für 60 Minuten gequollen, wobei alle 10 Minuten das Lösungsmittel erneuert wird. Die Markierungsreaktion erfolgt mit 5 Äquivalenten von entweder DTOPC (**5**) oder oNV-DTOPC (**7**) unter Zugabe von 4.9 Äquivalenten 0.5 M HBTU in DMF und 350 µl DIEA. Nach 20 Minuten wird mittels Kaisertest überprüft, ob die Reaktion abgelaufen ist. Bei einem negativen Kaisertest wird das Harz zuerst mit DMF und anschließend mit DCM gewaschen und anschließend getrocknet.

### 2.3.4 Entschützung und Abspaltung der Peptide

Nach der Beendigung der Synthese wird die N-terminale Boc-Schutzgruppe mit TFA abgespalten. Es wird mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Harz wird in ein Teflongefäß überführt und 1 Stunde bei 0°C mit wasserfreiem HF in Gegenwart von 5 % p-Kresol behandelt (Miranda et al., 1997). Bei der Abspaltung von RBD(96-131) wird 1 Gewichtsäquivalent Cystein hinzugefügt. Das HF wird unter reduziertem Druck bei 0°C entfernt und der Rückstand mit wasserfreiem Diethylether suspendiert. Das Präzipitat wird gefiltert und mehrmals mit wasserfreiem Diethylether gewaschen. Das so gewonnene Rohpeptid wird in einem Gemisch von 50 % Puffer B (MeCN, + 0.08 % TFA) in Puffer A (H<sub>2</sub>O, + 0.1 % TFA) gelöst, vom zurückbleibenden Harz getrennt und anschließend lyophilisiert.

### 2.3.5 Aufreinigung der Peptide

Die Aufreinigung der Peptide erfolgt durch RP-HPLC, sowohl im analytischen, wie auch im präparativen Maßstab auf C4-Säulen von Vydac bei Flussraten von 1-10 ml/min. Hierzu werden die Peptide in einem Puffer bestehend aus 6 M GdnHCl, 300 mM NaOAc, pH 4.0 gelöst und auf die Säule aufgetragen. Das erste Modul besteht aus einem Waschschriff bei 5 % Puffer B in Puffer A. Anschließend werden die Peptide durch Verwendung eines Gradienten von 5 % Puffer B in Puffer A nach 50 bzw. 65 % Puffer B in Puffer A in 30 bzw. 80 Minuten eluiert. Die Detektion der Peptide erfolgt bei 214 nm und 280 nm. Die vereinigten, das aufgereinigte Peptid enthaltenden, Fraktionen werden lyophilisiert.

### 2.3.6 Chemische Ligation der Peptide

Die Ligrationsreaktionen zwischen RBD(51-95/91Dpr(X))-COSR (X = DTOPC (5) oder oNV-DTOPC (7)) und RBD(96-131), sowie zwischen *NpHtrII*(1-94)-Mesna und *NpHtrII*(A95C-114) werden in unterschiedlichen Konzentrationen von 0.5 mM bis 4 mM durchgeführt. Hierzu werden der C-terminale Thioester und 1-10 Äq. des N-terminalen Peptides in einem Puffer von 6 M GdnHCl, 300 mM NaPi, pH 7.4 bzw. 8 im Fall des *NpHtrII* gelöst und mit unterschiedlichen Ligrationsvermittlern versetzt (Mesna, Thiophenol, MPAA). Die Reaktionsdauer beträgt 12 - 48 h bei RT oder 40°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 Spatelspitze TCEP, 1.5 Volumenäquivalenten 2-Mercaptoethanol und sofern notwendig 1-2

Volumenäquivalenten des Ligationspuffers beendet. Die Aufreinigung der Ligationansätze erfolgt bei der RBD durch RP-HPLC, bei HtrII durch Rekonstitutions- und Zentrifugationsschritte. Im Fall der *Np*HtrII-Ligationen wurde eine TCA-Fällung durchgeführt und die Ligationmischung mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

### *2.3.7 Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe in Lösung*

Einige der synthetisierten Peptide enthalten einen Spinlabel, welcher mit einer photolabilen Schutzgruppe (Nitroveratryl) versehen ist. Um diese Gruppe zu entfernen, muss das Peptid mit UV-Licht bei 350-365 nm behandelt werden. Diese Behandlung wird bei einer Konzentration von 1-4 mg/ml in unterschiedlichen Puffern (tabellarische Übersicht jeweils im Ergebnisteil) für bis zu 60 Minuten in einem UV-Reaktor RP-200 von Rayonet mit Intensität von  $1.65 \times 10^{16}$  Photonen pro Sekunde und  $\text{cm}^3$  durchgeführt.

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Faltung der chemisch generierten RBDs

Für folgende biophysikalische Messungen mussten die chemisch generierten RBDs in ihre native Form gebracht werden. Hierzu wurden 1 mg der Lyophilisate in 1 ml Puffer (150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Mesna, pH 7.4) gelöst und bei 4°C für 24 h sanft geschüttelt.

### 2.4.2 Nukleotidaustausch an H-Ras

Zum Nukleotidaustausch wird mit GDP beladenes H-Ras über eine NAP10 Säule (Sephadex G25) in magnesiumfreien Puffer (200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 32 mM TrisHCl, 0.5 mM DTE, 0.5 mM NaN<sub>3</sub>, pH 8.0) überführt. Das Eluat wird auf ca. 1 ml ankonzentriert. Im Folgenden werden 3 Äquivalente des auszutauschenden Nukleotides und 10 Units alkalische Phosphatase je mg Ras hinzugefügt. Die Reaktion wird über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt und der Austausch per HPLC auf einer C18 Säule (Bischoff Nukleosil) unter ionenpaarenden Bedingungen überprüft (John et al., 1988). Anschließend wird das Protein über eine NAP10 Säule in einen Puffer aus 150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Mesna, pH 7.4 überführt und gelagert.

### 2.4.3 Expression von rekombinanten *NpHtrII*-Konstrukten

Die Expression der *NpHtrII*-Konstrukte erfolgt in bereits transformierten *E. coli* Zellen (BL21(DE3), Lac und T7-Promotor kontrolliert) in LB-Medium (40 g Trypton, 20 g Hefeextrakt, 40 g NaCl pro 4 L, pH 7.2) bei 37°C. Die Hauptkultur wird unter halbsterilen Bedingungen angeimpft, es ergibt sich eine OD<sub>578</sub> von 0.1, als Selektionsmarker dienen je nach Plasmid die Antibiotika Kanamycin oder Ampicillin. Bei Erreichen der OD<sub>578</sub> von 1 wird mit 0.5 mM IPTG induziert und die Zellen werden nach 4 Stunden durch Zentrifugation bei 5000 x g bei 4°C für 15 Minuten geerntet.

#### 2.4.4 Aufreinigung der rekombinanten Proteinen

Die Aufreinigung der rekombinant gewonnenen Proteine erfolgt nach Zellaufschluss mit einem Microfluidizer und Solubilisation in DDM-Micellen durch Kombination von Zentrifugationsschritten (150.000 x g, 60 Min., 4°C) und Anwendung der Affinitätschromatographie (Ni-NTA). Das Eluat der Nickel-NTA Aufreinigung wird durch Dialyse von Imidazol befreit und die Konzentration an Protein per UV-VIS Spektroskopie bestimmt.

#### 2.4.5 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Durchführung der analytischen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt nach der Methode von Schagger und von Jagow (Schagger und von Jagow, 1987). Die Acrylamidkonzentration beträgt jeweils 16.5 % bei einem Vernetzungsgrad von 3 %. Die Proteinproben werden vor dem Auftragen auf das Gel jeweils für mindestens 30 Minuten bei RT in Probenpuffer inkubiert.

Enthält die Probe GdnHCl oder weist eine niedrige Konzentration (< 0.04 g/L) auf, wird sie durch Zusatz eines Volumenäquivalentes eiskalter 10 % wässriger TCA gefällt und für 30 Minuten inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 15000 rpm in einer Tischzentrifuge wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 Volumenäquivalent 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknung wird das Pellet in SDS Probenpuffer aufgenommen. Die Gele wurden entweder mittels Coomassie Brilliant Blau R250 oder mittels Silver Staining Plus Kit (Biorad) gefärbt.

#### 2.4.6 Kopplung von Cysteinmutanten mit Spinproben

Die durch Expression gewonnene *NpHtrII*-Cysteinmutante wird mit 10 mM DTE bei 4°C unter Argon inkubiert. Nach 30 Minuten wird das DTE durch Pufferaustausch über einen Konzentrator entfernt. Die erhaltene Proteinlösung wird mit einem 30-fachen Überschuss von MTSSL (100 mM in DMSO) versetzt und die Reaktionslösung unter Lichtausschluss über Nacht bei 4°C geschwenkt.

#### 2.4.7 Rekonstitution der Membranproteine

Für die Rekonstitution der *NpHtrII* Konstrukte (in der Folge als *NpHtrII* bezeichnet) mit *NpSRII<sub>His</sub>* (als *NpSRII* bezeichnet) wird ein Verfahren nach Holloway (1973) und Rigaud et al. (1997) verwendet. Die beiden Proteine *NpHtrII* und *NpSRII* werden in stöchiometrischen Mengen bei minimalem DDM Gehalt miteinander vermischt, der Gehalt von NaCl auf 1 M erhöht und für 15 Minuten unter Lichtausschluss und gelegentlichem Schwenken inkubiert. Es wird 1 Massenäquivalent polarer Lipide zugesetzt und abermals 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss werden Detergenzadsorber-Beads (Biorad) hinzugefügt und über Nacht unter Lichtausschluss bei 4°C geschwenkt. Nach erfolgter Eintrübung der Lösung können die Beads abgefiltert und die Membranfraktion mittels Tischzentrifuge bei 14000 rpm sedimentiert werden.

#### 2.4.8 Expressed Protein Ligation von *NpHtrIII-114*

Zur Ligation von *NpHtrIII-114* wird die „expressed protein ligation“ verwendet. Verwendung findet das C-terminale Fragment (1-94) des *NpHtrII*, als Fusionskonstrukt mit einem MXE-Intein und einem His-Tag, sowie der chemisch synthetisierte N-terminale Teil mit einem Cystein. Die Ligationspartner werden im molaren Verhältnis 1:2 (C:N-Terminus) in einem Puffer von 500 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 8.0 sowie einem DDM Gehalt unterhalb der CMC gelöst. Die Reaktion wird in einem Dialyseschlauch mit MWCO 1000 Da in Gegenwart eines Massenäquivalentes polarer Lipide (*Halobacterium salinarium*) und 700 mM Mesna durchgeführt. Der Ansatz wird gegen einen Puffer von 500 mM NaCl, 300 mM Mesna, 10 mM TrisHCl pH 8.0 in Gegenwart von Biobeads (Biorad) dialysiert. Nach 12 h Reaktionszeit wird der Dialysepuffer ohne Mesna Zusatz erneuert, dieses wird wiederholt bis der Ligationansatz eintrübt und keine Schaumbildung mehr feststellbar ist, ggf. sind die Biobeads zu erneuern. Zur Ligationkontrolle mittels SDS-Gelelektrophorese werden kleine Proben entnommen, welche durch Zentrifugation pelletiert werden (Tischzentrifuge, 14000 rpm, 4°C), das Ligationprodukt befindet sich im Pellet. Die Reaktion wird durch Zentrifugation für 60 Minuten in einem Ti70 Rotor bei 28000 rpm beendet. Das resultierende Pellet wird über Nacht durch Zugabe eines Puffers von 500 mM NaCl, 50 mM NaPi, 2 % DDM, pH 8.0 solubisiert. Das Ligationprodukt befindet sich solubilisiert im Überstand.

## 2.4.9 Peptid- und Proteinanalytik

### 2.4.9.1 RP-HPLC

Die Analyse der Peptide erfolgte mittels RP-HPLC auf C4-Säulen von Vydac bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die verwendeten Laufbedingungen waren, sofern nicht anders angegeben, waschen mit 5 % Puffer B in Puffer A, gefolgt von einem Gradienten von 5 % Puffer B in Puffer A auf 65 % Puffer B in Puffer A über 30 Minuten. Die Reaktionskontrolle der Ligationen erfolgte jeweils nach Entnahme einer Probe, welche anschließend mit 1.5 Volumenäquivalenten 2-Mercaptoethanol und 0.2 Volumenäquivalenten 0.1 M TCEP Lösung in 6 M GdnHCl, 300 mM NaPi bei pH 7.4 versetzt wurde. Um unlösliche Bestandteile abzutrennen, wurde die Probe zentrifugiert und dann auf das HPLC System injiziert.

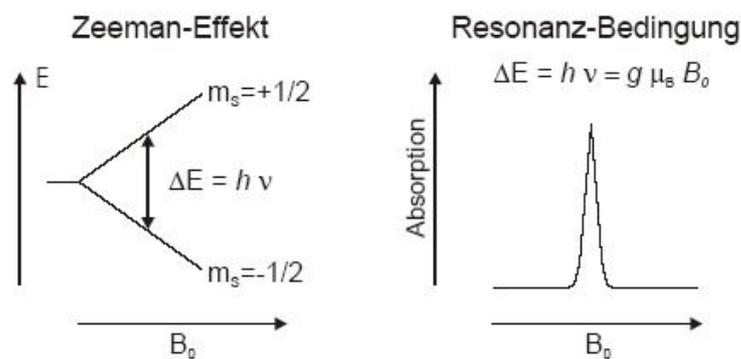
### 2.4.9.2 Massenspektrometrie

Für die Massenspektrometrie wurde ein LC-ESI Massenspektrometer der Firma Finnigan verwendet. Für ESI-Spektren wurden die Proben in 50 % Puffer B in Puffer A aufgenommen und injiziert. Bei der Erstellung eines LC-MS wurden die Proben entweder in 6 M GdnHCl, 300 mM NaOAc, pH 4 oder ebenfalls in 50 % Puffer B in Puffer A zuerst auf eine C4 Säule injiziert. Zu Kontrollzwecken wurden MALDI Spektren angefertigt. Als Matrix diente hierbei entweder 2,5-Dihydroxybenzoesäure, SA oder  $\alpha$ -Cyano-Zimtsäure jeweils als gesättigte Lösung in 50 % Puffer B in Puffer A.

## 2.5 Biophysikalische Methoden

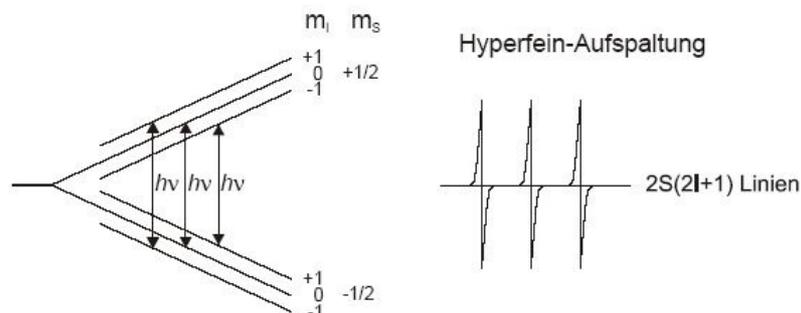
### 2.5.1 ESR-Messungen

Unter der Elektronenspinresonanz (ESR) versteht man die resonante Absorption von Mikrowellenstrahlung durch paramagnetische Substanzen. Hierbei werden die Übergänge zwischen den unterschiedlichen Energieniveaus der ungepaarten Elektronenspins im Magnetfeld angeregt (Zeemaneffekt).



**Abb. 9** : schematische Darstellung des Zeemaneffektes und der Resonanzbedingungen (Klare, 2002)

Durch Wechselwirkung des Elektrons mit den magnetischen Momenten der benachbarten Atomkerne kommt es zur Aufspaltung der Resonanzlinie in Abhängigkeit des Kernspins  $I$ . Gemäß der quantenmechanischen Auswahlregel sind bei einem Kernspin  $I=1$  im Spektrum  $(2I+1) = 3$  Resonanzlinien zu erwarten.



**Abb. 10** : Hyperfeinaufspaltung der Zeeman-Niveaus durch Wechselwirkung mit dem Kernspin am Beispiel des Stickstoffs ( $^{14}\text{N}$ ) mit  $I = 1$ . Das resultierende Linienspektrum des freien Spinlabels zeigt die drei Hyperfeinlinien gemäß  $(2I + 1) = 3$ .

Bei der ESR-Spektroskopie an Biomolekülen werden im Allgemeinen Spinsonden (auch Spinlabel genannt) verwendet. Bei diesen Molekülen handelt es sich um spezielle organische Radikale (oft N-Oxide), welche kovalent an das zu untersuchende Makromolekül gebunden werden (Nordio, 1976, Hubbel et al., 1998)

Die ESR-Messungen werden bei Raumtemperatur in Glaskapillaren durchgeführt. Die Proteine bzw. Peptide werden hierbei in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Zur Kontrolle der Entschützungsreaktion wird im Fall der RBD 50% Acetonitril in Wasser verwendet. Für die abschließenden Messungen liegt die RBD einzeln und im Komplex mit Ras in einem Puffer aus 150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Mesna, pH 7.4 vor. Die Messungen von *NpHtrII* im Komplex mit *NpSRII* werden bei 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8 in rekonstituiertem Zustand in polaren Lipiden durchgeführt.

### 2.5.2 CD-Spektroskopie

Die CD Spektren werden mit einer Xenonlampe unter Niedrigsalzbedingungen (max. 50 mM NaCl) bei einem pH-Wert von 7.0 oder 7.4 gemessen. Die Schichtdicke der Küvette beträgt 1 mm, die Proteinkonzentration liegt bei 30 bis 70 µM. Die Spektren werden im UV-Bereich von 190 nm bis 250 nm aufgenommen. Die Spektren wurden jeweils um den Pufferbeitrag korrigiert und die Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die Auswertung der Spektren erfolgte qualitativ durch Vergleich mit Spektren von Becker (2001) und Sydor (1998).

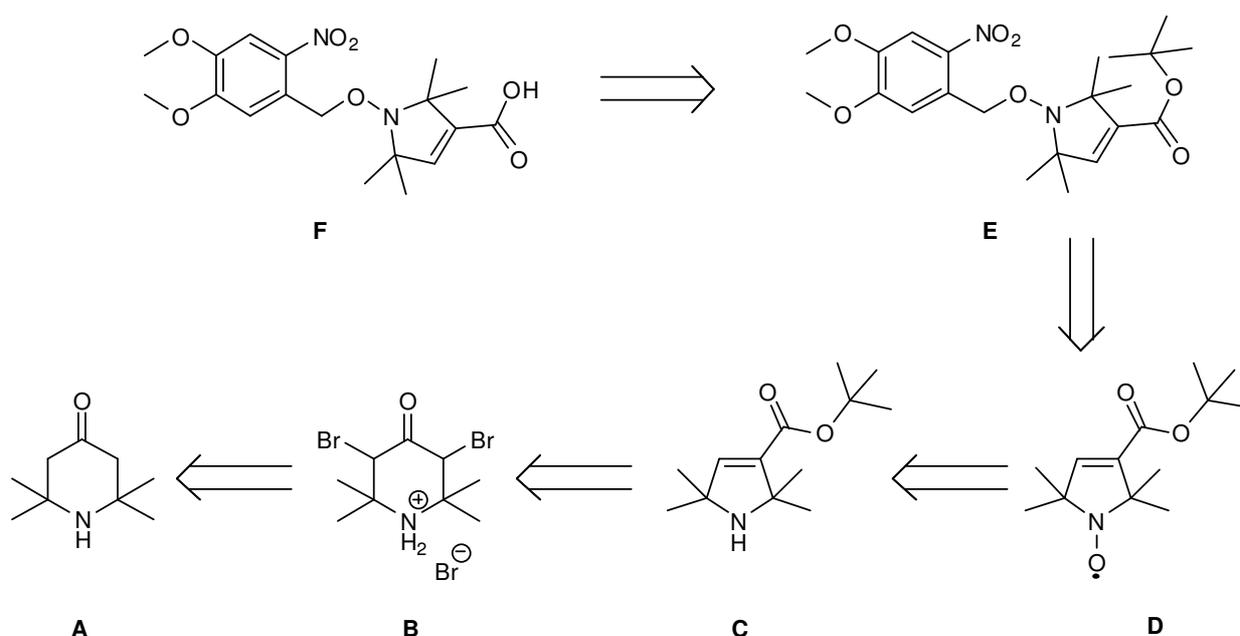
### 2.5.3 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie wird mit einem Beckmann Gold System mit einer Sephadex S75 Säule von Amersham durchgeführt. Als Elutionsmittel wird isokratisch ein Puffer von 150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7.4 verwendet. Die Proteinkonzentration lag bei 25 bis 50 µM, zur Detektion wurde die UV-Absorption bei 214 nm verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Synthesen der Spinlabel

##### 3.1.1 Retrosynthetische Analyse



**Abb. 11:** Retrosynthetische Analyse für die Syntheseplanung der Spinlabel

Das Ziel der Arbeit ist die Darstellung eines Proteins oder Peptides mit einer funktionalen ESR-Markierung. Um dieses Ziel erreichen zu können, müssen zwei Spinlabel synthetisiert werden, da sich bei der Arbeit mit dem ersten Zielmolekül zeigte, dass dieses nicht mit der Ligation kompatibel ist. Das erste Zielmolekül ist 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-pyrrol-3-carbonsäure (DTOPC). Bei DTOPC handelt es sich um ein N-Oxid in einem 5-Ring-Pyrrolsystem, welches über die Carboxyfunktion an ein Peptid gekoppelt werden kann. Das N-Oxid im Pyrrolsystem wird von den MTSSL-Spinlabeln übernommen, um zusätzliche Kopplungen oder Konformationseffekte auszuschließen. Das zweite Zielmolekül ist 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-carbonsäure (oNV-DTOPC) und weist abgesehen von der Nitroveratrylschutzgruppe (oNV) die gleichen strukturellen Merkmale wie DTOPC auf. Im Gegensatz zu DTOPC ist oNV-DTOPC nicht direkt nach dem Einbau in das Peptid spinaktiv, sondern muss zuerst durch Photolyse entschützt werden.

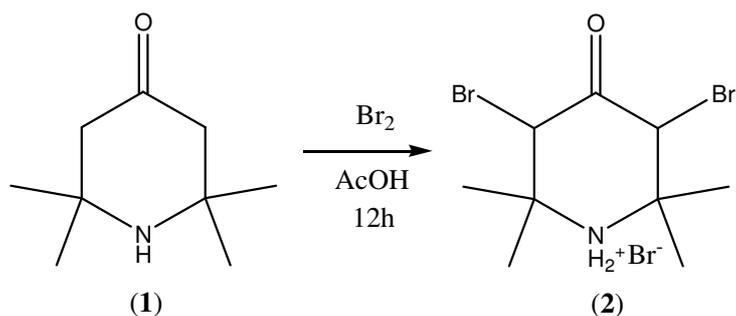
Die retrosynthetische Analyse der Zielmoleküle DTOPC und oNV-DTOPC zeigt, dass beide

Zielmoleküle sich auf das gemeinsame Synthon **D** zurückführen lassen. Die Synthesen der beiden Zielmoleküle DTOPC und oNV-DTOPC beginnen daher bei dem kommerziell erhältlichen Synthon **A** (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-4-on). Dieses wird mittels einer doppelten  $\alpha$ -Halogenierung zum dibromierten Keton **B** als Hydrobromid überführt. Im nächsten Syntheseschritt muss der 6- zum 5-Ring verengt und die Doppelbindung generiert werden, dies ist notwendig um die Pyrrolstruktur zu generieren. Dieser Schritt kann unter basischen Bedingungen mittels einer Favorskii-Umlagerung zu **C** realisiert werden. Hierbei sieht die klassische Variante den Einsatz von Natriumalkoholaten vor, welche zum Methyl- oder Ethylester führen würden. Die Planung dieser Synthese geht jedoch von der Umsetzung zum tert.-Butylester aus, da dieser im Rahmen der gewählten Schutzgruppenstrategie unproblematischer erscheint. Die Umsetzung des Amins zum N-Oxid **D** kann in Gegenwart von katalytischen Mengen Wolframat durch  $H_2O_2$  erfolgen. Wird die Verwendung eines ungeschützten Spinlabels angestrebt, kann **D** direkt in Gegenwart von Trifluoressigsäure zur Carbonsäure umgesetzt werden und steht direkt für die Peptidsynthese zur Verfügung. Muss jedoch eine geschützte Form des Spinlabels verwendet werden, ist es notwendig das N-Oxid gezielt zu schützen. Für diese Reaktion stehen bisher nur eingeschränkte Literaturangaben bereit. Die Planungen für diesen Syntheseschritt gingen daher zuerst von der Anwendung der Grignardreaktion aus, alternativ wurde an dieser Stelle auch eine Umsetzung in Form einer „Zweischritt“ Reaktion mit vorgeschalteter Reduktion und anschließender nukleophiler Substitution angestrebt. Die Entschützung des tert.-Butylesters von **E** zu oNV-DTOPC erfolgt mit Trifluoressigsäure.

### 3.1.2 Durchgeführte Synthesen

Abbildungen der jeweiligen  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sind im *Appendix C* enthalten.

#### 3.1.2.1 Synthese von 3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on Hydrobromid (**2**)

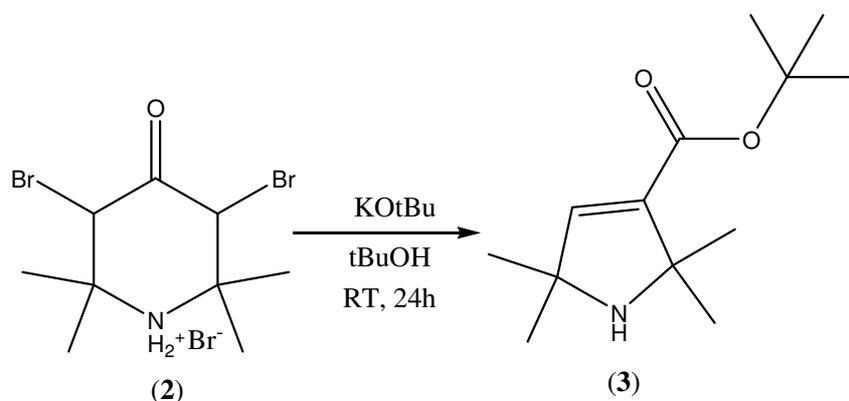


In einem 500 ml Dreihalskolben ausgestattet mit einem Tropftrichter und einem KPG-Rührer werden 10 g (0.0644 mol) 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-4-on (**1**) in 250 ml Eisessig gelöst. Unter starkem Rühren werden 7.2 ml (0.144 mol; 2.2 Äq.) Brom gelöst in 100 ml Eisessig zugegeben. Nach 12 Stunden Reaktionszeit wird der ausgefallene weiße Feststoff abgefiltert und zweimal mit 250 ml Eisessig, gefolgt von 250 ml Eiswasser und 250 ml kaltem Diethylether gewaschen. Der Feststoff wird im Vakuum getrocknet und kann ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet werden. Für analytische Zwecke wurde ein Teil des Materials aus 50 % Acetonitril in Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 11.5 g (45 % d.Th.) 3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on Hydrobromid (**2**)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 5.5 ppm (s, 2H,  $\text{CHBr}$ ); 1.7 ppm (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ); 1.35 ppm (s, 6H,  $\text{CH}_3$ )

### 3.1.2.2 Synthese von 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-tert.-Butylester (**3**)

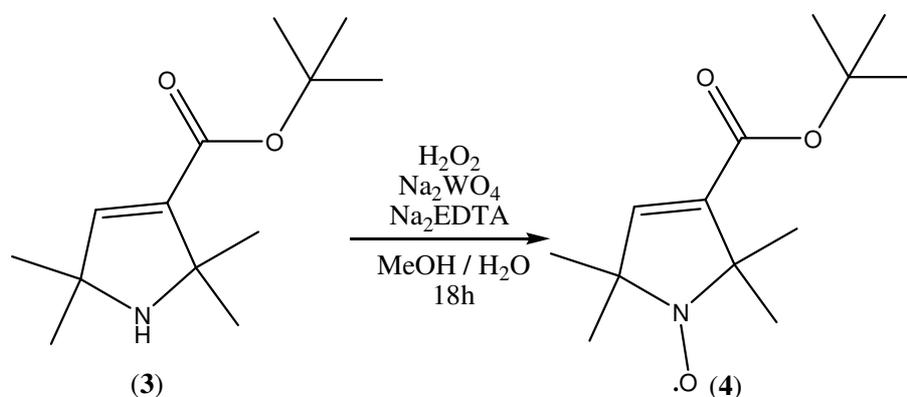


In einem 500 ml Zweihals-Kolben werden 11.5 g (0.0292 mol) 3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on Hydrobromid (**2**) in 350 ml trockenem tert.-Butanol gelöst. Anschließend werden 28 g (0.25 mol, 8.5 Äq.) Kalium tert.-Butanolat in 3 Portionen zugegeben. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 200 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit jeweils 250 ml Wasser gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Rohprodukt kann ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt verwendet werden. Zu analytischen Zwecken wurde ein kleiner Teil per Silicagelchromatographie (Cyclohexan : Ethylacetat) aufgereinigt.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6.53 ppm (s, 1H, vinyl); 1.48 ppm (s, 9H, tBu-Gruppe); 1.37 ppm (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ); 1.27 ppm (s, 6H,  $\text{CH}_3$ )

Ausbeute: 5.16 g (78 % d.Th.) 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-tert.-butylester (**3**)

### 3.1.2.3 Synthese von 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-pyrrol-3-tert.-butylester (**4**) :



In einem 250 ml Rundkolben werden 5.13 g (0.023 mol) 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-tert.-butylester (**3**) in 120 ml einer Mischung von Methanol, 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Wasser (63/31/6) gelöst und unter Zugabe von 0.4 g (0.0012 mol, 5 mol-%)  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  und 0.4 g (0.0012 mol, 5 mol-%)  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  Dihydrat über Nacht zur Reaktion gebracht. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Extrakte werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird über Silicagelchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat) aufgereinigt.

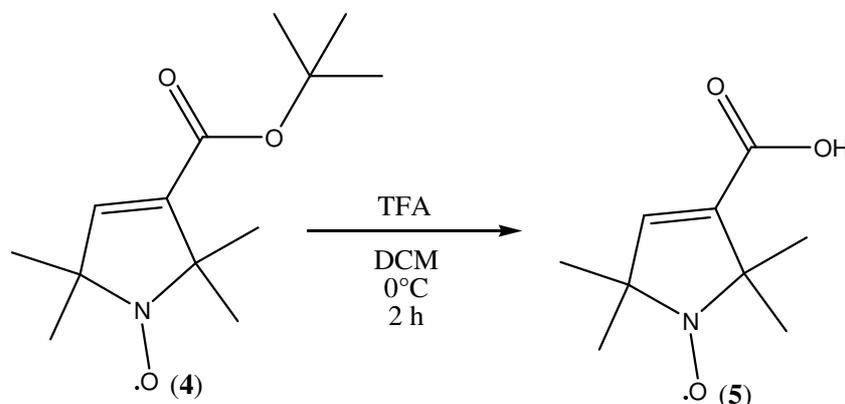
Elementaranalyse; berechnet: 64.9 % C, 9.2 % H, 5.8 % N, 20.1 % O; Gefunden: 64.8 % C, 9.4 % H, 5.8 % N, 20 % O.

Es wurde wegen des N-Oxides kein NMR-Spektrum angefertigt, weil die paramagnetische Spezies eine starke Signalaufweitung bewirkt und das Spektrum nicht interpretierbar ist.

Ausbeute: 3.8 g (69 % d.Th.) 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-pyrrol-3-tert.-butylester (**4**)

### 3.1.2.4 Synthese von 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-pyrrol-3-carbonsäure (DTOPC)

(5)



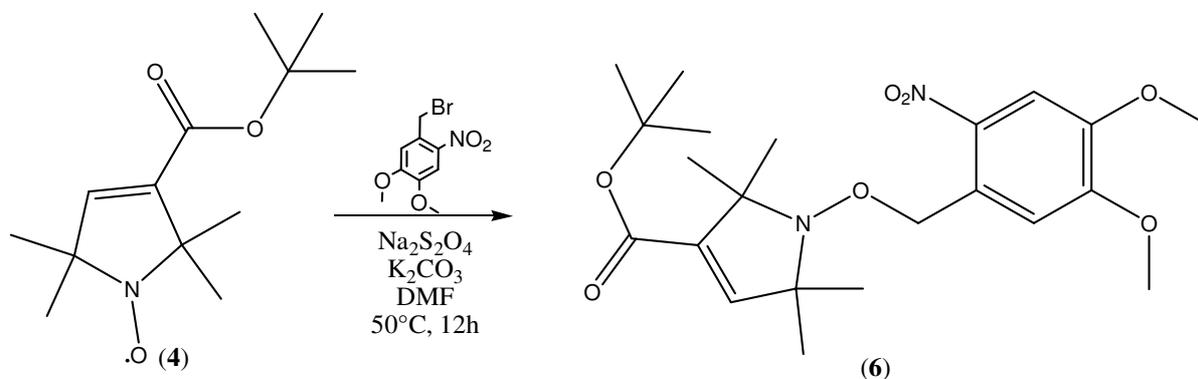
In einem 100 ml Rundkolben werden 1 g (0.0042 mol) 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-pyrrol-3-tert.-butylester (4) in 35 ml Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung werden 35 ml Trifluoressigsäure langsam hinzugefügt. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion (ca. 2 Stunden) wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt (*Achtung ! Trifluoressigsäuredämpfe!*). Der Rückstand wird mit 5 % Salzsäure versetzt und dreimal mit 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Extrakte werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat; + 1 % Essigsäure) aufgereinigt.

Elementaranalyse; berechnet : 58.7 % C, 7.7 % H, 7.6 % N, 26.1 % O; gefunden : 58.9 % C, 7.6 % H, 7.7 % N, 25.8 % O

Es wurde wegen des N-Oxides kein NMR-Spektrum angefertigt, weil die paramagnetische Spezies eine starke Signalaufweitung bewirkt und das Spektrum nicht interpretierbar ist.

Ausbeute: 0.751 g (98 % d.Th.) 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-pyrrol-3-carbonsäure (DTOPC) (5)

### 3.1.2.5 Synthese von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-tert.-butylester (6)



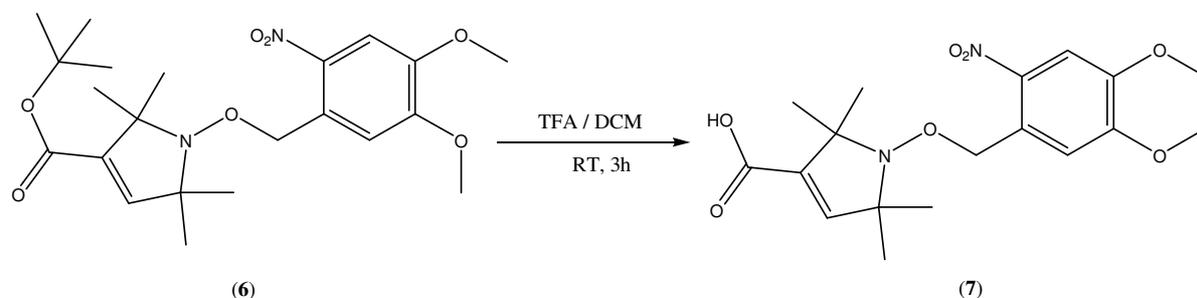
In einem ausgeheizten und dreimal mit Argon gespülten 100 ml Dreihals-Kolben mit Tropftrichter und Rückflusskühler werden 200 mg (0.8 mmol) 2,5-Dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl-pyrrol-3-tert.-butylester (4) in 30 ml absolutem N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst. Anschließend werden 4.4 g (0.032 mol, 40 Äq.) wasserfreies K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, sowie 0.85 g (0.005 mol, 6.2 Äq.) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> hinzugefügt und der Reaktionsansatz auf 50°C erwärmt. Sobald diese Temperatur erreicht ist, werden 921 mg (3.33 mmol, 4 Äq.) 1-(Bromomethyl)-4,5-dimethoxy-2-nitrobenzol (auch: 2-Nitroveratrylbenzylbromid) gelöst in 15 ml absolutem DMF zugetropft. Nach 12 Stunden wird die Reaktion auf Raumtemperatur abgekühlt und durch Zugabe von Wasser beendet. Die Reaktion wird sofort (*Wichtig: Natriumdithionit reduziert in Anwesenheit von Wasser Nitrogruppen zur Aminfunktionalität*) dreimal mit 250 ml Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Extrakte werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Rohprodukt wird per Silicagelchromatographie (100 x m<sub>Rohprodukt</sub>, Cyclohexan : Ethylacetat 9 : 1) aufgereinigt.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.67 ppm (s, 1H, arom. meta); 7.29 ppm (s, 1H, arom. ortho); 6.51 ppm (s, 1H, vinyl); 5.24 ppm (s, 2H, benzyl); 3.98 ppm (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 3.94 ppm (s, 3H; -OCH<sub>3</sub>); 3.73 ppm (s, 3H, -COOCH<sub>3</sub>); 1.43 ppm (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 1.30 ppm (s, 6H, CH<sub>3</sub>)

UV-VIS (DCM, 0.8 mmol): 244 nm, 300 nm (Schulter), 345 nm

Ausbeute: 255 mg (70 % d.Th.) 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-tert.-butylester (6)

### 3.1.2.6 Synthese von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-carbonsäure (oNV-DTOPC) (7)

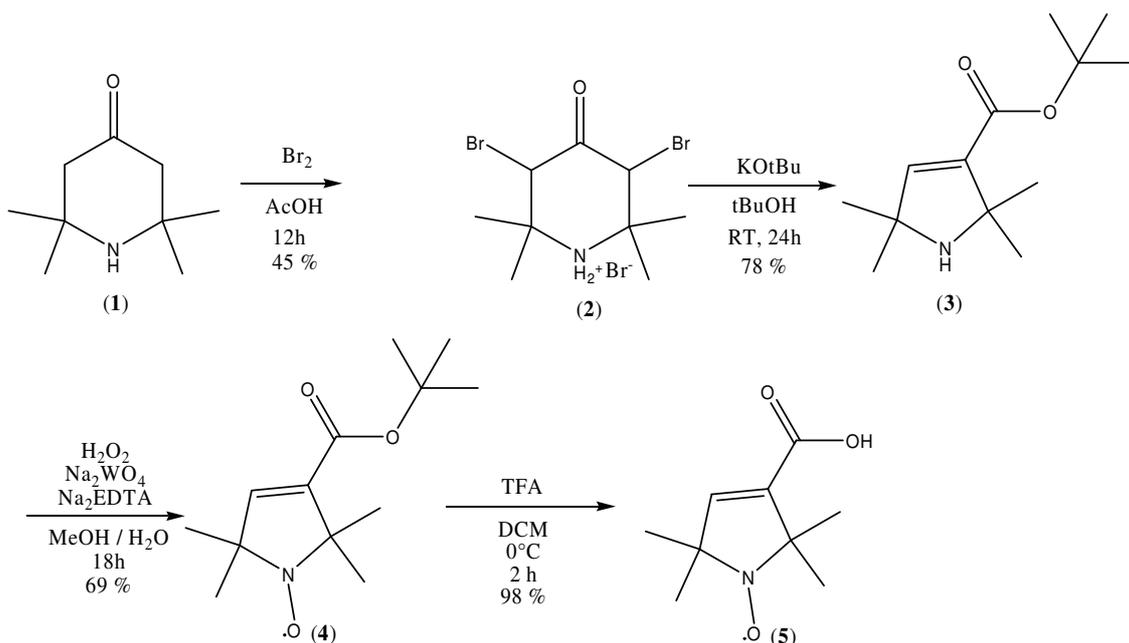


In einem 50 ml Rundkolben werden 200 mg (0.55 mmol) 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-tert.-butylester (6) in 10 ml Dichlormethan gelöst und auf 0°C gekühlt. Nach Zugabe von 10 ml Trifluoressigsäure wird die Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion (ca. 90 Minuten) wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt (*Achtung! Trifluoressigsäuredämpfe!*). Der Rückstand wird mit 5 % Salzsäure versetzt und dreimal mit jeweils 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Extrakte werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Silicagelchromatographie (Cyclohexan : Ethylacetat 8 : 2, +1 % Essigsäure) aufgereinigt.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7.62 ppm (s, 1H, arom. meta); 7.26 ppm (s, 1H, arom. ortho); 6.49 ppm (s, 1H, vinyl); 5.09 ppm (s, 2H, benzyloxy); 3.90 ppm (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 3.86 ppm (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 1.31 ppm (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 1.20 ppm (s, 6H, CH<sub>3</sub>)

Ausbeute: 160 mg (95 % d.Th.) 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-carbonsäure (oNV-DOTPC) (7)

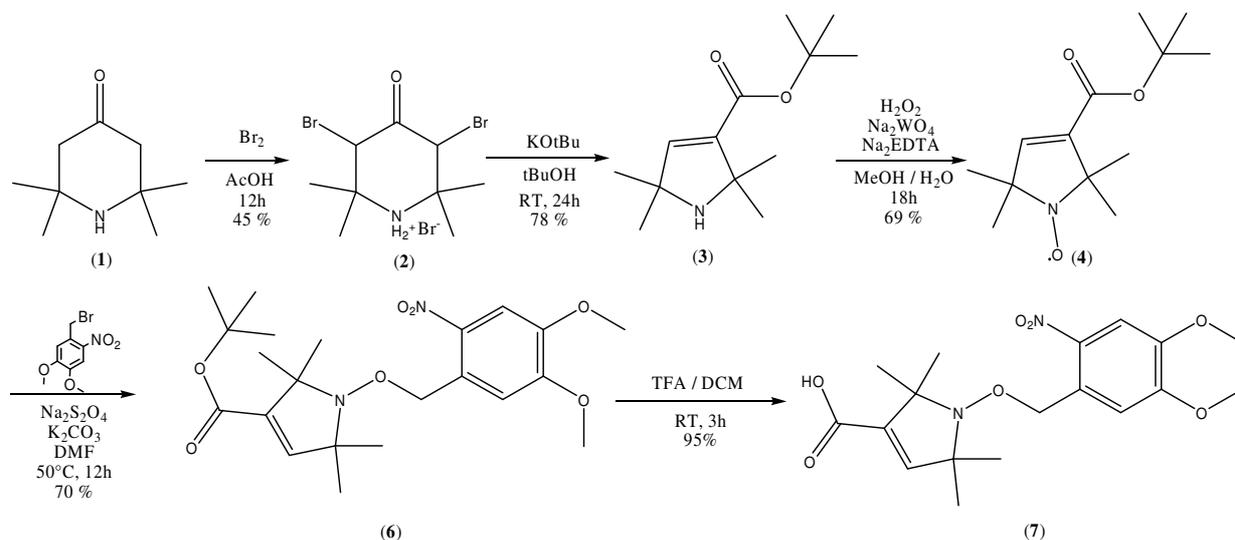
### 3.1.2 Zusammenfassung der Synthese der Spinlabelcarbonsäure



**Abb. 12:** Durchgeführte Synthese von DTOPC (5)

Die Synthese von DTOPC (5) zielt darauf ab, die von McNulty et al. (2002) aufgezeigte Strategie des Site directed spin labelings umzusetzen. Die hierzu verwendete Syntheselogik konnte auch für die weiteren Synthesen zugrunde gelegt und weiter verwendet werden. Der erste Schritt der Synthese, die Darstellung von 3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on Hydrobromid (2) stellt mit 45 % Ausbeute den schlechtesten Schritt in dieser Synthese dar. Die folgenden Reaktionen entsprechen der Synthesepaltung und liefern gute Ausbeuten, so dass DTOPC (5) in einer Gesamtausbeute über 4 Stufen von 24 % in hoher Reinheit dargestellt werden kann. Das Produkt kann nach der säulenchromatographischen Aufarbeitung direkt in der Peptidsynthese verwendet werden.

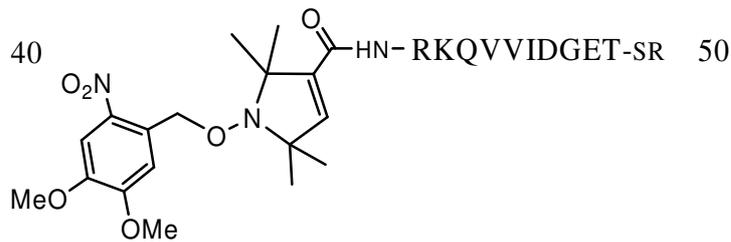
### 3.1.3 Zusammenfassung der Synthese des geschützten Spinlabels



**Abb. 13:** Durchgeführte Synthese für das photolabil geschützte N-Oxid oNV-DTOPC (7)

Das durch eine Nitroveratrylgruppe geschützte Spinlabel wird nach der gleichen Synthesestrategie, um eine Reaktion ergänzt, dargestellt. Die zusätzliche Reaktion ist eine Eintopfreaktion, bei welcher das N-Oxid im ersten Schritt zum Hydroxylamin reduziert wird, welches anschließend das benzylständige Bromid des Nitroveratrylbenzylbromides substituiert. Die Ausbeute von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-tert.-butylester (6) beträgt nach säulenchromatographischer Aufreinigung 70 %. Die nachfolgende Entschützung des tert.-Butylesters mittels Trifluoressigsäure läuft quantitativ ab, der Ausbeuteverlust ist durch die säulenchromatographische Aufarbeitung zu erklären. Die Carbonsäure oNV-DTOPC (7) wird daher in hoher Reinheit in einer Gesamtausbeute von 16 % über 5 Reaktionsschritte gewonnen und kann nach der chromatographischen Aufarbeitung direkt in der Peptidsynthese verwendet werden.

### 3.2.1 Synthese von markiertem Ras(40-50)-Thioester



M = 1694.3 g/mol

In den Abschnitten 3.1.2.6 und 3.1.3 konnte gezeigt werden, dass oNV-DTOPC in guter Ausbeute synthetisiert werden kann. Anhand des in guten Ausbeuten zugänglichen Ras(40-50)-Thioesters soll gezeigt werden, dass oNV-DTOPC nach HBTU Aktivierung in ein Peptid eingebaut werden, das Peptid vom Harz abgespalten und entschützt werden kann. Im nächsten Schritt sollen mit dem aufgereinigten Peptid geeignete Bedingungen für die Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe gefunden werden.

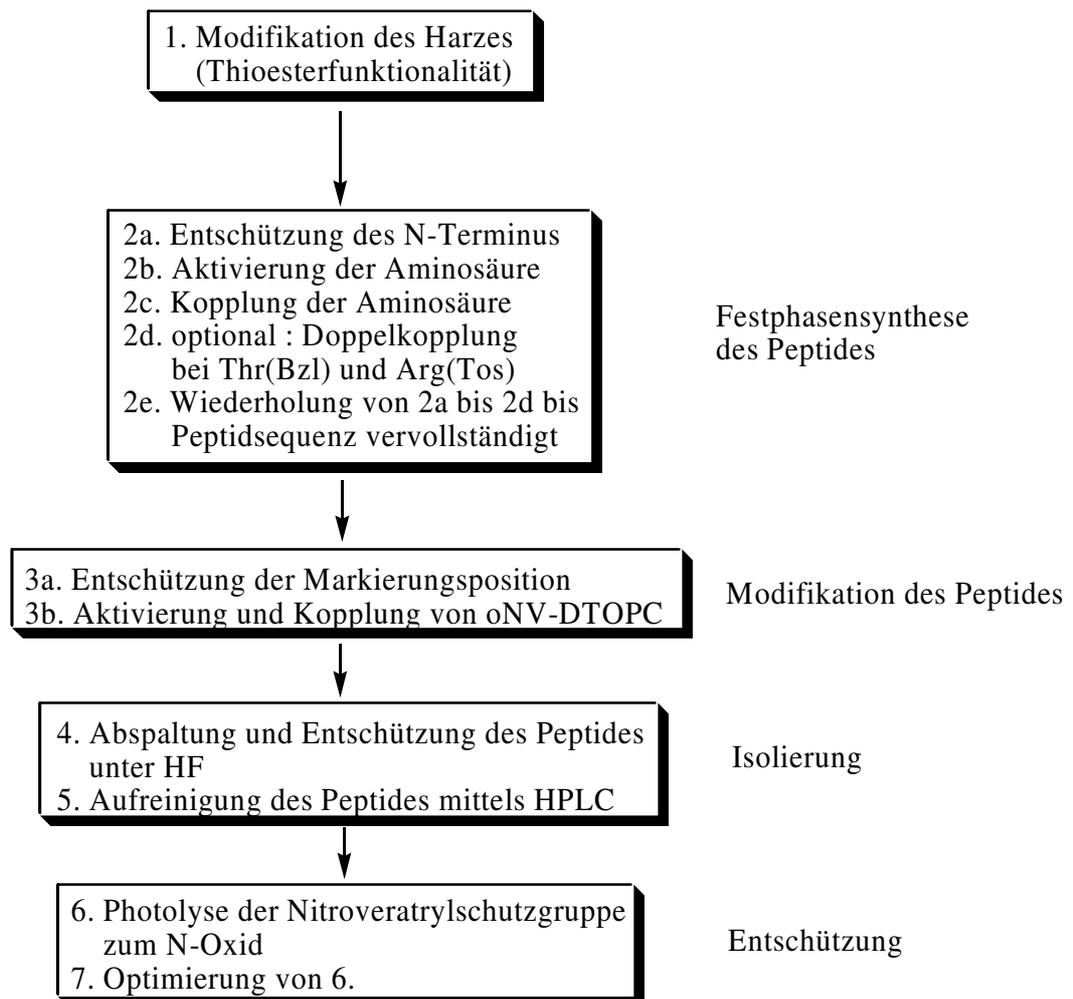
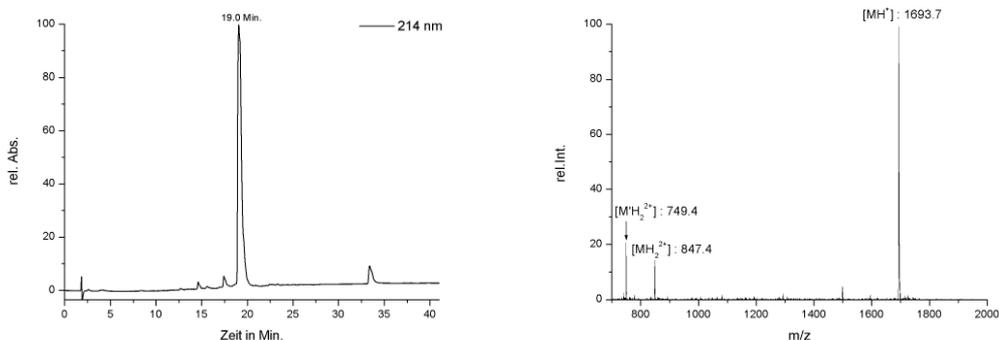


Abb. 14 : Experimentalplanung für markierten Ras(40-50)-Thioester

Die Synthese des markierten Ras(40-50) Thioesters erfolgt auf einem modifizierten Boc-Leu-PAM-Resin der Firma Novabiochem. Die Modifikation ist notwendig, um bei Abspaltung des Peptides einen C-terminalen Thioester zu gewinnen. Die Synthese wird im 0.2 mmol Maßstab durchgeführt. Zu Beginn der Synthese muss die Thiolfunktionalität durch Behandlung des Harzes mit  $\beta$ -Mercaptoethanol in Gegenwart von Piperidin freigesetzt werden, bevor die erste Aminosäure gekoppelt werden kann. In den folgenden Kopplungsschritten wird die Boc-Schutzgruppe jeweils durch zweimal 1 minütige Behandlung mit 100 % Trifluoressigsäure (TFA) entfernt. Das entstandene Trifluoressigsäuresalz am N-terminus wird durch N,N-Diisopropylamin (DIEA) in Gegenwart des Aktivierungsreagenzes HBTU *in situ* neutralisiert. Die Aktivierung der tBoc-geschützten Aminosäure erfolgt durch 0.98 Äquivalente HBTU in DMF. Hierbei entsteht der aktivierte 1-Hydrobenzotriazolester der Aminosäure, welcher abschließend mit der freien Aminogruppe auf dem Harz zur neuen Peptidbindung abreagiert. Die Reaktionszeiten liegen bei 12 Minuten. Die Kopplungen von Thr(Bzl) und Arg(Tos) werden doppelt durchgeführt. Durch Repetition dieses Zyklus für jede Aminosäure wird die Sequenz komplettiert. Nach Abschluss der Synthese wird die N-terminale Boc-Schutzgruppe abgespalten und der Spinlabel analog einer Aminosäure an den N-terminus der Peptidsequenz gekoppelt. Die Kopplung wird mittels Kaisertest überprüft. Ist der Kaisertest positiv für freie Aminogruppen (blaufärbung) wird die Kopplungszeit verlängert oder die Kopplung wiederholt. Die Abspaltung und Entschützung der Peptide werden in Gegenwart von *p*-Kresol als Scavenger für 1 Stunde bei 0°C in wasserfreiem HF durchgeführt (Miranda et al., 1997). Nach dem Entfernen der HF wird das Peptid in trockenem Diethylether suspendiert, gewaschen und anschließend in 50 % Acetonitril in Wasser mit 0.1 % TFA aufgenommen, vom Harz getrennt und abschließend lyophilisiert. Zur Aufreinigung wird das Rohpeptid in 6M GndHCl, 300 mM NaOAc bei pH 4 aufgenommen und über eine C4-RP-HPLC mit einem Gradienten von 5% bis 60 % Acetonitril (+ 0.08 % TFA) in Wasser (+ 0.1 % TFA) fraktioniert gesammelt. Die nach ESI-MS produkthaltigen Fraktionen werden vereint und lyophilisiert.



**Abb. 15:** HPLC Chromatogramm und MS von markiertem Ras40-50-SR nach Aufreinigung. Mit M' gekennzeichnete Massen werden dem entschützten Peptid zugeordnet.

Nach Auftreinigung ist im analytischen HPLC-Chromatogramm ein dominanter Peak, sowie drei kleine Peaks zu erkennen. Die Peaks werden gesamt und Massenspektren angefertigt. Der Peak bei 19 Minuten liefert im ESI-MS die Massen (847.4 und 1693.7 amu), diese entsprechen den erwarteten Massen des einfach und zweifach protonierten Ladungszustandes des markierten Ras(40-50)-SR von 1694 und 847 amu. Zusätzlich sind im MS auch zwei Massen zu erkennen (749.4 und 1500 amu), welche dem markierten Peptid ohne Schutzgruppe entsprechen. Dies kann entweder durch kurze Lichtexposition oder einen elektrochemischen Redoxvorgang während der Ionisation verursacht worden sein. Die drei weiteren Peaks machen zusammen <5 % der Gesamtintensität aus. Die ersten Peaks bei 14.0 und 17.5 Minuten werden durch nicht näher charakterisierte Nebenprodukte verursacht. Der Peak bei 34 Minuten wird durch ein Säulenartefakt verursacht. Die Ausbeute nach Aufreinigung beträgt 46 mg (13 % d.Th.).

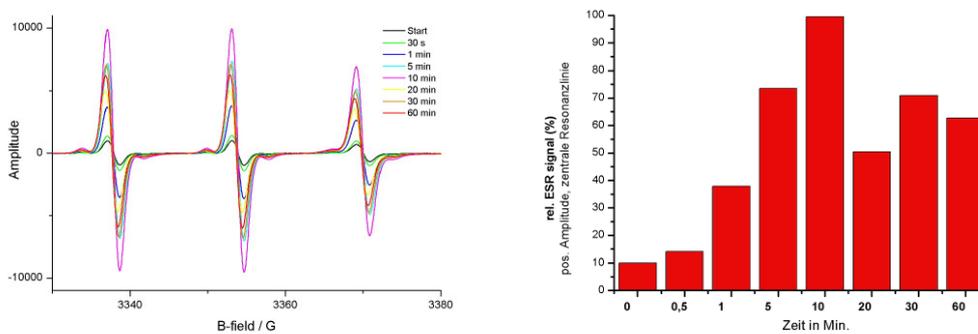
Die Kopplung von oNV-DTOPC (**7**) an den entschützten N-terminus von Ras(40-50)-SR erfolgt nach Kaisertest quantitativ. Dies wird durch die massenspektrometrische Analyse bestätigt. Die Masse von Ras(40-50)-SR ohne oNV-DTOPC Modifikation kann im abgespaltenen Rohprodukt nicht nachgewiesen werden.

### 3.2.2 Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe im Ras(40-50)-Thioester Testpeptid

Die ESR Spektroskopie setzt im zu untersuchenden System eine paramagnetische Spezies voraus. Wird oNV-DTOPC in ein Peptid eingebaut, so ist das N-Oxid als N-O-Benzylether maskiert und weist keine paramagnetischen Eigenschaften auf. Daher muss geprüft werden, wie die Nitroveratrylschutzgruppe gezielt zu entfernen ist und ob als Endprodukt das

paramagnetische N-Oxid geliefert wird. Prinzipiell wird die Nitroveratrylschutzgruppe durch Photolyse abgespalten. Hierzu wird UV-Licht der Wellenlängen 350 bis 365 nm verwendet. Die Lichtintensität des Rayonet UV-Reaktors beträgt mit 8 Leuchtmitteln des Typs RPR-3500 (je 20 Watt)  $1.65 \times 10^{16}$  Photonen pro Sekunde und  $\text{cm}^3$ .

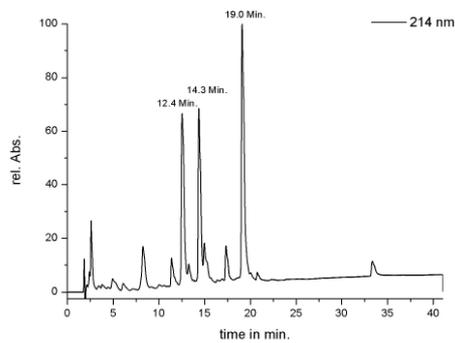
Das erste Experiment wird bei einer Konzentration von 1 mg/ml des markierten Peptides in 500 mM KMOPS bei pH 8.5 durchgeführt (Zehavi et al., 1972). Das Peptid wird für 60 Minuten bestrahlt und es werden jeweils zum Start, nach 30 Sekunden, 1, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten Proben entnommen und die ESR Signalstärke gemessen. Die Lagerung der Proben erfolgt bei  $-80^\circ\text{C}$ .



**Abb. 16:** A : zeitaufgelöste ESR-Spektren aus Reaktionsbedingung A  
 B : positive Amplitude der mittleren Resonanzlinie in Prozent

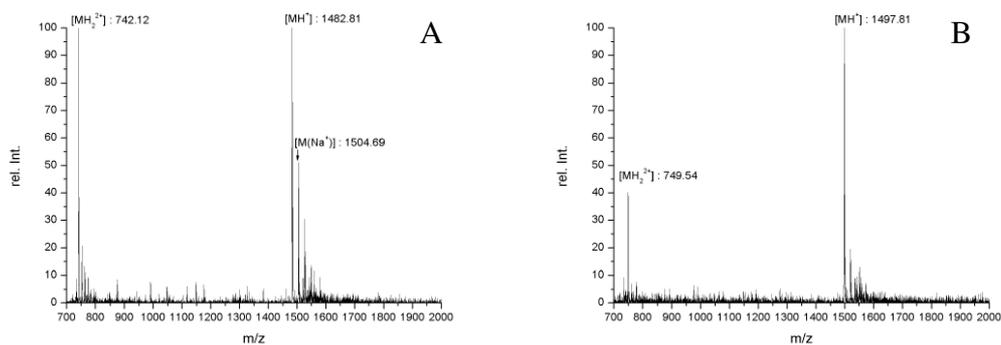
Anhand der gewonnen ESR Spektren und der Signalstärke kann man die notwendige Reaktionszeit abschätzen. In Abbildung 16 sind die ESR Spektren (Abb. 16A) und zur besseren Übersicht die positive Resonanzlinie normiert auf den Maximalwert (Abb. 16B) dargestellt. Zu erkennen ist eine geringe ESR Aktivität bei Start des Experiments, verursacht durch Umgebungslicht. Die Bestrahlung mit UV-Licht im Reaktor führt zu einem starken Anstieg des ESR Signals bis 10 Minuten. Nach 10 Minuten nimmt die Signalstärke des Signals wieder ab. Die Signalabnahme wird durch eine Folgereaktion hervorgerufen, wie im zweiten Experiment gezeigt wird. Durch die hohe Lichtintensität im UV-Reaktor können kurze Reaktionszeiten für die Entschützung zum paramagnetischen N-Oxid verwendet werden.

Eine weitere Probe des Peptides in einer Konzentration von 1 mg/ml wird in einem Puffer von 500 mM KMOPS bei pH 8.5 gelöst und für 5 Minuten mit UV-Licht bei 350 nm bestrahlt. Die Probe wird anschließend mittels analytischer HPLC untersucht und die gefundenen Fraktionen massenspektrometrisch (ESI-MS) untersucht.



**Abb. 17** : analytisches HPLC-Chromatogramm nach der Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe.

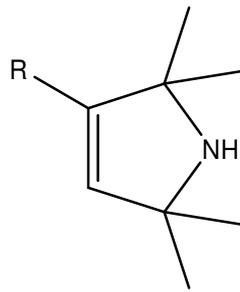
Im resultierenden HPLC-Chromatogramm nach 5 Minuten Reaktionszeit sind drei dominante Peaks bei 12.4, 14.2 und 19.0 Minuten zu erkennen. Zusätzlich sind neun kleine Signale zu erkennen. Diese stammen von Reaktionsprodukten oder Nebenprodukten, die nicht näher charakterisiert werden konnten. Das letzte Signal ist ein Säulenartefakt, welches bei der Verwendung dieser Säule stets auftritt. Das größte Signal bei 19.0 Minuten stammt vom eingesetzten Edukt. Die Peaks bei 12.4 und 14.2 Minuten stammen von zwei Reaktionsprodukten und sind in annähernd gleichen Verhältnis vorhanden. Die Peaks werden getrennt gesammelt und ein Massenspektrum angefertigt. Die resultierenden Massenspektren sind in **Abb. 18** abgebildet.



**Abb. 18** : Massenspektren (ESI-MS) der Fraktion bei 12.4 Min. (A) und der Fraktion bei 14.2 Min. (B)

Das Massenspektrum der Fraktion bei 12.4 Minuten zeigt u.A. folgende Massen 1504,69; 1482.81 und 741.12 amu. Diese können folgenden Ladungszuständen  $[M(\text{Na}^+)]$ ,  $[\text{MH}^+]$  und  $[\text{MH}_2^{2+}]$  zugeordnet werden und lassen sich entsprechend ihrer Massen dem Peptid mit

reduziertem Spinlabel ( $M = 1482 \text{ g/mol}$ ) zuordnen.



**Abb. 19** : Reduzierte Form des Spinlabels ( $R = \text{Peptid}$ )

Das in Abb. 18 B abgebildete Massenspektrum stammt aus der Fraktion bei 14.2 Minuten. Es sind die Massen 1497.81 und 749.54 amu zu erkennen. Hierbei handelt es sich um die zwei Ladungszustände  $[\text{MH}^+]$  und  $[\text{MH}_2^{(2+)}]$  des Peptides mit spinaktivem Label ( $M = 1498.3 \text{ g/mol}$ ).

Das Verhältnis der reduzierten zur oxidierten Form des Spinlabels ist unter den gewählten Abspaltbedingungen (500 mM KMOPS, pH 8.5) etwa 1:1. Die Abnahme der Spinaktivität, die im ersten Experiment beobachtet wird, deutet darauf hin, dass es sich bei der Reduktion und der Abnahme der Spinaktivität um eine Folgereaktion nach der Entschützung handelt. Als mögliche Reaktionspartner für das N-Oxid kommen die Abspaltprodukte der Schutzgruppe in Frage. Allgemein wird angenommen, dass sich ein Nitrosobenzaldehyd als Abspaltprodukt bildet (Zehavi et. al, 1972). Dieser hat zwei Gruppen, welche das N-Oxid im Spinlabel potentiell reduzieren kann (Nitrosogruppe, Aldehydfunktion). Die Ausbeute an spinaktivem Peptid müsste sich in diesem Fall durch den Zusatz von Reaktionspartnern, welche die Abspaltprodukte abfangen positiv beeinflussen lassen.

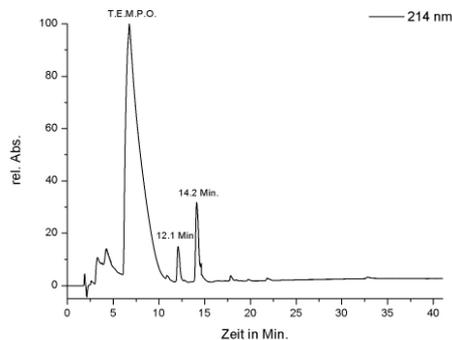
Handelt es sich bei der Folgereaktion um einen Redoxvorgang, führt der Zusatz eines Überschusses an weiterem N-Oxid dazu, dass dieses aus statistischen Gründen ebenfalls mit dem Abspaltprodukt reagieren muss. Hierzu werden der Reaktionslösung entweder TEMPO oder TEMPO-NH<sub>2</sub> zugesetzt. Um den Benzaldehyd abzufangen werden der Reaktionslösung entweder Hydroxylamin oder Methoxyamin zugesetzt. Als dritte Option werden die Lösungsbedingungen und der pH-Wert verändert.

Die Konzentration des Peptides beträgt 1 mg/ml, die Bestrahlungszeit beträgt jeweils 10 Minuten, die Proben wurden anschließend mittels analytischer HPLC und ESI-MS analysiert.

Die Reaktionsansätze stellen sich im Detail wie folgt dar :

- A) 500 mM KMOPS, pH 8.5
- B) 500 mM KMOPS, 100 Äq. TEMPO-NH<sub>2</sub>, pH 8.5
- C) 500 mM KMops, 10 Äq. TEMPO, 5 % MeCN, pH 8.5
- D) 500 mM KMops, 100 Äq. TEMPO, 5 % MeCN, pH 8.5
- E) 500 mM KMops, 1 Äq. Hydroxylamin, pH 8.5
- F) 500 mM KMops, 1 Äq. Methoxyamin, pH 8.5
- G) 500 mM KMops, 25 Äq. Methoxyamin, pH 8.5
- H) 6 M GdnHCl, 300 mM KPi, pH 7.5
- I) 50 % MeCN in Wasser, 0.1 % TFA (pH ~3)
- J) 50 % MeCN in Wasser

Exemplarisch sollen hier zwei Chromatogramme besprochen werden. Die weiteren Photolyseergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Ausbeuteangaben in Tabelle 1 wurden durch Integration der HPLC Chromatogramme gewonnen und sind eine relative Angabe, bezogen auf die Gesamtfläche der identifizierten produkthaltigen Peaks.

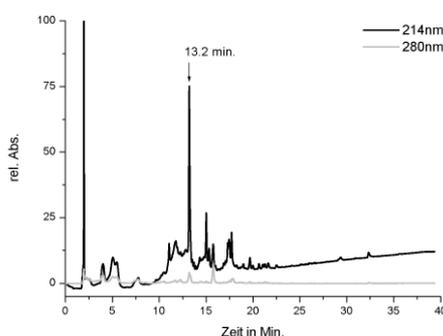


**Abb. 20:** HPLC-Chromatogramm der Photolyse unter Reaktionsbedingung D

Im Chromatogramm der Reaktion D sind 4 Signalgruppen zu erkennen. Die Signalgruppe zwischen 3 und 5 Minuten konnte nicht zugeordnet werden, da die erzielten Massenspektren nicht auswertbar waren. Der dominante Peak bei 7.5 Minuten wird durch das als

Abfangreagenz eingesetzte TEMPO hervorgerufen. Es folgen zwei Peaks bei 12.1 und 14.2 Minuten Retentionszeit. Diese entsprechen in Retentionszeit und auch in ihren Massenspektren dem Peptid mit dem reduzierten Spinlabel (12.1 Minuten) und der spinaktiven Form (14.2 Minuten) aus dem Vorexperiment. Der Zusatz von 100 Äquivalenten TEMPO erhöht die Ausbeute an N-Oxid im Peptid auf 68 %.

Der zweite dargestellte Fall ist die Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe unter den Reaktionsbedingungen J (50 % MeCN in Wasser).



**Abb. 21:** HPLC-Chromatogramm der Photolyse von markiertem Ras(40-50)-SR nach 10 Minuten Reaktionszeit unter Reaktionsbedingung J.

Unter diesen Reaktionsbedingungen treten viele nicht näher charakterisierbare Nebenprodukte in der Reaktionsmischung auf. Es findet sich neben dem Injektionspeak ein dominierender Peak bei 13.2 Minuten. Dieser Peak zeigt bei der massenspektrometrischen Analyse die Massensignale des Peptides mit oxidiertem Spinlabel. Die Verschiebung in der Retentionszeit wird durch die abweichenden Auftragsbedingungen (50 % MeCN) verursacht.

Reaktionsbedingungen	NO in %	NH in %	Bemerkungen
A	52	48	-
B	0	0	Abbauprodukte
C	64	36	-
D	68	32	-
E	49	51	-
F	60	40	-
G	52	48	Abbauprodukte
H	51	49	-
I	30	40	30 % NOH
J	~ 70-80	~ 10-20	~ 10-20 % Abbauprod.

**Tab. 1:** Ausbeuteübersicht von spinaktiver NO-Form vs. inaktiver NH-Funktion. Ausbeuten nach Integration der HPLC-Chromatogramme.

Anhand der tabellarischen Übersicht und der Auswertung der HPLC-Chromatogramme (Abb. 16, 19, 20) zeigt sich, dass nach der Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe zwei Hauptprodukte isoliert werden können. Das erste Produkt enthält die reduzierte Form des Spinlabels (vgl. Abb. 19), das zweite isolierbare Peptid enthält den aktiven Spinlabel. Zudem kann festgestellt werden, dass der Zusatz von TEMPO-NH<sub>2</sub> und Methoxyamin zu einer Vielzahl an Abbau- und Nebenprodukten führt, ohne dass dieser Zusatz zu einer Ausbeutesteigerung der spinaktiven Form führt. Durch den Zusatz von TEMPO als Quencher kann die Ausbeute an Peptid mit funktionalem Spinlabel gesteigert werden. Bei der Verwendung eines Überschusses von 10 Äquivalenten TEMPO kann die Ausbeute um etwa 10 % gegenüber der Photolyse ohne TEMPO Zusatz gesteigert werden. Werden 100 Äquivalente TEMPO verwendet, steigt die Ausbeute sogar beinahe um 20 % an. Die Vermutung, dass die Reduktion des Spinlabels zum Amin durch eine Redoxreaktion verursacht wird, wird durch dieses Ergebnis gestützt.

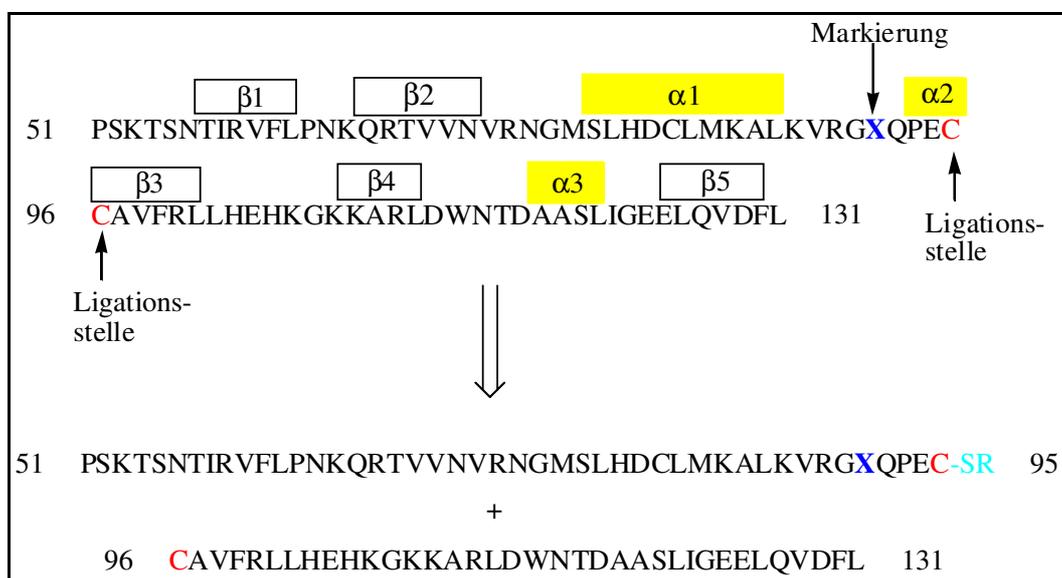
Die gefundenen Ergebnisse unter den Reaktionsbedingungen „I“ und „J“ überraschen. Wird die Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe unter sauren Bedingungen in Gegenwart von MeCN durchgeführt, so tritt neben den beiden bereits erwähnten Produkten parallel zum N-Oxid auch das Hydroxylamin (N-OH) mit einer Ausbeute von 30% als Produkt auf. Die Bildung des Hydroxylamins ist nach dem von Zehavi et al. (1972) postulierten Mechanismus möglich. Bereits McNulty (2002) erwähnt eine ausreichende Stabilität von Hydroxylaminen in der Tetramethylpyrrolstruktur unter sauren Bedingungen. Nach McNulty kann das Hydroxylamin durch oxidative und leicht basische Bedingungen in das N-Oxid überführt werden. Im Fall der Reaktionsbedingung „J“ fallen im Chromatogramm sofort die vielen Nebenprodukte auf, welche eine exakte Auswertung des Chromatogramms erschweren. Der entscheidende Vorteil dieser Photolysebedingung ist jedoch, dass die Ausbeute an N-Oxid mit bis zu 80 % im Vergleich mit den anderen Reaktionsbedingungen sehr hoch ist.

### 3.3 Auswahl der Markerposition in der RBD

Die gewählten Spinlabel sollen ortsspezifisch in die RBD eingebaut werden. Hierzu ist es notwendig die Peptide chemisch zu synthetisieren. Die Positionierung des Spinlabels erfolgte nach einer Analyse der Kristallstruktur und des Modells von (Nassar et al., 1995) und Vorarbeiten von Sydor et al. (1998; 1999) und Becker (2001). Ziel ist es hierbei die Integrität der RBD zu erhalten, um eine möglichst natürliche Wechselwirkung mit dem Bindungspartner Ras zu gewährleisten. Daher erfolgt die Positionierung im Loop zwischen den  $\alpha$ -Helices  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  an der Position 91 der RBD, da diese Position nahe dem Wechselwirkungsinterface beider Proteine ist und durch Sydor und Becker bereits gezeigt wurde, dass die Wechselwirkung beider Proteine mittels Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden kann. Mit Rückgriff auf die Kristallstruktur (Abb. 5, Einleitung) und der theoretischen Betrachtung der ESR-Spektroskopie in 3.3.1, können für die erwarteten ESR Spektren grobe Voraussagen getroffen werden. Da die Position 91 in einer Loopregion liegt, ist ein sehr mobiles Verhalten des Labels zu erwarten. Wird der Bindungspartner Ras in seiner aktiven Konformation hinzugegeben, wäre zu erwarten, dass die Mobilität des Loops und damit verbunden des Labels eingeschränkt wird. Es wäre also eine Verbreiterung der Linien und/oder das Entstehen einer immobilen Komponente im ESR Spektrum zu erwarten.

### 3.4 Chemische Synthesen der modifizierten Ras-Bindungsdomäne von C-Raf1

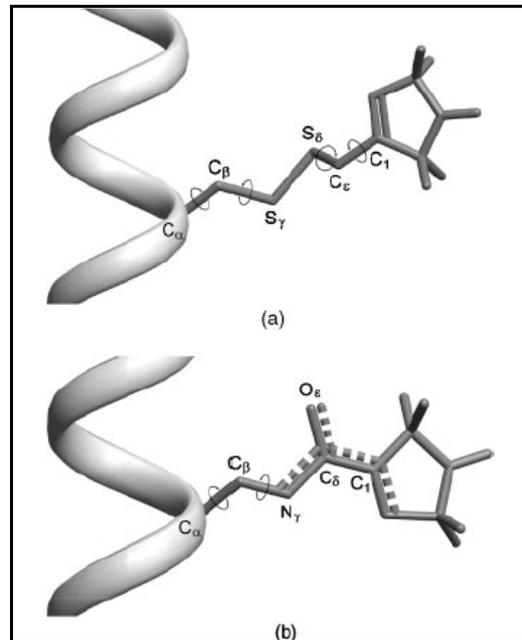
Die chemische Synthese der Peptide erfolgt an der festen Phase unter Verwendung der Boc-Schutzgruppenstrategie (Merrifield, 1963; Schnölzer et al., 1992). Im Anschluss erfolgt die Verknüpfung der Peptide durch native chemische Ligation (Dawson et al., 1994), hierzu werden ein C-terminales Fragment mit einem N-terminalen Cystein und ein N-terminales Fragment mit einem C-terminalen Thioester benötigt. Da die RBD drei natürliche Cysteine enthält, von denen sich zwei in der Mitte des Proteins (Pos. 95 und 96) befinden, kann das Cystein 96 als N-terminale Aminosäure verwendet werden und das Cystein 95 als Aminosäure am C-terminalen Thioester.



**Abb. 22:** Retrosyntheseschema der Peptidsynthese, inkl. Darstellung der Strukturmerkmale der RBD, Markierungsposition und Ligationsstelle

Aufgrund dieser strategischen Überlegungen müssen 3 Peptide synthetisiert werden. Zum einen das Peptid RBD(96-131), dieses Peptid enthält keine Modifikation und wird als Fragment bei allen drei Markierungsstrategien verwendet. Das Peptid RBD(51-95)-SR enthält in der Position 91 jeweils die gewählte Markierung. Die Markierung kann einerseits durch den Einbau einer künstlichen Aminosäure (s.u.) mit spinaktiver Seitenkette eingebracht werden. Die alternative Strategie sieht vor, zuerst eine orthogonal zu den Peptidsynthesebedingungen geschützte Aminosäure einzubringen. Die Wahl für diesen Platzhalter fällt auf die Diaminopropionsäure, geschützt mit der Allyloxycarbonylschutzgruppe (Aloc). Diese ermöglicht es die Spinmarkierung nahe am Peptidrückgrat zu etablieren, weiterhin wird die freie Drehbarkeit des Spinlabels durch die

Natur der Amidbindung eingeschränkt. Als Label wird zunächst DTOPC (**5**) verwendet, es zeigte sich jedoch, dass DTOPC (**5**) unter den Ligationsbedingungen nicht stabil ist, sondern zum Amin reduziert wird (Vergl. 4.2.2). Daher wurde später die geschützte Variante oNV-DTOPC (**7**) an dieser Stelle eingeführt und erst nach der Ligation durch Photolyse entschützt.



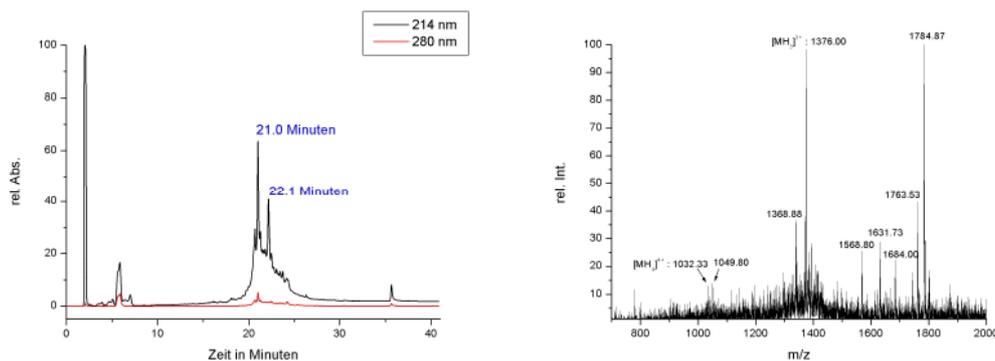
**Abb. 23:** energieminierte Konformationen des MTSSL (a) Spinlabels und des Dpr-SL-Amid-Spinlabels (b), Die Doppelbindungsnatur wird durch gestrichelte Linien dargestellt. (Becker et al., 2005)

### 3.4.1 Synthese von RBD(96-131)

96     $\text{H}_2\text{N-CAVFRLLEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFL-COOH}$     131  
        $M = 4125 \text{ g/mol}$

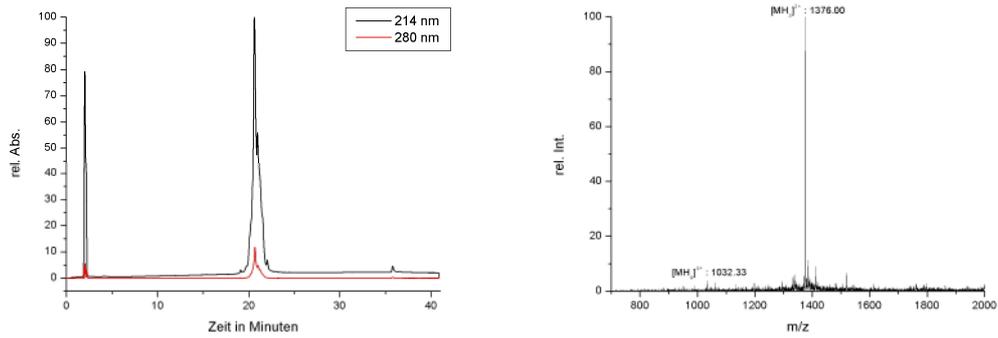
Die Synthese von RBD(96-131) erfolgte im 0.2 mmol Maßstab auf einem Boc-Leu-PAM-Resin der Firma Novabiochem. Es wurde ein modifiziertes Syntheseprotokoll nach Schnölzer (1992) verwendet. Die Boc-Schutzgruppen wurden jeweils durch zweimal 1 minütige Behandlung mit 100 % Trifluoressigsäure (TFA) entfernt. Das entstandene Trifluoressigsäuresalz am N-terminus wurde durch N,N-Diisopropylamin (DIEA) in Gegenwart des Aktivierungsreagenzes *in situ* neutralisiert. Die Aktivierung der geschützten Aminosäure erfolgte durch 0.98 Äquivalente HBTU in DMF. Hierbei entsteht der aktivierte 1-Hydrobenzotriazolester der Aminosäure, welcher abschließend mit der freien Aminogruppe auf dem Harz zur neuen Peptidbindung abreagiert. Die Reaktionszeiten liegen bei 12 bis 15

Minuten. Dies wird wiederholt bis die Sequenz des Peptides beendet ist. Die Kopplungen von Thr(Bzl), Arg(Tos) sowie Asn(Xan) wurden jeweils doppelt durchgeführt, da die Kopplungseffizienz dieser geschützten Aminosäuren oft niedrig ist. Nach Abschluss der Synthese wird die N-terminale Boc-Schutzgruppe abgespalten, das Harz mit Dichlormethan gewaschen und getrocknet. Die Abspaltung und Entschützung der Peptide wird in Gegenwart der Scavenger p-Kresol und Cystein für 1 Stunde bei 0°C in wasserfreiem HF durchgeführt (Miranda et al., 1997). Nach dem Entfernen der HF wird das Peptid in trockenem Diethylether suspendiert, gewaschen und anschließend in 50 % Acetonitril in Wasser mit 0.1 % TFA aufgenommen und abschließend lyophilisiert. Zur Aufreinigung wurde das Rohpeptid in 6 M GdnHCl, 300 mM NaOAc bei pH 4 aufgenommen und über eine C4-RP-HPLC Säule mit einem Gradienten von 5 % -60 % Acetonitril (+ 0.08 % TFA) in Wasser (+ 0.1 % TFA) getrennt und fraktioniert. Die nach ESI-MS produktthaltigen Fraktionen wurden vereint und lyophilisiert.



**Abb. 24:** HPLC-Chromatogramm und ESI-MS des Rohproduktes RBD(96-131) nach Abspaltung

Es werden ein analytisches HPLC-Chromatogramm und ein Massenspektrum des Rohproduktes angefertigt. Im HPLC Chromatogramm sind, neben einer Vielzahl an Nebenprodukten, zwei dominante Peaks bei 21.0 und 22.1 Minuten zu erkennen. Im Massenspektrum des Rohproduktes ist eine Vielzahl von Signalen zu erkennen. Das Signal bei 1376 amu kann dem Zielpeptid zugeordnet werden. Das Signal bei 1785 amu kann nicht zugeordnet werden und bleibt unidentifiziert. Durch fraktioniertes Sammeln werden die Peaks mittels HPLC getrennt und einzeln im Massenspektrometer vermessen. So kann der Peak bei 21.0 Minuten dem Zielpeptid RBD(96-131) (vgl. Abb.25) und der Peak bei 22.1 Minuten dem Nebenprodukt zugeordnet werden.



**Abb. 25 :** HPLC-Chromatogramm und ESI-MS des aufgereinigten Produktes

Das analytische HPLC-Chromatogramm (Abb. 25) nach der Aufreinigung des Rohproduktes zeigt nach wie vor ein verbreitetes Signal und eine Schulter im Elutionspeak. Im ESI-MS des aufgereinigten Peptides zeigen sich ebenfalls einige schwache Signale, die nicht zum Zielpeptid gehören. Die Aufreinigung von RBD(96-131) gelingt nicht quantitativ.

Die Gesamtausbeute an aufgereinigter RBD(96-131) beträgt 47 mg (17 % d.Th.) bei einer Reinheit von 77 % nach Integration des Chromatogramms.

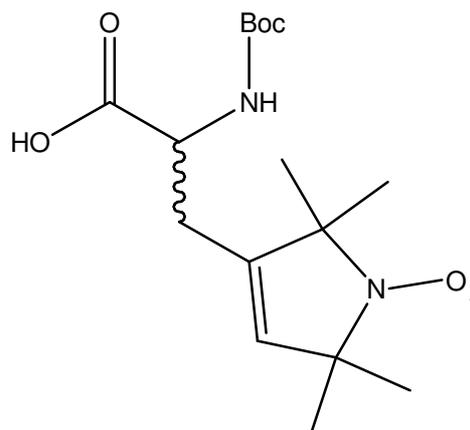
### 3.4.2 Synthese der modifizierten RBD(51-95)/L91Marker Thioester

Die Synthesen der modifizierten RBD(51-95)/L91Marker Thioester erfolgt auf einem thioestermodifizierten Boc-Leu-PAM-Resin der Firma Novabiochem. Die Synthese wird entweder im 0.2 mmol oder 0.4 mmol Maßstab durchgeführt. Zu Beginn der Synthese muss die Thiolfunktionalität durch Behandlung des Harzes mit  $\beta$ -Mercaptoethanol in Gegenwart von Piperidin freigesetzt werden, ehe die erste Aminosäure gekoppelt werden kann. Auch hier erfolgt die weitere Synthese nach einem modifizierten Protokoll von Schölzer (1992).

#### 3.4.2.1 Synthese durch direkten Einbau einer künstlichen spinmarkierten Aminosäure

51 NH<sub>2</sub>-PSKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVVRG(NOPA)QPEC-SR  
95

Die erste Markierungstrategie sieht vor, den Spinlabel an Position 91 der RBD durch eine Substitution des natürlichen Leucins durch die von Hideg und Kalai zur Verfügung gestellte künstliche Aminosäure 2-(tert.-Butoxycarbonylamino)-3-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)-propansäure (Boc-NOPA, siehe Abb. 26) zu erreichen. Der Vorteil dieser Strategie liegt im einfachen Einbau der Aminosäure während der Peptidsynthese und im sehr geringen Abstand des Spinlabels (N-Oxid) zum Peptidrückgrat, wodurch Veränderungen der Struktur gut detektiert werden können.



**Abb. 26:** künstliche spinaktive Aminosäure „Boc-NOPA“ (Enantiomergemisch) zur Verfügung gestellt von K.Hideg und T.Kalai

Der Einbau von Boc-NOPA erfolgt direkt unter den Bedingungen der Festphasensynthese unter Aktivierung mittels HBTU. Es kann mittels Ninhydrintest gezeigt werden, dass Boc-NOPA gekoppelt wird. Bei der Abspaltung des gesamten Peptides vom Harz wird festgestellt, dass sich eine Vielzahl an Produkten gebildet hat. Das gewünschte Produkt kann nicht nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden bei einer weiteren Synthese Kontrollabspaltungen vorgenommen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nach der Kopplung von NOPA die Anzahl der Nebenprodukte zunimmt und das Trennproblem mit jedem neuen Kopplungszyklus größer wird. Zusätzlich wird festgestellt, dass die Spinaktivität des Rohproduktes, wie auch des polymeren Trägermaterials, mit jeder zusätzlich gekoppelten Aminosäure abnimmt (Daten nicht abgebildet). McNulty berichtet von der gleichen Beobachtung und leitet einen durch Trifluoressigsäure hervorgerufenen Protonierungs- und Eliminationsmechanismus ab. Hierbei wird das N-Oxid zerstört und ein Amin gebildet. (McNulty et al., 2002). Dieser Mechanismus würde sowohl das starke Auftreten von Nebenprodukten, als auch die Abnahme bzw. das Verschwinden der Spinaktivität erklären. Da für dieses Problem keine Lösung gefunden werden konnte wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

#### 3.4.2.2 Synthese durch nachträglichen Einbau des Spinlabels

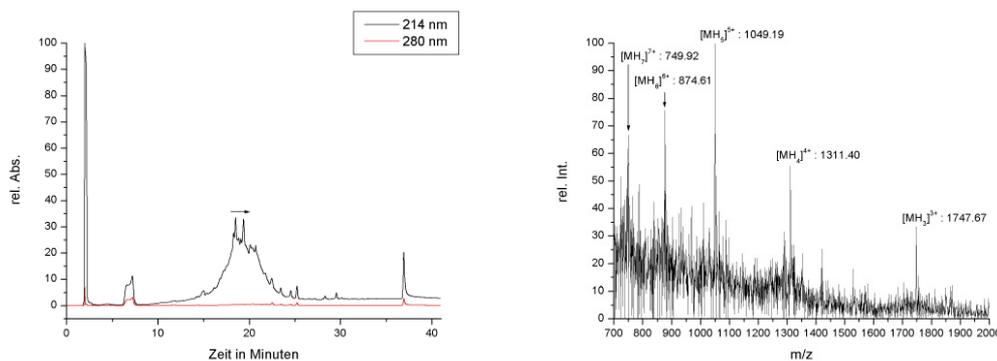
Aufgrund der in 3.4.2.1 geschilderten Problematik musste die Markierungsstrategie abgewandelt werden. Der direkte Einbau einer künstlichen spingelabelten Aminosäure (NOPA) war nicht möglich, da der Einsatz von Trifluoressigsäure zum Entschützen der temporären Schutzgruppe (Boc) am N-terminus gleichzeitig zur Zerstörung des N-Oxides im Label führte.



### 3.4.2.3 Synthese von RBD(51-95/91Dpr(Aloc))

51 NH<sub>2</sub>-PSKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVVRG(Dpr)QPEC-SR 95  
M = 5242 g/mol [mit Thioester]

Dieses Peptid wird als Zwischenprodukt benötigt, denn es dient als Ausgangsmaterial für die nachträgliche Markierung mittels DTOPC (5) und oNV-DTOPC (7). Während der Peptidsynthese dient die orthogonal mit der Allyloxycarbonyl (Aloc) Schutzgruppe geschützte Aminosäure Diaminopropionsäure (Dpr) als Platzhalter bzw. Vorläufer der Markierung. Die Aminosäure wird ebenso nach dem *in situ* HBTU Aktivierungs- und Neutralisationsprotokoll nach Schnölzer (1992) gekoppelt, wie auch die weiteren Aminosäuren. Ein Aliquot des Harzes wird zu Testzwecken mit Dichlormethan gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend in trockener HF mit p-Kresol vom Harz abgespalten und wie zuvor geschildert entschützt.



**Abb. 28:** HPLC-Chromatogramm des Rohproduktes von RBD(51-95/91Dpr)-SR, der Pfeil zeigt die im ESI-MS Massenspektrum dargestellten Bereich des HPLC-Chromatogramms. Die gefundenen Peaks können der Masse 5421.3 g/mol zugeordnet werden

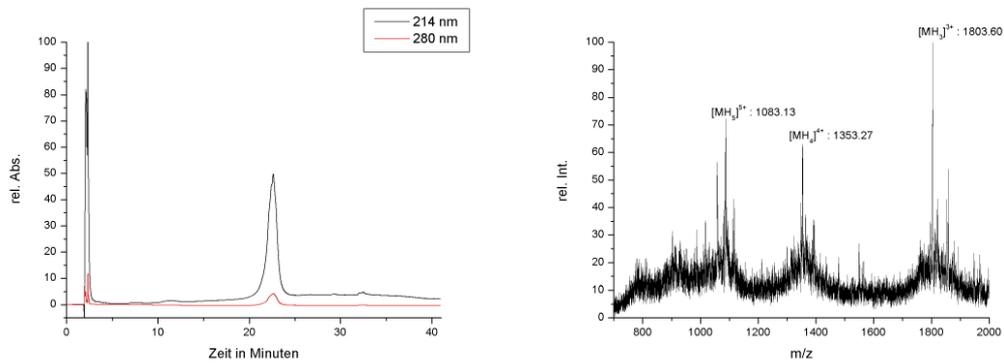
Das Chromatogramm des Rohpeptids RBD(51-95/91Dpr)-SR zeigt eine Vielzahl von Nebenprodukten, welche sich während der Synthese akkumulieren. Die Massen des Zilopeptides können im ESI-MS gefunden und mittels LC-MS isoliert werden. Die gefundenen Massen bei 749.9, 874.6, 1049.2, 1311.4 und 1747.7 amu können den Ladungszuständen des 3- bis 7-fach protonierten Peptids zugeordnet werden. Die Qualität dieses Peptides konnten nicht entscheidend verbessert werden. Die im Laufe der Arbeit an diesem Peptid routinemäßig durchgeführten Doppelkopplungen von Asn(Xan) und anschließende Waschschrte mit Dichlormethan verbesserten die Syntheseausbeuten

minimal. Das synthetisierte Peptid wird *nicht* präparativ abgespalten und aufgereinigt, sondern in den Folgeschritten 3.4.2.4 und 3.4.2.5 zur Markierung mit DTOPC (**5**) und oNV-DTOPC (**7**) verwendet.

#### 3.4.2.4 Synthese von RBD(51-95/91Dpr(SL))

51 NH<sub>2</sub>-PSKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVVRG[Dpr(SL)]QPEC  
-SR 95 M = 5408 g/mol [mit Thioester]

Das bereits vorgefertigte Harz aus 4.4.2.3 wird unter Argon mit 250 ml Dichlormethan gewaschen und anschließend dreimal für jeweils 10 Minuten in Dichlormethan gequollen. Anschließend wird das Harz mit wenig DCM bedeckt und für 2 Minuten mit 10 Äquivalenten Phenylsilan inkubiert, bevor 0.5 Äquivalente Pd(0)(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> in wenig DCM gelöst und zum Harz hinzugefügt werden. Die Reaktionszeit beträgt 20 Minuten, während derer regelmäßig vorsichtig gerührt wird und durch den Argonstrom abgeblasenes DCM ergänzt wird. Das Harz wird anschließend großzügig gewaschen, bis keinerlei Gelbfärbung mehr erkennbar ist. Diese Prozedur wird dreimal wiederholt, nach einem positiven Kaisertest (Sarin et al., 1981) wird das Harz ausgiebig mit DMF gewaschen und für 60 Minuten in DMF gequollen, wobei das Lösungsmittel alle 10 Minuten erneuert wird. Zum Markieren mit DTOPC (**5**) wird die Carbonsäure in 0.5 M HBTU in DMF (4.9 Äq. HBTU bzgl. **5**) aufgenommen und für 2 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von DIEA wird die Reaktionsmischung zum Harz gegeben. Nach 20 Minuten wird per Kaisertest geprüft, ob die Reaktion abgelaufen ist. Im Falle eines negativen Tests (Reaktion ist abgelaufen) wird das Harz zuerst mit 200 ml DMF und anschließend mit 250 ml DCM gewaschen. Das so vorgetrocknete Harz wird im Vakuum getrocknet. Anschließend werden 400 mg des Harzes (¼ der Gesamtmasse) in Gegenwart von p-Kresol in trockener HF bei 0°C abgespalten (Miranda et al., 1997). Die Aufreinigung des RBD-Peptides erfolgt auf einer präparativen C4-Säule, hierzu wird das Rohpeptid (ca. 200 mg) zuerst in 20 ml 6 M GdnHCl, 100 mM NaOAc, pH 4.7 aufgenommen und anschließend auf die Säule aufgetragen und fraktioniert gesammelt. Die nach ESI-MS produkthaltigen Fraktionen werden vereint und lyophilisiert.



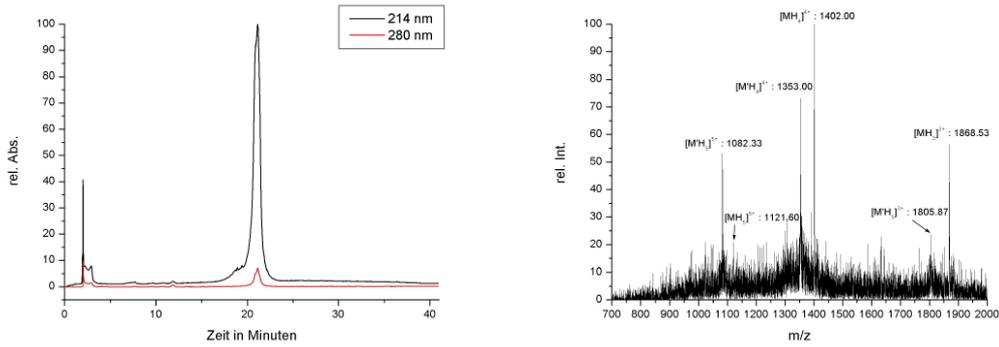
**Abb. 29:** HPLC Chromatogramm und ESI-MS von RBD(51-95/91Dpr(SL)) nach präparativer Aufreinigung. Die gefundenen Massenpeaks im ESI-MS können der Masse 5409.2 g/mol zugeordnet werden.

Das analytische HPLC Chromatogramm nach der Aufreinigung des Rohpeptides zeigt einen verbreiterten Peak bei ca. 22.5 Minuten. Das ESI-MS des aufgereinigten Peptides zeigt eine geringe Signalstärke und einige Nebenprodukte. Im ESI-MS können die Massen 1083.1, 1353.3 und 1803.6 amu die Massen von  $[MH_5]^{5+}$  bis  $[MH_3]^{3+}$  des Peptides ( $M = 5408$  g/mol) nachgewiesen werden. Eine quantitative Trennung des Zielpeptides von Nebenprodukten konnte nicht erreicht werden. Dies war durch die schlechte Qualität der Synthese vorherzusehen. Die Ausbeute an RBD(51-95/91Dpr(SL)) beträgt dennoch 38 mg (14 % d.Th.) mit einer für die Folgeschritte ausreichenden Qualität, da es sich zeigte, dass die Verunreinigungen nicht unter den Ligationsbedingungen reagieren.

#### 3.4.2.5 Synthese von RBD(51-95/91Dpr(cSL))

51 NH<sub>2</sub>-SKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVRG [Dpr(cSL)]QPEC-SR 95  
 $M = 5604$  g/mol [mit Thioester]

Die Behandlung des Harzes erfolgte wie in 4.4.2.3 geschildert. Nach der Entschützung der Seitenkette von Dpr(Aloc) wurde oNV-DTOPC (7) gekoppelt. Sobald oNV-DTOPC (7) gekoppelt wird, muss die Zufuhr von Licht zu den erhaltenen Produkten (Harz, Peptide) minimiert werden, da bei direkter Sonneneinstrahlung Abspaltprodukte auftreten können (Im Massenspektrum als M' dargestellt). Die Abspaltung des Peptides vom Harz, sowie die Aufreinigung mittels C4-RP-HPLC erfolgen wie in 3.4.2.4.



**Abb. 30:** HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von RBD(51-95/91Dpr(cSL)).

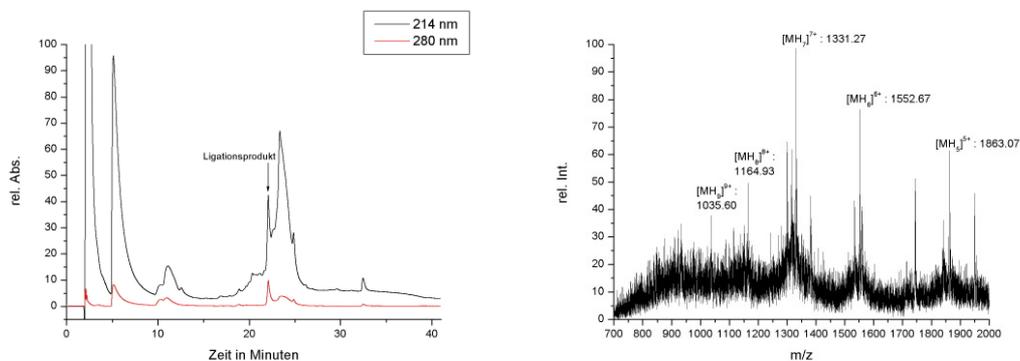
Die Massensignale können einerseits 5603.2 g/mol und andererseits 5409.8 g/mol zugeordnet werden.

Im analytischen HPLC-Chromatogramm findet sich ein dominantes Signal bei ca. 22 Minuten Retentionszeit. Der Peak ist an der Basis verbreitert und zeigt eine schwache Schulter. Zudem weist der Peak auch eine Absorption bei 280 nm auf. Das mittels oNV-DTOPC markierte Peptid kann nur mittels LC-MS im ESI-MS ionisiert werden. Das erzielte Massenspektrum zeigt die Massen 1868.5, 1402.0 und 1121.6 amu. Diese können den Ladungszuständen  $[MH_5]^{5+}$  bis  $[MH_3]^{3+}$  des mittels Nitroveratrylgruppe geschützten und markiertem Peptid zugeordnet werden. Die theoretische Masse des Peptides ist 5604 g/mol, die errechnete Masse aus den MS-Signalen beträgt 5603.2 g/mol. Im Massenspektrum ist eine zweite Serie an Massen zu erkennen. Die gefundenen Massen lauten 1805.9, 1353.0 und 1082.3 amu und ergeben rechnerisch eine Peptidmasse von 5409.8 g/mol. Dies entspricht der Masse des Peptides abzüglich der Veratrylschutzgruppe, also dem entschützten Peptid. Es handelt sich hierbei um Abspaltprodukte durch Lichteinstrahlung. Das HPLC-Chromatogramm zeigt eine gute Qualität des aufgereinigten Peptides, es kann durch die größere Hydrophobizität der markierten Aminosäure Dpr(cSL) besser von den aufgetretenen Nebenprodukten abgetrennt werden, eine quantitative Abtrennung ist, wie im ESI-MS und HPLC-Chromatogramm zu erkennen nicht gelungen. Die Ausbeute an RBD(51-95/91Dpr(cSL)) beträgt nach Abspaltung 62 mg (6 % d.Th.).

### 3.4.3 Chemische Ligation der RBD-Peptide

#### 3.4.3.1 Ligation von RBD(51-95/91Dpr(SL)) und RBD(96-131)

Die Ligation zwischen RBD(51-95/91Dpr(SL))-SR und RBD(96-131) wird im analytischen Maßstab unter Zusatz verschiedener Ligationsvermittler, teilweise in unterschiedlicher Konzentration durchgeführt. Jede Ligation wird mit 1 mg RBD(51-95/91Dpr(SL))-SR und 2 mg RBD(96-131) (Ausnahme siehe Tabelle 2) in einem Puffer von 6 M GdnHCl, 300 mM NaPi, pH 7.4 durchgeführt. Als Ligationsvermittler werden Mesna, Thiophenol und MPAA eingesetzt. Nach 24 Stunden wird die Ligation durch Zugabe von 2 Volumina Puffer verdünnt, der pH Wert mit Essigsäure auf 4 eingestellt und die Ligationmischung mittels LC-MS und C4-RP-HPLC untersucht. Eine Ergebnisübersicht ist in Tabelle 2 dargestellt, exemplarisch werden in **Abb. 31** das HPLC-Chromatogramm und das resultierende ESI-MS des gefundenen Ligationsproduktes unter Zusatz von Thiophenol als Ligationsvermittler dargestellt. Die theoretische Masse des Zielpolypeptids RBD(51-131/91Dpr(SL)) beträgt 9326 g/mol.



**Abb. 31** : HPLC-Chromatogramm und ESI-MS der Ligation von RBD(51-95/91Dpr(SL)) und RBD(96-131) ohne Quenchen. Das ESI-MS zeigt die gefundenen Massen des Ligationsergebnisses. Die gefundenen Signale lassen sich der Masse von 9311.0 g/mol zuordnen. Dies entspricht der Masse des Peptides mit reduziertem Spinlabel.

Im analytischen HPLC-Chromatogramm ist nach 24 Stunden ein neuer Peak zu erkennen (z.B. Markierung in Abb. 31), im Massenspektrum nach LC-MS sind die Massen des ligierten Peptides zu erkennen. Nach Errechnen der Masse des Peptides von 9311 g/mol ergibt sich eine Differenz von 15 g/mol. Dies entspricht der Reduktion des N-Oxides zum Amin.

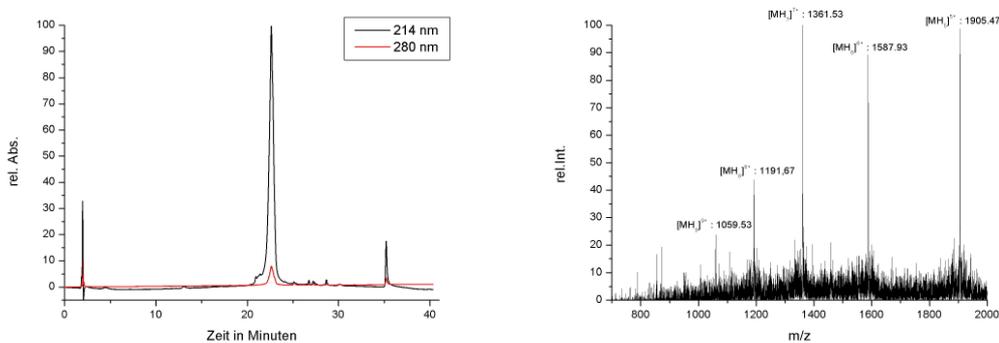
Ligationsbedingungen	Produkt
100 mM Mesna	Reduziert (9311.0 g/mol)
50 mM Mesna	Reduziert (9311.0 g/mol)
30 mM Mesna	Keine Ligation
2 % Thiophenol	Reduziert (9311.0 g/mol)
1 % Thiophenol	Reduziert (9311.0 g/mol)
0.5 % Thiophenol	Reduziert (9311.0 g/mol)
100 mM N-Boc-Cystein	Keine Ligation
100 mM N-Ac-Cystein	Keine Ligation
100 mM MPAA	Reduziert (9311.0 g/mol)
50 mM MPAA	Reduziert (9311.0 g/mol)
25 mM MPAA	Keine Ligation
20-facher Überschuss an RBD(96-131)	Keine Ligation
20-facher Überschuss an RBD(51-95/91Dpr(SL))	Keine Ligation

**Tab. 2** : Übersicht über die analytischen Ligationsansätze zwischen RBD(51-95/91Dpr(SL)) und RBD(96-131)

Es wurden 13 unterschiedliche Bedingungen für die Ligation im analytischen Maßstab getestet. In 4 Fällen (niedrige Konzentrationen von Mesna und MPAA, geschützte Cysteine) konnte keine Ligationsreaktion nachgewiesen werden. Das gleiche Ergebnis wurde bei der Verwendung eines großen Überschuss eines der zu ligierenden Peptide erzielt. In sieben Fällen konnte eine Ligation durch analytische HPLC und LC-ESI-MS Spektroskopie nachgewiesen werden (Abb. 31; Tab.2). Das Ligationsprodukt weist jedoch nicht die Masse des Zielpeptides von 9326 g/mol auf, sondern eine niedrigere Masse von 9311 g/mol (siehe Tab.2 und Abb. 31). Diese gefundene Masse lässt sich leicht durch eine Reduktion des N-Oxides zum Amin durch die Ligationsvermittler erklären (vgl. Abb. 18 und 19). Da es weder möglich war das Amin selektiv zum N-Oxid zu oxidieren, noch Reaktionsbedingungen zu finden unter denen es erhalten bleibt, wird der Spinlabel irreversibel zerstört. Das markierte Peptid ist daher für folgende ESR Messungen unbrauchbar. Dieser Ansatz wurde daher in der Folge nicht weiterverfolgt.

### 3.4.3.2 Ligation von RBD(51-95/91Dpr(cSL)) und RBD(96-131) zu RBD(51-131/91Dpr(cSL)) [M=9524 g/mol]

Die Ligation zwischen RBD(51-95/91Dpr(cagedSL))-SR und RBD(96-131) wird im analytischen, sowie im präparativen Maßstab unter Zusatz von 2 % Thiophenol durchgeführt. Das molare Verhältnis von RBD(51-95/91Dpr(cSL))-SR zu RBD(96-131) beträgt 1:2, die Konzentration von RBD(51-95/91Dpr(cSL))-SR beträgt 2 mM bei maximal 10 mg an eingesetztem Peptid. Es wurden maximal 10 mg Peptid verwendet, da die Ausbeute bei größeren Ansätzen stark abnahm. Die Ligation wird in einem Puffer von 6 M GdnHCl, 300 mM NaPi, pH 7.4 durchgeführt. Der Ligationsansatz wird nach 12 Stunden durch Zusatz einer Spatelspitze TCEP, 1.5 Volumenäquivalenten 2-Mercaptoethanol und 1 Volumenäquivalent des Ligationspuffers beendet. Anschließend wird der pH-Wert durch langsamen Zusatz von Essigsäure auf 4 bis 4.5 eingestellt. Die Aufreinigung des RBD-Ligationsproduktes erfolgt auf einer semipräparativen C4-Säule und Anwendung eines Gradientens von 20 % Acetonitril (+ 0.08 % TFA) nach 60 % Acetonitril (+ 0.08 % TFA) in Wasser (+ 0.1 % TFA) mithilfe eines Fraktionssammlers. Die nach ESI-MS (hier nur LC-MS möglich!) produkthaltigen Fraktionen werden vereint und lyophilisiert.



**Abb. 32:** HPLC-Chromatogramm und ESI-MS des Ligationsproduktes RBD(51-131/91Dpr(oNV-DTOPC)). Die Signale im ESI-MS lassen sich der Masse 9523.9 g/mol zuordnen.

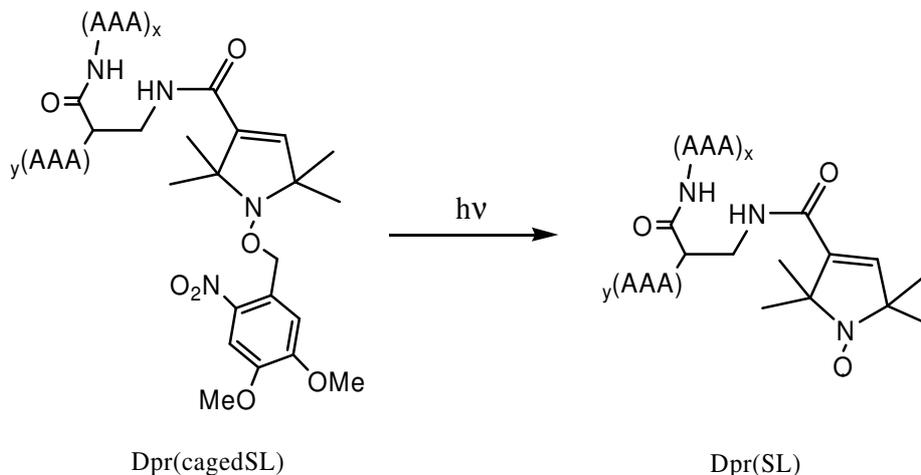
Die erfolgreiche Ligation unter Erhalt der eingeführten Markierung kann durch ESI-MS aus der Reaktionsmischung nachgewiesen werden. Das analytische HPLC-Chromatogramm zeigt einen dominanten Peak bei ca. 22 Minuten. Dieser ist nur wenig verbreitert. Das Signal bei 35 Minuten ist ein Säulenartefakt. Im LC-MS können folgende Massen nachgewiesen werden:

1905.5, 1587.9, 1361.5, 1191.7 und 1059.5 amu. Diese können den 5 bis 9-fach protonierten Peptid RBD(51-131/91Dpr(cSL)) zugeordnet werden. Die gefundenen Massen entsprechen gut der theoretisch erwarteten Masse von 9524 g/mol. Das markierte Peptid RBD(51-131/91Dpr(cSL)) kann in einer hohen Reinheit dargestellt werden.

Die Ausbeute an RBD(beträgt bei einem Gesamtansatz von 50 mg verteilt auf 5 Ligationsansätze 4 mg (5 % d.Th.). Die Ausbeute an RBD(51-131/91Dpr(cSL)) konnte durch Variation der gängigen Ligationsparameter nicht verbessert werden.

### 3.4.4 Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe in der RBD

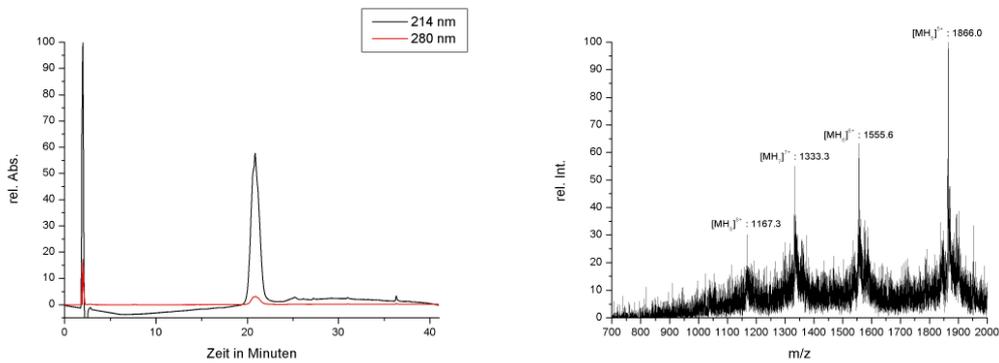
Die Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe von RBD(51-131/91Dpr(cSL)) erfolgt bei einer Konzentration von 1 mg/ml in 50 % Acetonitril in Wasser. Die Belichtungsdauer im UV-Reaktor von Rayonet liegt bei 90 Sekunden (Lichtintensität 350 – 365 nm; 8 x 20 W;  $1.65 \times 10^{16}$  Photonen pro Sekunde und  $\text{cm}^3$ ).



**Abb. 33** : Reaktionsschema für die Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe zum N-Oxid.

Dpr(cSL) wird zu Dpr(SL) entschützt und somit spinaktiv

Im Anschluss an die Belichtung wird der Reaktionsansatz auf 20 % Acetonitril verdünnt und in einem Konzentrator auf das Ausgangsvolumen ankonzentriert. Die erhaltene Lösung wird mit 1 % TFA versetzt und das entschützte Peptid mit einer semipräparativen C4-RP-Säule und Anwendung eines Gradientens von 20 % Acetonitril (+ 0.08 % TFA) nach 60 % Acetonitril (+ 0.08 % TFA) in Wasser (+ 0.1 % TFA) mithilfe eines Fraktionssammlers aufgereinigt. Die nach ESI-MS (hier nur LC-MS möglich) produkthaltigen Fraktionen werden vereint und lyophilisiert.

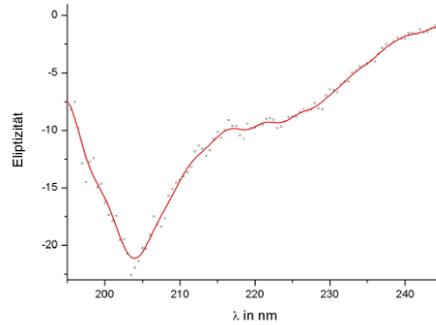


**Abb. 34:** HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von RBD(51-131/91Dpr(SL)) nach Photolyse aus RBD(51-131/91Dpr(cagedSL)). Die gefundenen Signale lassen sich der Masse von 9327.3 g/mol zuordnen.

Es kann ein Produkt isoliert und massenspektrometrisch charakterisiert werden. Das analytische HPLC-Chromatogramm zeigt einen verbreiterten Peak bei ca. 21 Minuten. Im LC-ESI-MS können die Massen 1866.0, 1555.6, 1333.3 und 1167.3 amu nachgewiesen und dem 5- bis 8-fach protonierten Zielpeptid RBD(51-131/91Dpr(SL)) ( $M = 9326.0$  g/mol) zugeordnet werden. Das isolierte Peptid besitzt die erwartete Masse, der Spinlabel wurde nicht reduziert. Die Photolyse von RBD(51-131/91Dpr(cSL)) konnte erfolgreich durchgeführt werden. Der Spinlabel mit dem als Nitroveratrylbenzylether geschütztem N-Oxid kann durch Bestrahlung mit UV-Licht entschützt werden. Die Ausbeute an RBD(51-131/91Dpr(SL)) beträgt bei einem Gesamtansatz von 4 mg verteilt auf 4 Abspaltungsreaktionen 2.2 mg (56 % d.Th.).

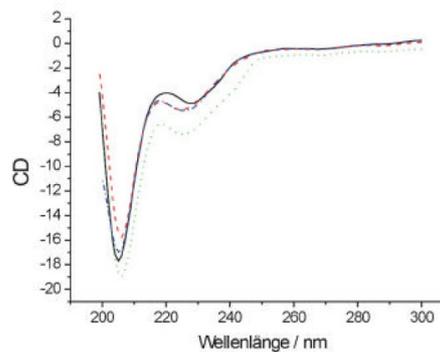
#### 3.4.5 Faltung der modifizierten RBD

1 mg RBD(51-131/91Dpr(SL)) werden in 1 ml Puffer bestehend aus 150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM Mesna bei pH 7.4 bei 4°C gelöst und für 24 Stunden sanft geschüttelt. Anschließend wird die Proteinlösung auf etwa 4 mg/ml ankonzentriert und als Stammlösung für weitere Experimente verwendet. Zur Kontrolle der Faltung wird ein CD-Spektrum angefertigt.



**Abb. 35:** CD-Spektrum der modifizierten RBD in 150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Mesna, pH 7.4, 10-fache Akkumulation

Der Circular dichroismus der modifizierten RBD zeigt eine Absorption bei ca. 225 nm, typisch für  $\pi\pi^*$ -Übergänge der Peptidbindungen und eine stärkere Absorption bei ca. 205 nm. Diese entsteht durch  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturelemente der RBD.



**Abb. 36 :** CD-Spektren verschiedener RBDs nach Becker (2001). Schwarz : RBD (chem.); Blau : RBD (rekomb.); Rot : RBD/L91Dpr(NBD); Grün : RBD/L91Dmca

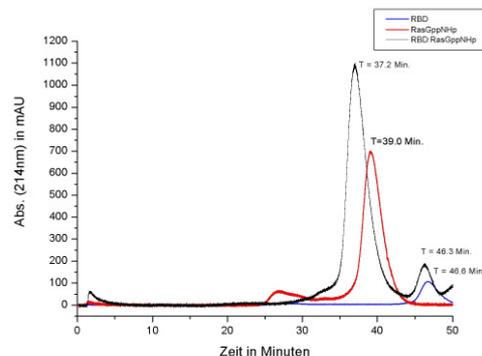
Dieses Spektrum stimmt qualitativ mit Daten für rekombinante und chemisch synthetisierte RBDs überein (Becker, 2001; Abb.36), auch hier ist eine starke Absorption bei ca. 205 nm und eine schwächere Absorption bei ca. 225 nm beobachtet worden. Es kann daher angenommen werden, dass die RBD gefaltet vorliegt.

### 3.5 Bindungsstudie mittels Gelfiltration

Die RBD ist als Domäne des Effektorproteins cRaf1 für die Bindung mit Ras in der aktivierten GTP gebundenen Form verantwortlich. Für folgenden ESR Experimente muss daher festgestellt werden, ob die Bindung zwischen RBD(51-131/91Dpr(SL)) und Ras·GTP stattfindet. Anstelle Ras·GTP wird für die folgenden Experimente Ras·GppNHp als nicht

hydrolysierbares GTP Analogon verwendet. Die Komplexbildung kann z.B. durch analytische Gelfiltration unter nativen Bedingungen untersucht werden. Als mobile Phase und als Puffer für die Proteine und die Komplexbildung wird ein Puffer aus 150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4 verwendet. Als stationäre Phase wird Sephadex S75 verwendet. Die UV-Absorption von 214 nm wurde gewählt, da die synthetische RBD einen geringen molaren Extinktionswert bei 280 nm besitzt und daher nicht detektierbar war.

Das Experiment besteht aus drei Einzelschritten, welche miteinander verglichen werden müssen. Der erste Teil des Experimentes dient der Bestimmung der Retentionszeit von Ras'GppNHp und RBD(51-131/91Dpr(SL)). Dazu werden beide Domänen einzeln in Puffer auf die Säule aufgetragen und ihre Elution detektiert. Diese ist abhängig von der Größe (genauer : hydrodynamischen Volumens) des Proteins, je größer das Protein ist, desto früher eluiert das Protein. Der dritte Teil des Experiments soll die Komplexbildung aus Ras'GppNHp und RBD(51-131/91Dpr(SL)) zeigen. Dazu werden beide Proteine in Lösung miteinander vereint, die RBD(51-131/91Dpr(SL)) wird dabei in einem molaren Überschuss von ca. 1.5 eingesetzt. Die Proteinmischung wird nach 30 Minuten Inkubation bei 0°C auf die Säule injiziert und die Retentionszeit bestimmt. Findet eine Komplexbildung zwischen den beiden Domänen statt, so verschiebt sich die Retentionszeit zu höheren Massen, also geringerer Retentionszeit.



**Abb. 37:** Vergleich der Chromatogramme von RBD (9.5 kDa), Ras'GppNHp (21 kDa), RBD:Ras'GppNHp Komplex (30 kDa)

Die Abbildung 37 zeigt in überlagerter Form die drei angefertigten Chromatogramme. Die einzeln aufgetragene RBD (blau dargestellt) eluiert bei 46.6 Minuten. Das einzeln aufgetragene Ras'GppNHp eluiert bei 39.0 Minuten. Diese beiden Retentionszeiten entsprechen der Erwartung, die RBD ist mit 9.5 kDa kleiner als Ras'GppNHp mit einer Masse von 21 kDa. Das dritte Chromatogramm wurde nach einer 30 minütigen Inkubation beider

Proteine bei 0°C miteinander erstellt. Das Chromatogramm zeigt einen Peak mit einer Retentionszeit von 37.2 Minuten und einen zweiten Peak mit einer Retentionszeit von 46.3 Minuten. Die Retentionszeit von 37.2 Minuten ist zu einer höherer Masse verschoben als das einzeln aufgetragene Ras-GppNHp. Die Retentionszeit spricht für eine Komplexbildung. Der zweite Peak bei 46.3 Minuten entspricht in der Erwartung der Retentionszeit für den Überschuss an RBD. Die geringe Abweichung in der Retentionszeit kann durch einen Wechsel des Laufpuffers verursacht worden sein. Zu Kontrollzwecken wurde das Experiment auch mit der RBD im Unterschuss durchgeführt. Das erzielte Chromatogramm ist jedoch nicht auswertbar, da die Trennleistung und Auflösung der Säule nicht ausreichend ist. Die Verringerung der Proteinkonzentrationen führt dazu, dass sich das Signal zu Rauschverhältnis durch den hohen Salzgehalt im Laufpuffer verschlechtert, auch diese Chromatogramme sind nicht auswertbar.

Es kann daher geschlossen werden, dass eine Komplexbildung stattgefunden hat. Zusätzlich ist dies ein weiteres Indiz für die native Faltung der RBD.

## 3.6 Synthese und Ligation der *NpHtrII*-Peptide

### 3.6.1 Auswahl der Markerposition in *NpHtrII*

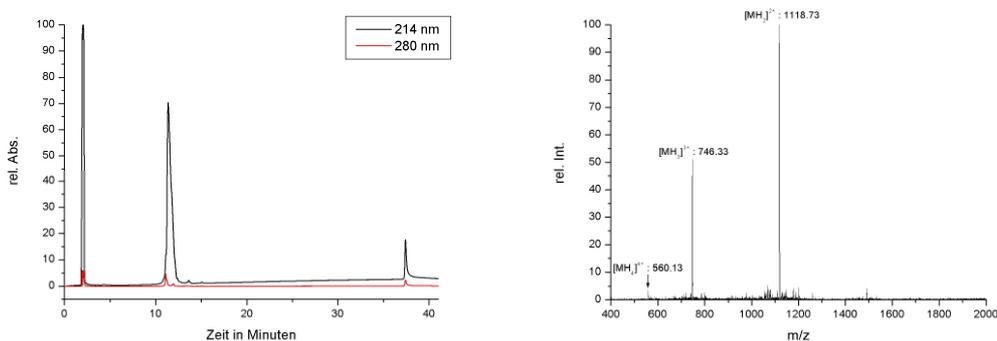
Für die folgenden Experimente wird ein verkürztes Konstrukt des *NpHtrII* verwendet. Die Verkürzung ist notwendig, da *NpHtrII* aufgrund seiner Länge chemisch nicht zugänglich ist. Hippler-Mreyen et al. konnten zeigen, dass ein auf 114 Aminosäuren gekürzter Transducer mit einer  $K_D$  von 230 nM an *NpSRII* gebunden wird. Diese Bindungskonstante liegt in der gleichen Größenordnung wie die Bindung des auf 157 Aminosäuren verkürzten Transducers an *NpSRII* ( $K_D = 163$  nM). Für beide Transducerkonstrukte konnten Hippler-Mreyen et al. die Bindung an *NpSRII* zusätzlich durch elektrophysiologische Untersuchungen belegen (Hippler-Mreyen et al., 2003). Die für die Markierung ausgewählte Position 100 im Transducer befindet sich gemäß der NMR Struktur der HAMP-Domäne (Hulko et al., 2006) am Ende der ersten amphiphatischen Sequenz (AS1). Hulko et al. vermuten eine Signalübertragung durch Rotation auf die 2. amphiphatische Sequenz (AS2). Die Annahme, dass für die Weiterleitung des Signals Konformationsänderungen eine Rolle spielen, wird auch durch bislang unveröffentlichte Daten von Klare (persönliches Gespräch) gestützt. Dieser beobachtet Veränderungen der ESR-Spektren bei MTSSL gelabelten Cysteinmutanten des *NpHtrII* an Position 100. Die exakte Wechselwirkung zwischen AS1 und AS2 ist jedoch bislang nicht bekannt. Ein Spinlabel in direkter Nähe des Proteinrückgrates (ggf. in Form eines Doppelmarkierungsexperimentes) könnte einen tieferen Einblick in diese Wechselwirkung gewähren. Zum Vergleich wird neben der chemisch generierten *NpHtrII*-Mutante zusätzlich eine mittels MTSSL gelabelte exprimierte *NpHtrII*-Cysteinmutante an Position 100 generiert.

### 3.6.2 Synthese von *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr)*

95 NH<sub>2</sub>-CKASR(Dpr)GDGDL DVELETRRE-OH 114

M = 2235.5 g/mol

Die Synthese von *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr)* erfolgt im 0.2 mmol Maßstab auf einem Boc-Glu(OcHx)-PAM-Resin von Novabiochem, nach einem modifizierten Protokoll von Schnölzer. Während der Synthese ist die Diaminopropionsäure mittels Aloc geschützt. Nach der Synthese wird das Harz im Verhältnis 1:2 geteilt und ein Drittel ohne Modifikation abgespalten und aufgereinigt. Die Abspaltung von *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr)* erfolgt durch HF in Gegenwart von p-Kresol bei 0°C. Das gewonnene Rohpeptid wird mittels präparativer HPLC unter Anwendung eines Gradientens von 5 % MeCN (+0.08% TFA) in Wasser (+0.1% TFA) nach 40 % MeCN (+0.08% TFA) in Wasser (+0.1% TFA) aufgereinigt.



**Abb. 38:** HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr)*

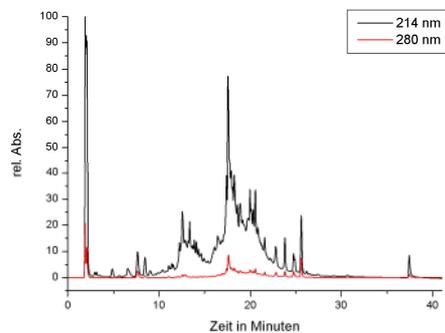
Die im ESI-MS gefundenen Massensignale 1118.7, 746.3 und 560.1 amu können dem 2- bis 4-fach protonierten *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr)* zugeordnet werden. Das HPLC-Chromatogramm und das ESI-MS zeigen eine sehr gute Qualität des isolierten Peptides *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr)*. Die Ausbeute beträgt 12 mg (12 % d.Th.).

### 3.6.2 Synthese von *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr(cSL))*

95 NH<sub>2</sub>-CKASR[Dpr(cSL)]GDGDLDVELETRRE-OH 114

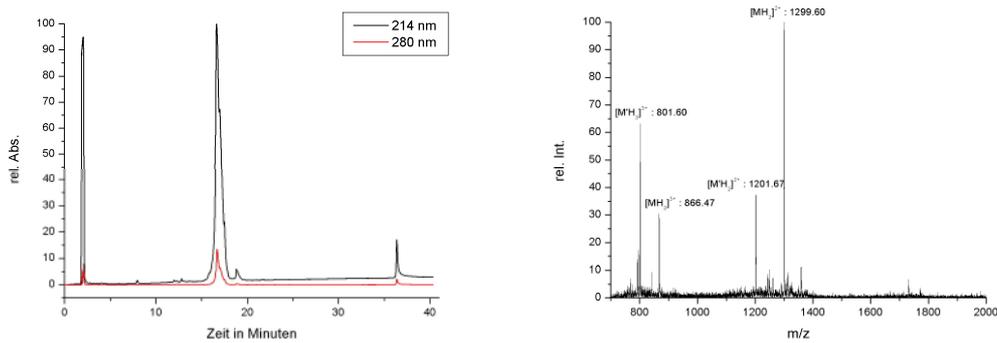
M = 2597.5 g/mol

Für die Synthese von *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr(cSL))* werden 2/3 des Harzes aus 4.6.1 verwendet. Die Abspaltung der Aloc-Gruppe, die Markierung der Diaminopropionsäure mit oNV-DTOPC (7) und die Abspaltung des Peptides durch HF werden wie bereits in 4.4.2.3 geschildert durchgeführt.



**Abb. 39:** HPLC-Chromatogramm des Rohpeptides von *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr(cSL))*

Nach der Abspaltung des markierten Peptides wird zu Kontrollzwecken ein analytisches HPLC-Chromatogramm des Rohproduktes angefertigt. Es zeigt eine Vielzahl von Nebenprodukten, jedoch nur einen Peak, welcher eine stärkere Absorption bei 280 nm (Absorption des aromatischen Teils der Nitroveratrylschutzgruppe) zeigt. Dieser Peak konnte durch ESI-MS als Produktpeak identifiziert werden. Bei den Nebenprodukten handelt es sich um Abbruchsequenzen und Peptide bei denen die Aloc-Schutzgruppe nicht quantitativ entfernt werden konnte. Das Rohprodukt wird in 6M GdnHCl, 300 mM NaOAc pH 4.0 aufgenommen und mittels präparativer HPLC (C4-Säulenmaterial) unter Anwendung eines Gradientens von 5 % Puffer B in Puffer A nach 60 % Puffer B in Puffer A aufgereinigt. Die produktthaltigen Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert.



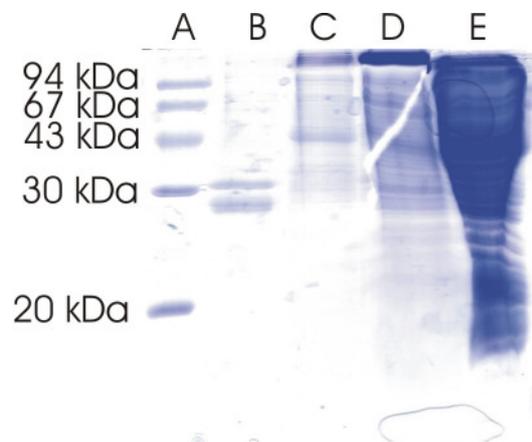
**Abb. 40:** HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr(cSL))* nach Aufreinigung des Peptides mittels präparativer HPLC

Im ESI-MS nach Aufreinigung sind 2 Massenserien zu finden. Die Erste Serie zeigt die Signale 1299.6 und 866.5 amu. Diese Massen können dem 2 und 3-fach protonierten *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr(cagedSL))* zugeordnet werden. Die zweite Serie mit den Massen 1201.7 und 801.6 amu gehört zum entschützten Peptid *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr(SL))* mit  $M = 2401.5$  g/mol. Die zweite Massenserie kann durch Licht während der Probenbereitung oder elektrochemische Prozesse während der Ionisation hervorgerufen worden sein. Das Peptid *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr(cSL))* kann erfolgreich dargestellt und isoliert werden. Die Ausbeute an *NpHtrII95-114(A95C/M110Dpr(7))* beträgt 43 mg (8 % d.Th.).

### 3.6.3 Expression und Aufreinigung von *NpHtrII(1-94)-MXE-His* ( $M = 32$ kDa)

Die Expression von *NpHtrII(1-94)-MXE-His* erfolgt in LB-Medium (40 g Trypton, 20 g Hefeextrakt, 40 g NaCl pro 4L, pH 7.2) mit 50 µg/ml Ampicilin. Die Expressionskultur wird mit einer Vorkultur so angeimpft, dass eine  $OD_{578}$  von 0.05 bis 0.1 entsteht und im Anschluss bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer  $OD_{578}$  von 1 wird durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Die Zellen werden nach 3 Stunden durch Zentrifugation bei 5000 x g geerntet und in ca. 1/100 des Kulturvolumens Zellwaschpuffer (150 mM NaCl, 25 mM  $Na_2HPO_4/KH_2PO_4$ , 2 mM  $Na_2EDTA$ , pH 8.0) resuspendiert. Direkt im Anschluss werden die Zellen mittels eines Microfluidizers mechanisch bei 800 bis 1000 bar aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (90 Min., 100.000 x g, 4°C) werden die Zellmembranen mit dem Zielkonstrukt sedimentiert. Das gewonnene Pellet wird in 3-4 ml Puffer  $A_{mem}$  (300 mM NaCl, 50 mM  $Na_2HPO_4/KH_2PO_4$ , 2 % DDM, pH 8.0) homogenisiert und über Nacht bei 4°C gerührt. Das Solubilisat wird zentrifugiert (90 Min., 100.000 x g, 4°C) und der Überstand

auf eine mit Puffer  $B_{\text{mem}}$  (300 mM NaCl, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05 % DDM, pH 8.0) equilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine werden im Anschluss durch Waschen mit 10 Säulenvolumina Puffer  $C_{\text{mem}}$  (300 mM NaCl, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30 mM Imidazol, 0.05 % DDM, pH 8.0) entfernt. Die Elution von *NpHtrII*(1-94)-MXE-His erfolgt anschließend durch Puffer  $D_{\text{mem}}$  (300 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05 % DDM, pH 8.0). Die erhaltene Eluat wird auf etwa das halbe Volumen ankonzentriert (Centricons MWCO 10 kDa) und über Nacht gegen Puffer G (500 mM NaCl, 10mM TrisHCl, pH 8.0) dialysiert. Das erhaltene Produkt wird mittels Gelelektrophorese untersucht und die Ausbeute durch UV-Spektroskopie bei 280 nm bestimmt.



**Abb. 41:** analytisches SDS-Gel der Darstellung von *NpHtrII*(1-94)-MXE-His. Aufgetragen sind Proteinmarker (A), Ni-NTA-Eluat (B), Elutionsprofil des Waschschrittes (C), der Durchlauf der Säule (D) und das Zelllysate (E)

In Abb.41 ist das analytische SDS-Gel der Expression und Aufreinigung von *NpHtrII*(1-94)-MXE-His dargestellt. Neben dem Proteinmarker in Bahn A (die Bande für 14.4 kDa ist aus dem Gel herausgewandert), ist in Bahn B das Eluat der Ni-NTA-Säule aufgetragen worden. Es sind 2 Banden zu sehen, zum einen eine Bande knapp oberhalb der 30 kDa Markerbande, bei ca. 32.5 kDa. Die Bande bei 32.5 kDa entspricht in der Masse dem Zielkonstrukt *NpHtrII*(1-94)-MXE-His. Die bei ca. 27 kDa laufende Bande konnte weder präparativ entfernt, noch massenspektrometrisch analysiert werden. In Bahn C ist das Säuleneluat des Waschschrittes mit Puffer  $C_{\text{mem}}$  zu sehen, in Bahn D ist der Säulendurchfluss aufgetragen. In Bahn E ist das Zelllysate nach Zellaufschluss zu sehen.

Durch UV Absorption wurde die Ausbeute an *NpHtrII*(1-94)-MXE-His auf 32 mg bestimmt.

### 3.6.4 Ligation der *NpHtrII*-Peptide

#### 3.6.4.1 Ligation von *NpHtrII*95-114(A95C/M110Dpr) Mesna Thioester mit *NpHtrII*95-114(A95C/M110Dpr)

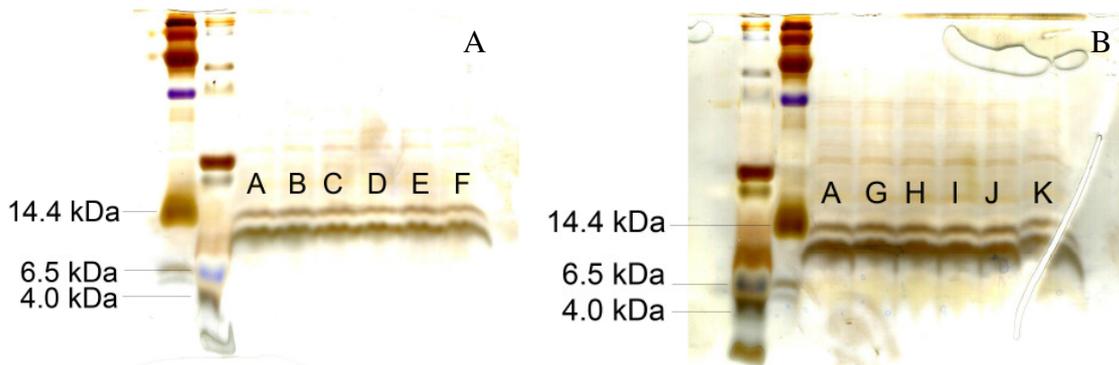
Zur Darstellung von *NpHtrII*1-114(A95C/M110Dpr) werden zwei Peptide benötigt, welche durch eine Ligrationsreaktion miteinander verknüpft werden. Die Synthese und Aufreinigung von *NpHtrII*95-114(A95C/M110Dpr) wurden in 3.6.2 beschrieben. Der *NpHtrII*1-94-Mesna Thioester wurde von Svetlana Martell zur Verfügung gestellt und musste nicht dargestellt werden. Die Peptide wurden unter denaturierenden Bedingungen (6 M GdnHCl, 500 mM NaPi, pH 7.5) miteinander zur Reaktion gebracht. Als Ligrationsvermittler wurde entweder ein 1000-facher Überschuss an Mesna oder ein 2 %iger Gehalt von Thiophenol bzgl. des Gesamtvolumens der Reaktion eingesetzt. Die Ligation wird bei 2 Temperaturen, in unterschiedlicher Stöchiometrie (Thioester jeweils im Unterschuss) und bei 3 Konzentrationen (0, 30 und 50 %) an Trifluorethanol (TFE) durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Ligation beträgt 50  $\mu$ l.

Gelbez.	Stöchiometrisches Verhältnis (N-term. : C-term. Thioester)	Ligrationsvermittler	Gehalt TFE	Temp. in °C	Ausbeute
B	1 : 2.0	Mesna	0 %	RT	0 %
C	1 : 2.0	Thiophenol	0 %	RT	0 %
D	1 : 2.0	Mesna	30 %	RT	0 %
E	1 : 2.0	Thiophenol	30 %	RT	0 %
F	1 : 2.0	Thiophenol	50 %	RT	0 %
G	1 : 2.0	Mesna	0 %	40	0 %
H	1 : 2.0	Thiophenol	0 %	40	0 %
I	1 : 2.0	Mesna	30 %	40	0 %
J	1 : 2.0	Thiophenol	30 %	40	0 %
K	1 : 2.0	Thiophenol	50 %	40	0 %

**Tab. 3:** Reaktionsführung der Ligationen *NpHtrII*1-94-Mesna / *NpHtrII*95-114(A95C/M110Dpr)

Die Analytik der Ligationen erfolgt mittels SDS-Gelelektrophorese nach Schagger und von Jagow. Zur Entfernung des GdnHCl wurden die Proben zuerst durch in einem Konzentrador in einen Harnstoffpuffer (4 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8) überführt und dann mit

Probenpuffer versetzt auf das Gel aufgetragen. Um die Gele besser auswerten zu können, wurden zwei Marker verwendet. Der Low Molecular Weight Marker liefert eine Bande bei 14.4 kDa, die oberhalb der erwarteten Massen von 9.5 kDa (Thioester) und 11.5 kDa (Ligationsprodukt) liegt. Der See Blue Prestained Marker® liefert zwei Banden bei 4.0 und 6.5 kDa, diese liegen unterhalb der erwarteten Massen. Da in diesem Marker die nächste Masse erst bei 25 kDa liegt, ist die Verwendung von zwei Marken notwendig.



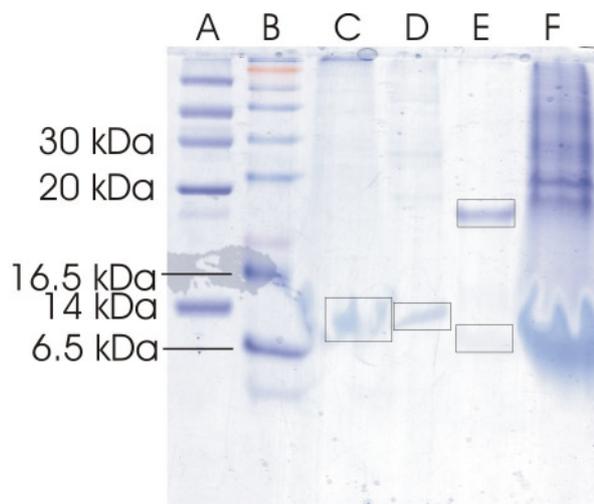
**Abb. 42:** Mit Silber eingefärbte SDS-Gele der Ligationen mit A: Startmaterial *NpHtrII*(1-94)-Mesna Thioester, weitere Probenbezeichnung siehe Tabelle 3, es wurde der Low Molecular Weight Marker und der See Blue Prestained Marker® von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

Die beiden SDS Gele werden durch den Vergleich der Reaktionsmischungen nach der Ligation (Bahnen B bis K) gegen die Reaktionsmischung vor der Reaktion ohne Zusatz von Ligationsvermittler ausgewertet. Der eingesetzte Thioester besitzt eine Masse von ca. 9.5 kDa und ist in allen Proben zu erkennen. Das zu ligierende Peptid ist zu klein und kann nicht nachgewiesen werden. Die Thioesterpreparation ist bereits mit einer Bande bei ca. 11.5 kDa kontaminiert. Wird unter den Ligationsbedingungen ein Produkt gebildet, so muss die Intensität der Bande bei 9.5 kDa abnehmen und die Intensität der Bande bei 11.5 kDa zunehmen. Dies ist in keinem Fall zu erkennen. Leider sorgt die Kontamination bei 11.5 kDa in diesem Fall dafür, dass ein möglicherweise vorhandener geringer Umsatz nicht erkannt werden kann.

#### 3.6.4.2 Expressed Protein Ligation mit *NpHtrII*(1-94)-MXE-His (M=11.5 kDa)

Die Ligation zwischen *NpHtrII*(1-94)-MXE-His und *NpHtrII*95-114(A95C/M110Dpr(cSL)) wird mit 40 mg (0,00125 mmol) *NpHtrII*(1-94)-MXE-His gelöst in 500 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, pH 8.0 bei einem DDM-Gehalt von <0.01 % durchgeführt. Es werden 6.5 mg

(0.0025 mmol/ 2 Äquivalente) *NpHtrII*95-114(A95C/M110Dpr(cSL)) gelöst in 1 ml Puffer hinzugefügt. Es werden 47 mg polare Lipide aus *H. salinarium* zugesetzt und der Puffer auf einen DDM Gehalt von weniger als 0.05% verdünnt. Die Ligation wird durch die Zugabe von Mesna gestartet. Die Endkonzentration von Mesna beträgt 700 mM. Die Reaktion wird über Nacht bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss gegen einen Puffer von 500 mM NaCl, 300 mM Mesna, 10 mM TrisHCl, pH 8.0 unter Zusatz von Biobeads dialysiert. Am nächsten Morgen wird der Puffer gegen einen identischen Puffer ohne Mesna ausgetauscht. Dies wird solange wiederholt bis der Reaktionsansatz eingetrübt ist und keine Schaumbildung im Dialyseschlauch erkannt werden kann. Das Ligationsprodukt wird isoliert, indem der Ansatz für 60 Minuten in einem Ti70 Rotor bei 28000 rpm bei 4°C zentrifugiert wird und das Pellet über Nacht in 2 ml Puffer  $A_{mem}$  (300 mM NaCl, 50 mM  $Na_2HPO_4/KH_2PO_4$ , 2 % DDM, pH 8.0) resolubilisiert wird. Die resultierende trübe Lösung wird in der Tischzentrifuge bei 15000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Ligationsprodukt befindet sich im Überstand, dieser wird mittels SDS Gelelektrophore und UV-Spektroskopie (365 nm) analysiert.



**Abb. 43:** Ligation zu *NpHtrII*(1-114/M100Dpr(cagedSL)), aufgetragen sind Proteinmarker (A/B), Überstand Solubilisation (C), *NpHtrII*(1-114)-Mesna Thioester (D), hydrolysiertes Startmaterial (E) und Pellet der Ligationsmischung (F).

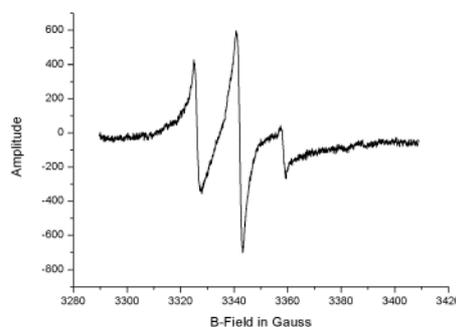
In Abb. 43 ist das resultierende SDS Gel abgebildet. In Bahn A und B sind zwei unterschiedliche Proteinmarker abgebildet. In Bahn C ist das Solubilisat der Ligation aufgetragen, es ist eine Bande bei ca. 11.5 kDa zu erkennen. Diese Bande korrespondiert mit der erwarteten Masse des Ligationsproduktes. In Bahn D wurde zu Vergleichszwecken ein exprimierter *NpHtrII*(1-114)-Mesna Thioester mit ebenfalls einer Masse von 11.5 kDa aufgetragen, die gefundene Bande im Gel entspricht in ihrer Laufhöhe dem Ligationsprodukt.

In Bahn E wurde hydrolysiertes Htr(1-94)-MXE-His Konstrukt aufgetragen, es sind zwei Banden zu erkennen. Eine bei 22 kDa und eine schwach anfärbende bei 9.5 kDa. Die Bande bei 22 kDa stammt vom Inteinkonstrukt, die Bande bei 9.5 kDa dem hydrolysierten Thioester. Anhand dieses Vergleiches kann geschlossen werden, dass die Ligation zu *NpHtrIII-114(A95C/M110Dpr(cSL))* geglückt ist. Die solubilisierte Fraktion weist zusätzlich eine Absorption bei 365 nm auf. Dies ist nur dann möglich, wenn im Peptid die Nitroveratrylschutzgruppe vorhanden ist. Der *NpHtrII(1-114)-Mesna* Thioester weist in diesem Wellenlängenbereich keinerlei Absorption auf.

Die Ausbeute an Ligationsprodukt beträgt 1 mg an gelabeltem Protein (7 % d.Th.).

#### 3.4.7 Photolyse von *NpHtrII(1-114/M100Dpr(cSL))*

Zur Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe in *NpHtrII(1-114/M100Dpr(cSL))* wird das Protein in einer Konzentration von 0.5 mg/ml in einem Puffer mit 125 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, pH 8.0 für 120 Sekunden in einem Rayonet UV-Reaktor mit UV-Licht bei 350 nm bestrahlt (Leuchtmittel RPR3500, mit 8 x 20 W;  $1.65 \times 10^{16}$  Photonen pro Sekunde und  $\text{cm}^3$ ). Die Abspaltprodukte der Schutzgruppe werden mittels Dialyse über Nacht gegen einen Puffer von 500 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 0.1 % DDM, pH 8.0 + 10 % DMSO; gefolgt von einer Dialyse gegen einen Puffer von 500 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 0.1 % DDM, pH 8.0 entfernt. Die Probe wird anschließend wieder ankonzentriert. Über UV Spektroskopie wird die Konzentration von *NpHtrII(1-114/M100Dpr(cSL))* bestimmt. Sie beträgt 0.82 mg/ml (71  $\mu\text{M}$ ), im Anschluss wird mittels ESR-Spektroskopie die Spinzahl der Probe bestimmt.



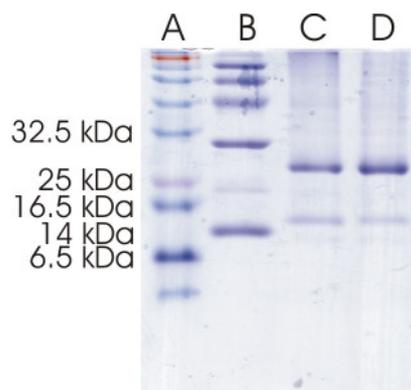
**Abb. 44:** ESR-Spektrum von *NpHtrII(1-114/M100C(cSL))* nach Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe.

Die Spinzahl der Probe wird durch Integration des ESR Spektrums nach vorheriger

Kalibrierung gegen eine 100  $\mu\text{M}$  Lösung von TEMPO bestimmt. Sie beträgt 1329 Spins, dies entspricht einer Konzentration von 56  $\mu\text{M}$  spinaktiver Spezies in der Probe. Diese Konzentration ist identisch mit der Konzentration spingelabelter *NpHtrII*-Proteine, die Ausbeute der Photolyse beträgt daher 79 % und bewegt sich in der gleichen Dimension, wie die Photolyse in der RBD.

#### *3.4.7 Expression und Aufreinigung von NpHtrII(1-114/M100C)-His (12.3 kDa)*

Die Expression von *NpHtrII*(1-114/M100C)-His erfolgt in LB-Medium mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin. Die Expressionskultur wird mit einer Vorkultur auf eine  $\text{OD}_{578}$  von 0.05 bis 0.1 angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Induktion der Expression mit IPTG erfolgt bei Erreichen einer  $\text{OD}_{578}$  von 1, die Endkonzentration von IPTG beträgt 1 mM. Die Zellen werden nach 3 Stunden durch Zentrifugation bei 5000 x g geerntet und in etwa 1/100 des Kulturvolumens in Zellwaschpuffer (150 mM NaCl, 25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 8.0) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgt mechanisch mittels eines Microfluidizers bei 800 bis 1000 bar. Die Zellmembranen werden durch Zentrifugation (90 Min., 100.000 x g, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 3-4 ml Puffer  $A_{\text{mem}}$  (300 mM NaCl, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 % DDM, pH 8.0) je Gramm Pellet homogenisiert und bei 4°C über Nacht gerührt. Das Solubilisat wird zentrifugiert (90 Min., 100.000 x g, 4°C) und der Überstand direkt auf eine mit Puffer  $B_{\text{mem}}$  (300 mM NaCl, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05% DDM, pH 8.0) equilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine werden durch Waschen mit 10 SV Puffer  $C_{\text{mem}}$  (300 mM NaCl, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM Imidazol, 0.05 % DDM, pH 8.0) entfernt. Die Elution von *NpHtrII*(1-114/M100C)-His erfolgt durch Puffer  $D_{\text{mem}}$  (300 mM NaCl, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM Imidazol, 0.05 % DDM, pH 8.0), die erhaltene Lösung wird ankonzentriert (Centricons MWCO 5 kDa) und über Nacht gegen Puffer G (500 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, pH 8.0) dialysiert. Die erhaltene Proteinlösung wird mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht und die Ausbeute mittels UV-Spektroskopie bei 228.5 und 234.5 nm bestimmt.



**Abb. 45:** SDS-Gel des exprimierten und aufgereinigten *NpHtrII*(1-114/M100C)-His, aufgetragen sind Proteinmarker (A/B), *NpHtrII*(1-114/M100C)-His 30 Min. inkubiert mit DTE (C), *NpHtrII*(1-114/M100C)-His 30 Min. inkubiert ohne DTE (D)

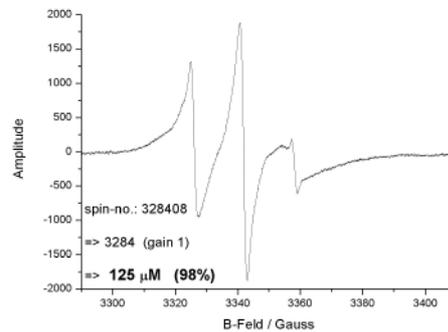
Das analytische SDS-Gel in Abb. 45 zeigt in Bahn C und D *NpHtrII*(1-114/M100C)-His. In den Bahnen A und B sind zwei unterschiedliche Marker aufgetragen, welche die Analyse erleichtern. Bahn C zeigt die erhaltene Proteinlösung, nachdem sie für 30 Minuten in einem DTE-haltigen Probenpuffer inkubiert wurde. Bahn D zeigt die gleiche Proteinmenge, die für 30 Minuten in einem Probenpuffer ohne DTE Zusatz inkubiert wurde. In beiden Bahnen sind jeweils zwei Banden zu erkennen. Die untere Bande bei 14 kDa entspricht der Masse des Monomers, die obere Bande bei 28 kDa entspricht der Masse des Dimers von *NpHtrII*(1-114/M100C)-His. Das Dimer wird über eine Disulfidbrücke gebildet. In Bahn C ist abgebildet, dass dieses Disulfid durch Inkubation mit DTE reduziert wird. Die Intensität der Monomerbande nimmt (schwach) zu. Das gewonnene Protein muss daher, bevor es mit MTSSL markiert werden kann, zuvor mit einem deutlichen Überschuss an DTE behandelt werden.

Die Ausbeute an *NpHtrII*(1-114/M100C)-His beträgt insgesamt 8.5 mg, dies entspricht bei einer Ansatzgröße von 9 L einer Ausbeute von 0.95 mg/L Expressionskultur.

#### 3.4.8 Spinlabeling von *NpHtrII*(1-114/M100C)-His

*NpHtrII*(1-114/M100C)-His wird im 4 mg (325  $\mu$ M) Maßstab spingelabelt. Das in 1 ml Puffer  $G_{\text{mem}}$  (500 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 0.1 % DDM, pH 8.0) gelöste Protein wird zuerst mit 10 mM DTE unter Argon für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Das DTE wird im Anschluss durch Pufferaustausch gegen Puffer  $G_{\text{mem}}$  (ohne DTE Zusatz) entfernt. Die Markierungsreaktion wird unter Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss bei 4°C mit 100  $\mu$ l

einer 100 mM Lösung von MTSSL über Nacht durchgeführt. Die Aufarbeitung der Reaktion erfolgt in zwei Schritten. Im ersten wird ein Großteil des nicht gebundenen Spinlabels über eine PD10-Gelchromatographie-Säule abgetrennt. Die in Mizellen gebundenen freien Spinlabel werden durch eine zweimalige Dialyse gegen Puffer  $G_{mem}$  mit 10% DMSO Zusatz entfernt. Durch Bestimmung der UV-Absorption bei 228.5 und 334.5 nm wird die Konzentration an *NpHtrII(1-114/M100C(R1))-His* zu 1.55 mg/ml (126  $\mu$ M) bestimmt. Ein ESR-Spektrum wird zur Ermittlung der Markierungseffizienz angefertigt.



**Abb. 46:** ESR Spektrum der solubilisierten Probe von *NpHtrII(1-114/M100C(R1))-His*

Aus dem ESR-Spektrum kann nach Kalibration auf eine Probe von TEMPO mit bekannter Konzentration über die Spinzahl auf die Konzentration von spinaktiven Spezies in der Probe zurückgeschlossen werden. Da diese mit der Konzentration an gelabelten Proteinen identisch ist, kann so die Effizienz der Markierung bestimmt werden. Die normalisierte Spinzahl der Probe beträgt 3284, dies entspricht einer Konzentration von 125  $\mu$ M und damit einer Effizienz von 98 %.

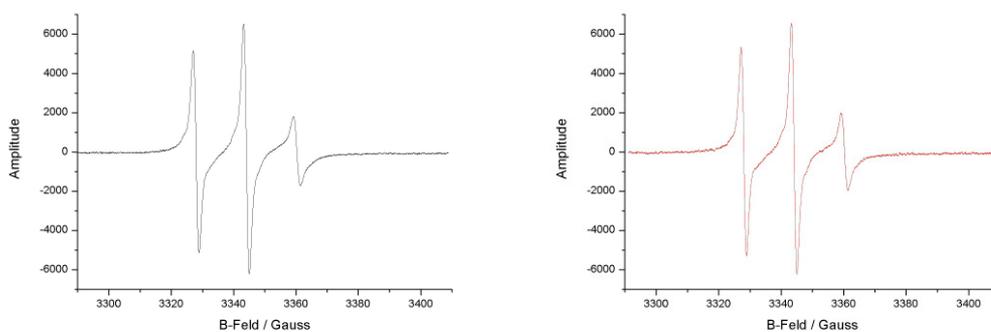
### 3.5.1 ESR-Spektroskopische Untersuchungen

Die ESR-Messungen werden bei Raumtemperatur in Glaskapillaren durch Johann Klare durchgeführt. Der verwendete Puffer bzw. die Proteinumgebung wird jeweils so gewählt, dass sie der natürlichen Umgebung des Proteins möglichst nahe kommt. Soweit nicht anders angegeben, stellen die abgebildeten ESR-Spektren eine Aufsummierung von 10 Scans bei einer Geräteverstärkung von 100 dar.

Aus den ESR Spektren lassen sich zwei Größen als Mobilitätsmerkmale für den eingebrachten Spinlabel ermitteln. Die erste Größe ist der Mobilitätsparameter  $\Delta H_{pp}^{-1}$  und die zweite Größe ist der Rotationskorellationskoeffizient  $\tau_c$ . Die ermittelten Rotationskorellationskoeffizienten werden durch anfitzen mit simulierten ESR Spektren nach Freed (1976) ermittelt. Hierzu wird das brownsche Modell der isotropen Reorientierungsdiffusion angewandt.

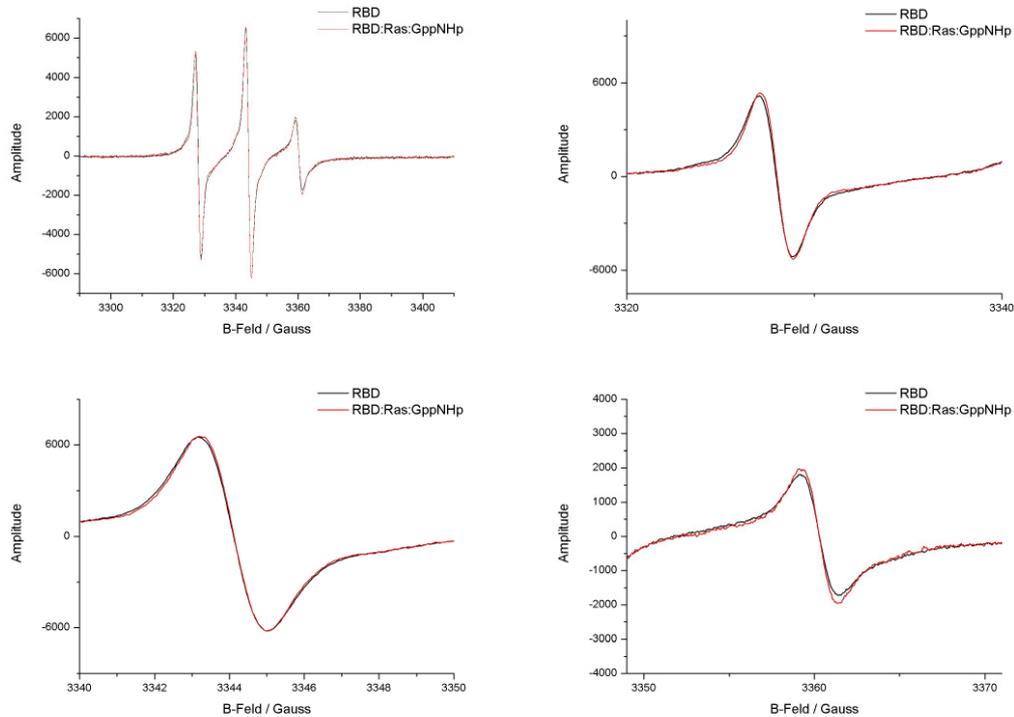
#### 3.5.1.1 Ras-RBD-Systems

Das Peptid RBD(51-131/91Dpr(cSL)) wurde in einem Puffer aus 150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Mesna, pH 7.4 zurückgefaltet (0.5 mg/ml RBD; 53  $\mu$ M). Die Lösung wird bei 4°C für 10 Minuten bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Hierbei werden nicht gefaltete Proteine abgetrennt. Der Überstand wird direkt in eine Glaskapillare überführt und mittels ESR-Spektroskopie vermessen. Im Anschluss wird die Probe mit einem 4-fachen Überschuss an Ras(1-180):GppNHp versetzt, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und ebenfalls mittels ESR-Spektroskopie vermessen. Zu Kontrollzwecken wird diese Messung nach 15, 30 und 90 Minuten wiederholt.



**Abb. 47** : links ESR-Spektrum von RBD(51-131/91Dpr(cSL)) ( $c_{Spin}=36\mu M \Rightarrow$  Rückfaltungseffizienz  $\sim 65\%$ ) und rechts ESR-Spektrum von RBD(51-131/91Dpr(7)) im Komplex mit Ras(1-180):GppNHp.

Die Kontrollmessungen ergeben keine detektierbare Veränderung des ESR Spektrums des Komplexes.

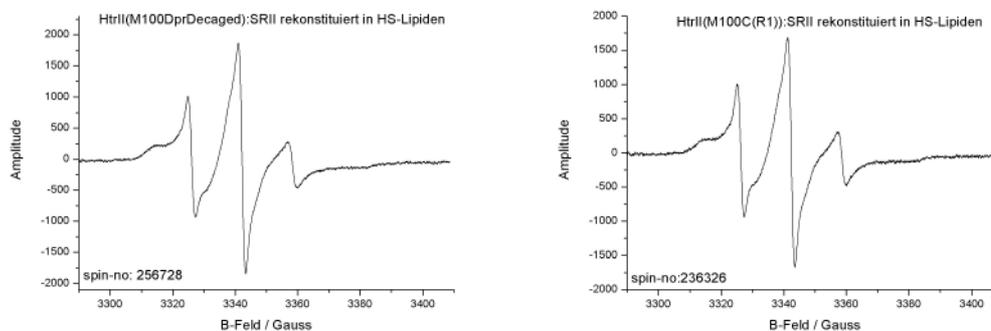


**Abb 48** : Überlagerung der beiden ESR-Spektren aus Abb. 47, links oben : Gesamtansicht, rechts oben : Vergrößerung Erste Resonanzlinie, unten links : Vergrößerung Zentrallinie, unten rechts : Vergrößerung dritte Resonanzlinie.

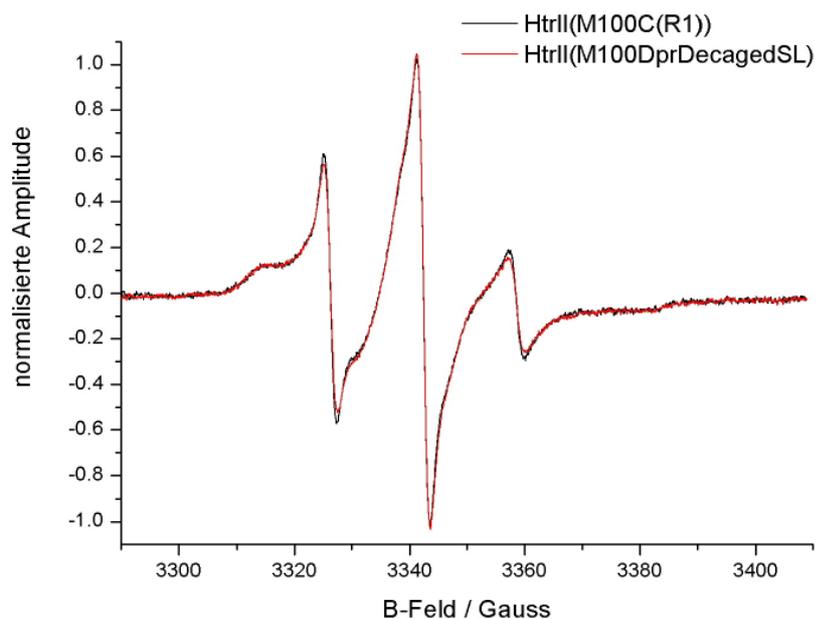
Für den Spinlabel in Position 91 in der RBD wird ein Mobilitätsparameter  $\Delta H_{pp}^{-1} = 5.6 \text{ mT}^{-1}$  ermittelt. Das ist die Größenordnung von Spinlabeln mit hoher Mobilität. Der ermittelte Rotationskorrelationskoeffizient für die RBD beträgt  $\tau_c = 0.63 \text{ ns}$ . Dieser Wert wird typischerweise auch durch mobile Spinlabel erreicht. Im Komplex mit Ras(1-180)GppNHp ist  $\Delta H_{pp}^{-1}$  im Rahmen der Messgenauigkeit gleich. Es kann eine geringe Veränderung im Rotationskorrelationsfaktor  $\tau_c$  gefunden werden. Dieser beträgt für die RBD im Komplex mit Ras(1-180)GppNHp 0.55 ns. Die ermittelbaren Unterschiede in den ESR Spektren und den gefundenen Mobilitätsparametern sind gering und bewegen sich im Bereich der Messgenauigkeit.

### 3.5.1.2 *Np*HtrII-*Np*SRII-System

Beim *Np*HtrII werden 2 unterschiedlich dargestellte Mutanten miteinander verglichen. Die erste Mutante wird durch Expressed Protein Ligation semisynthetisch dargestellt und der Spinlabel anschließend durch Photolyse freigesetzt. Diese wird als *Np*HtrII-114/M100Dpr(SL) bezeichnet. Das zweite Konstrukt wird mit His-Tag exprimiert und mittels MTSSL-Label markiert. Beide Proben werden in polaren Lipiden von *H. salinarium* rekonstituiert. Die gefundene Rekonstitutionseffizienz ist in beiden Fällen nicht sehr hoch und beträgt je nach Experiment nur zwischen 1 und 8 %. Die vermessenen Proben sind daher stark verdünnt.



**Abb. 49:** links : *Np*HtrII(1-114/M100Dpr(SL)) nach Photolyse; rechts MTSSL Labeled



**Abb. 50:** Überlagerung der beiden ESR-Spektren aus Abb. 49

Die erstellten ESR-Spektren von HtrII(1-114) mit beiden Typen eingebrachter Spinlabel (einmal Dpr(SL), einmal Cys(R<sub>1</sub>)) zeigen beide das Vorhandensein von einer mobilen und einer immobilen Komponente. Die Spektren sind im Rahmen der Messgenauigkeit identisch. Die etwas schärfere Ausprägung der ESR Signale der MTTSL markierten Probe können durch geringe Reste freien Spinlabels verursacht werden. Für die Probe mit Dpr(SL) als Spinlabel wurde der Mobilitätsparameter  $\Delta H_{pp}^{-1} = 4.1 \text{ mT}^{-1}$  ermittelt, der Mobilitätsparameter für die Probe mit Cys(R<sub>1</sub>) ist im Rahmen der Messgenauigkeit identisch. Die gefundenen Mobilitätsparameter liegen in der gleichen Größenordnung wie der durch Bordignon et al. (2005) für eine HtrII(1-157/M100C(R<sub>1</sub>)) ermittelte Mobilitätsparameter ( $\Delta H_{pp}^{-1} = 4.3 \text{ mT}^{-1}$ ). In der Position 100 des HtrII verhalten sich die Spinlabel Dpr(SL) und Cys(R<sub>1</sub>) vergleichbar.

## 4. Diskussion

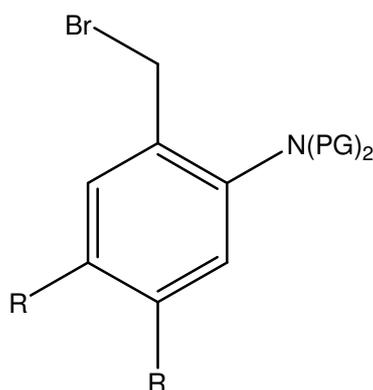
Das Ziel dieser Arbeit ist es eine Methode zu entwickeln, um ein Spinlabel in Gegenwart von Cysteinen in ausgewählte Positionen einzubringen, und mit ihnen anschließend ESR-Messungen durchführen zu können. In der Vergangenheit war dies nur unter Anwendung aufwändiger zellfreier Synthesetechniken möglich. Im Rahmen dieser Arbeit konnten unterschiedliche chemische und biologische Methoden kombiniert werden, um dieses Ziel zu erreichen. Als Anwendungsbeispiele wurden zwei Systeme hoher Relevanz für Signaltransduktionskaskaden (Ras/RBD, *NpSRII/NpHtrII*) verwendet. Das Ras/RBD System wurde verwendet um zu belegen, dass eine selektive Markierung in Gegenwart von drei Cysteinen möglich ist. Das zweite System (*NpSRII/NpHtrII*) wurde gewählt, da diese bereits ausführlich mit der Standardmethode des Site directed spin labeling untersucht wurden, und so der Vergleich zwischen beiden Techniken ermöglicht wird.

### 4.1 Chemische Synthese

Um das Ziel dieser Arbeit erreichen zu können, wurden entgegen der ursprünglichen Planung zwei spinlabelte Moleküle benötigt. Diese Moleküle werden an das Peptid an der festen Phase gekoppelt. Dazu wird im Peptid eine Diaminopropionsäure (Dpr) eingefügt, welche nach Entschützung die freie Aminofunktion zur Verfügung stellt. Der erste Marker DTOPC (**5**) wurde in ähnlicher Form bereits von McNulty (2002) im Rahmen der Boc- und Fmoc-Synthesestrategie verwendet und bringt direkt eine spinaktive Spezies ein. Das zweite Zielmolekül oNV-DTOPC (**7**) (Abb.7) verfügt über eine Schutzgruppe für das N-Oxid, welche selektiv durch Bestrahlung mit UV-Licht abgespalten werden kann. Beide Synthesen beginnen mit der Darstellung von 3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on Hydrobromid (**2**). Die Darstellung von (**2**) lief mit geringen Ausbeuten von 45 % ab, trotz mehrere Versuche konnte die Literatursausbeute von 90% (Storck und Makinen, 1999) nicht erreicht werden. Die folgende Umlagerungsreaktion zur Dihydropyrrolstruktur (**3**) erfolgt mit einer Ausbeute von 78 %, obwohl die eingeführte tert.-Butyl-Gruppe sterisch anspruchsvoller als die klassischerweise bei dieser Reaktion verwendeten Methoxy- oder Ethoxygruppen ist. Die N-Oxidierung mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Natriumwolframat (Rozantsev, 1970; Storck et al., 1999) erwies sich als problemlos reproduzierbar, es konnte festgestellt werden, dass die Reaktion durch Rühren und die Anwendung der 10-fachen Menge von Natriumwolframat nach 12 Stunden beendet werden kann und nicht wie Rozantsev und Storck berichten bis zu 5 Tage

benötigt.

Die Einführung der Schutzgruppe für das N-Oxid erwies sich als große Herausforderung. Ursprünglich war geplant eine Grignard-analoge Reaktion anzuwenden (Gespräch mit T. Kalai und K. Hideg). Es war allerdings nicht möglich das notwendige Edukt (Abb. 51) für diese Reaktion darzustellen.



**Abb. 51:** schematische Darstellung eines Eduktes für die Grignardreduktion,  
PG = Schutzgruppe; R = Rest

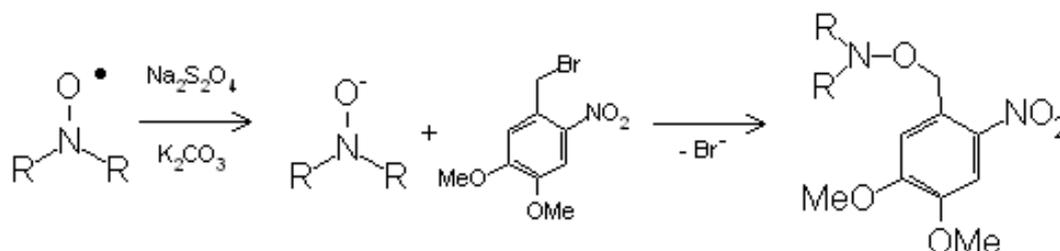
Durch Hideg und Mitarbeiter wurde mehrfach von Reaktionen berichtet, in welchen ein N-Oxid reduziert wurde, um es anschließend mit einem reaktiven Säurechlorid abzufangen (z.B. (Columbus et al., 2001)). Mit dieser Reaktivität müsste es auch möglich sein, beliebige Schutzgruppen an ein N-Oxid zu knüpfen. Hideg und Mitarbeiter berichteten ausschließlich von Reduktionen mit L-Ascorbinsäure oder Natriumdithionit in wässrigen Medien. Die in diese Richtung durchgeführten Testreaktionen mit unterschiedlich substituierten Benzylbromiden erbrachten jedoch keine Ergebnisse, einzig eine Reaktion mit CbZ-Chlorid (Chlorameisensäurebenzylester) erbrachte ein isolierbares Produkt in geringen Ausbeuten (nicht dargestellt). Reaktionen, welche in rein organischen Lösemittelsystemen (Aceton, Dichlormethan, Tetrahydrofuran sowie Gemische) ohne Zugabe von Wasser durchgeführt wurden, schlugen ebenfalls fehl, da hier zwar die Löslichkeit der beiden organischen Edukte gegeben war, jedoch das Reduktionsmittel nicht in ausreichender Menge in Lösung gebracht werden konnte. Als Kompromiss zwischen der Löslichkeit der organischen Edukte und dem Reduktionsmittel Natriumdithionit erwies sich N,N-Dimethylformamid. Hier konnte bereits im ersten Versuch ein geringer Umsatz bei Raumtemperatur festgestellt werden. Entgegen den publizierten Reaktionen mit reaktiven Säurechloriden stellte es sich heraus, dass bei der Reaktion mit Benzylbromiden in DMF eine leicht angehobene Temperatur zu Ausbeute Steigerungen führte. Das beobachtete Ausbeutemaximum von 70 % liegt bei einer

Reaktionstemperatur von ca. 50°C.

Reaktionstemperatur	Ausbeute oNV-DTOPC (7)
25°C	2 %
40°C	44 %
50°C	70 %
60°C	56 %
90°C	35 %

**Tab. 4** : Übersicht zur Abhängigkeit der Ausbeute von oNV-DTOPC (7) der Temperatur

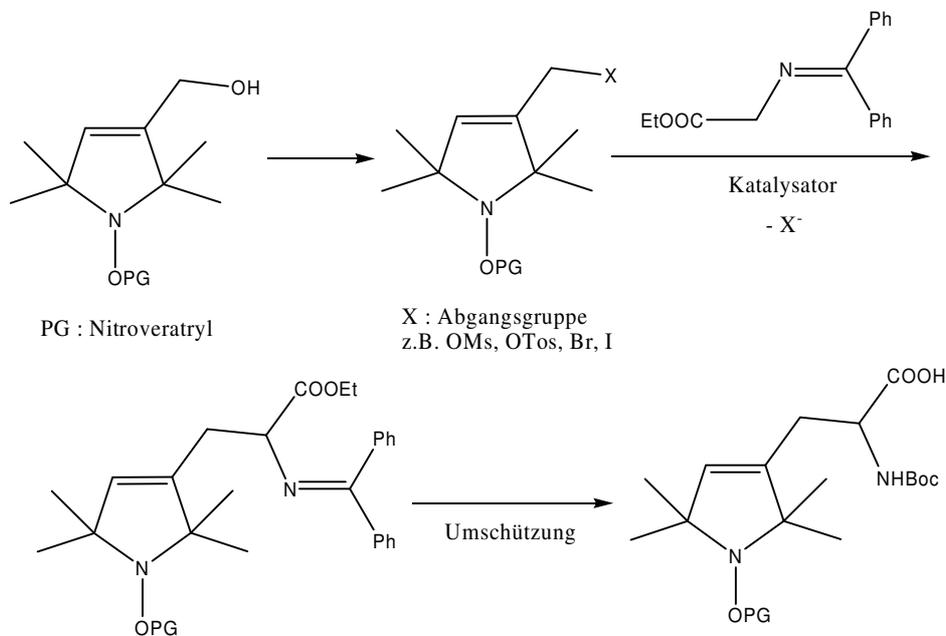
Bei der Reaktion handelt es sich um eine Umsetzung, die mechanistisch vermutlich über 2 Schritte verläuft. Im ersten Schritt wird das N-Oxid durch Natriumdithionit zum Hydroxylamin reduziert, welches durch Kaliumcarbonat deprotoniert wird. Im zweiten Schritt wird das Bromid im Nitroverytrylbenzylbromid substituiert.



Für die Gesamtreaktion wird eine gute Ausbeute von 70 % gefunden. Die Ausbeute ist von der Zeit, die für die Aufarbeitung benötigt wird, abhängig. Sobald die Reaktion durch Wasserzugabe gestoppt wird, tritt als unerwünschte Reaktion, eine Reduktion der Nitrogruppe zum Amin- bzw. Anilinderivat auf. Die Extraktion muss, wegen der Lösevermittlung des DMFs, mit einem großen Überschuss an Ethylacetat durchgeführt werden. Ansonsten läuft die Phasentrennung zu langsam ab, das Reaktionsprodukt ist zulang der wässrigen Dithionitlösung ausgesetzt, was zum oben geschilderten Ausbeuteverlust führt.

Die im Anhang (Appendix A) vorgestellten Synthesen sollen zeigen, dass mit dieser Synthesestrategie grundsätzlich der Zugang zu einer künstlichen Aminosäure, ähnlich der von Hideg und Kalai vorgeschlagen (vgl. Abb. 26), möglich ist, wodurch sich der Abstand des Spinlabels zum Protein Rückgrat abermals um eine Position (-CH<sub>2</sub>- Gruppe) verkürzen ließe. Wie man aus dem Vergleich der jeweiligen Ausbeuten für die zwei dargestellten Reduktionen erkennen kann, ist die Reduktion mit DIBALH hier nicht die Methode der Wahl. Der Umweg über das gemischte Säureanhydrid mittels Chlorameisensäureisobutylester führt zu deutlich

besseren Ausbeuten und ist dem direkten Weg überlegen. Die Umwandlung des Alkohols in eine für die Folgereaktion notwendige Abgangsgruppe stellt hingegen ein ungelöstes Problem dar. Es ist bislang unklar, ob das hier verwendete Mesilat grundlegend für die folgende Reaktion mit einem Glycinäquivalent geeignet ist oder ob hier ggf. eine Transformation in ein Bromid oder Iodid notwendig ist (vgl. Abb.52).



**Abb. 52:** Synthesepfung zur Darstellung einer künstlichen Spinlabelaminosäure für die direkte Verwendung während der Peptidsynthese

## 4.2 Peptid- und Proteinsynthese

### 4.2.1 Peptidsynthese

Der nächste Schritt stellt die Synthese der Peptide und der Einbau der Marker DTOPC (**5**) und oNV-DTOPC (**7**) dar.

Die Synthese der Peptide *NpHtrII*(95-114) und RBD(96-131) verläuft mit Ausbeuten in der erwarteten Größenordnung. Im Fall von RBD(51-95)-SR treten viele Nebenprodukte auf. Ein vergleichbares Verhalten berichtet ebenfalls Sydor (1998). Der Einbau von NOPA als künstlicher Aminosäure scheitert unter Verlust des N-Oxides. Ein vergleichbares Verhalten von N-Oxiden unter den Synthesebedingungen der Boc-Strategie berichtet auch McNulty (2002).

### 4.2.2 Entschützungs- und Markierungsreaktion(en)

Die Entschützung der Seitenkette der Diaminopropionsäure, die Markierung mit den beiden Markern DTOPC (**5**) und oNV-DTOPC (**7**) und die Abspaltung des Peptides vom Harz können einfach und in guten Ausbeuten durchgeführt werden.

### 4.2.3 Ligationen

Die Ligungsreaktion zwischen den Peptiden zum verkürzten Protein bzw. zur Proteindomäne ist ein wichtiger Schritt. Die Ligation muss unter Erhalt des Spinlabels bzw. des geschützten Spinlabels ablaufen.

#### 4.2.3.1 Ligation von RBD(51-131/95X); X= Dpr(SL), ,Dpr(cSL)

Für lösliche Peptide gilt die native chemische Ligation unter denaturierenden Bedingungen als verlässliche Reaktion. Die native chemische Ligation läuft mit den höchsten Ausbeuten ab, wenn die zu ligierenden Peptide gut löslich sind und die Hydrolyse des Thioesters langsam abläuft (geeigneter pH-Wert i.d.R.  $\leq 8$ ; geeignete Ligationsvermittler). Zusätzlich können sterischer Anspruch und Zugänglichkeit des Thioesters zu Problemen und damit niedrigen Ausbeuten führen. Diese Probleme lassen sich im Allgemeinen durch Variation von

Ligationsvermittlern und pH-Wert lösen.

Während der Ligation der Peptide RBD(51-95/91Dpr(SL))-SR und RBD(96-131) tritt ein unerwartetes Problem auf. Das für die ESR-Spektroskopie zwingend erforderliche Radikal (N-Oxid) wird während der Ligation zum Amin reduziert. Bei der Verwendung von Thiophenol als Ligationsvermittler ist dies wegen  $E^0 = -1.7 \text{ V}$  (Borsari et al., 2002) nachvollziehbar. Nicht erwartet wurde die Reduktion allerdings bei der Verwendung verschiedener Konzentrationen an Mesna. Das Redoxpotential von Mesna liegt gemäß Singh und Whitesides (1993) unterhalb des Redoxpotentials von Cystein-Disulfidbrücken, welche ein Redoxpotential von lediglich  $-0.145 \text{ V}$  aufweisen (Jones et al., 2004). Es konnten, trotz Variation von pH-Wert und Konzentration an Mesna, keine Reaktionsbedingungen gefunden werden, bei welchen ein mit DTOPC (**5**) markiertes Peptid ohne Reduktion des Spinlabels verlässlich ligiert werden kann. Die verwendeten Materialien sind allerdings kostengünstig darzustellen und könnten bei der Untersuchung von Wechselwirkungen kurzer Peptide mit Proteinen verwendet werden. Dieser Ansatz kann als Alternative zu den vergleichsweise teuren MTSSL-Spinlabeln geschehen, oder wenn diese nicht anwendbar sind.

Die Ligation der Peptide RBD(51-95/91Dpr(cagedSL))-SR und RBD(96-131) ermöglicht dagegen die Darstellung des gewünschten Ligationsproduktes RBD(51-131/91Dpr(cagedSL)). An dieser Stelle ist die Ligationsausbeute von lediglich 5 % anzumerken. Zwar zeigen auch die Ergebnisse von Sydor (1998) und Becker (2001), dass die Ligationsausbeuten beim Einbau hydrophober und großer Seitenketten in Position 91 einen Ausbeuteverlust nach sich ziehen, dennoch erzielen sowohl Becker als auch Sydor für RBD-Mutanten in Position 91 Ausbeuten zwischen 20 und 27 %, im Vergleich zu 40 % im Fall des RBD(wt). Da in den HPLC-Chromatogrammen und LC-MS-Spektren ein erheblicher Anteil hydrolysierten Thioesters also RBD(51-95/91Dpr(cagedSL))-OH gefunden werden kann, ist die Hydrolyse des Thioesters in diesem Fall ein wahrscheinlicher Grund für die niedrige Ausbeute. Da sowohl Becker als auch Sydor den gleichen Thioester verwendeten und vergleichbare Reaktionsbedingungen verwendet wurden, ist nicht von einer höheren Reaktivität des Thioesters auszugehen. Lediglich der größere sterische Anspruch der verwendeten künstlichen Aminosäure könnte hier Probleme erzeugen. Höhere Aufreinigungsverluste durch z.B. die leicht erhöhte Hydrophobizität und der damit verbundenen höheren Affinität zum Säulenmaterial erscheinen dagegen als unwahrscheinlich.

#### 4.2.3.2 Ligation von *NpHtrII*(1-114/M100Dpr(cagedSL))

Die Ligation der *NpHtrII*-Peptide unter denaturierenden Bedingungen in 6M GdnHCl führt entgegen der Erwartung nicht zum gewünschten Produkt. Ein möglicher Grund für das Scheitern der Ligation könnte sein, dass der Thioester durch die Hydrophobizität der Membranhelix nicht ausreichend zugänglich ist.

Um diese Problem zu umgehen, wurde Trifluorethanol zugesetzt. Gemäß Buck (1998) soll Trifluorethanol durch Wechselwirkung mit hydrophoben Seitenketten die Ausbildung von Helices fördern. Dadurch soll ein nicht kontrolliertes „verknäulen“ und eine damit verbundene schlechte Zugänglichkeit des Thioesters am Ende der transmembranen Helix verhindert werden. Der Zusatz von Trifluorethanol hat allerdings keinen Einfluss auf das Ergebnis der Ligation, so dass hier nicht das Problem liegen kann.

Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass der Thioester schnell hydrolysiert und so nicht mehr für die Ligation zur Verfügung steht. Dies kann jedoch nicht genau analysiert werden, da ausser der gelelektrophoretischen Analyse keine weitere Analysemethode zur Anwendung gebracht werden konnte. Durch die hohe Hydrophobizität des untersuchten Teils von *NpHtrII* konnten weder Bedingungen zur Trennung mittels HPLC gefunden werden, noch konnten die untersuchten *HtrII*-Fragmente massenspektrometrisch mit hinreichender Genauigkeit untersucht werden. Im ESI-MS erfolgt mit den zur Verfügung stehenden Methoden keine Ionisation, so dass keine auswertbaren Massenspektren gewonnen werden konnten. Die Anwendung von MALDI-tof Massenspektrometrie liefert zwar Messsignale, doch weisen diese eine große Signalbreite (möglicherweise durch gebundene Detergenzmoleküle) auf. Die gefundene Signalbreite ließ keine Unterscheidung zwischen dem Thioester und dem hydrolysierten Peptid zu. Ein Hinweis auf eine erfolgreiche Ligationsreaktion konnte durch MALDI-tof MS ebenso wenig gefunden werden, wie durch die gelelektrophoretische Analyse.

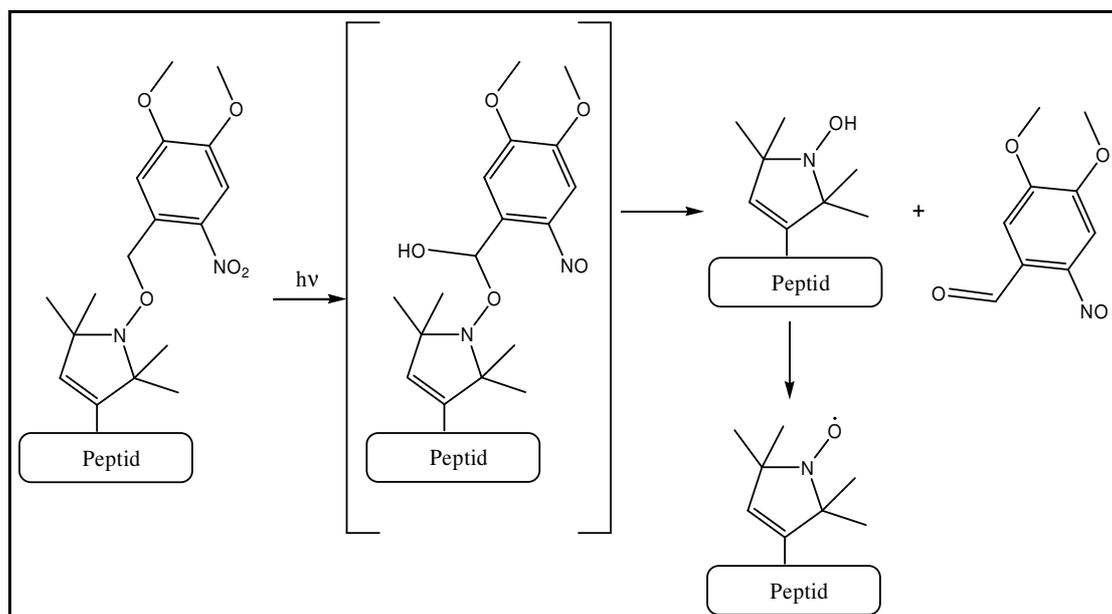
Die Anwendung der expressed Protein Ligation unter nativen Bedingungen stellt eine oft angewandte Alternative zur Ligation unter denaturierenden Bedingungen dar. Bei der expressed Protein Ligation kann sowohl mit einem isolierten Thioester gearbeitet werden, als auch mit einem *in situ* erzeugten Thioester in Gegenwart des Ligationspartners, dieser kann den Thioester abfangen, ehe er hydrolysieren kann. In dieser Arbeit wurde die expressed Protein Ligation in Gegenwart von polaren Lipiden aus *H.Salinarium* und Verwendung eines *NpHtrII*(1-94)-MXE-His-Konstruktes, aus welchem der Thioester *in situ* generiert wurde, verwendet. Das Ligationsprodukt kann nachgewiesen und isoliert werden. Die Ligationsausbeute stellt sich im „Scale Up“ Prozess als höchst variabel heraus und scheitert

sogar einmal. Das Verhältnis der Menge an DDM zu den polaren Lipiden scheint ein wichtiger Faktor zu sein, bei einem geringen DDM Gehalt konnten jeweils die besten Ligationsergebnisse beobachtet werden.

Auch bei dieser Ligationsmethode tritt das Problem der Analytik analog den oben genannten Problemen (Elutionsverhalten, Ionisationsverhalten) auf. Ergänzend wurde versucht, das isolierte Ligationsprodukt analytisch zu charakterisieren. Die Analyse der Reaktionsmischungen mittels analytischer HPLC ist gescheitert, da sich die verfügbaren Trennsäulen als nicht geeignet erwiesen. Die beiden massenspektrometrischen Untersuchungsmethoden scheiterten ebenso wie zuvor.

#### 4.2.4 Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe

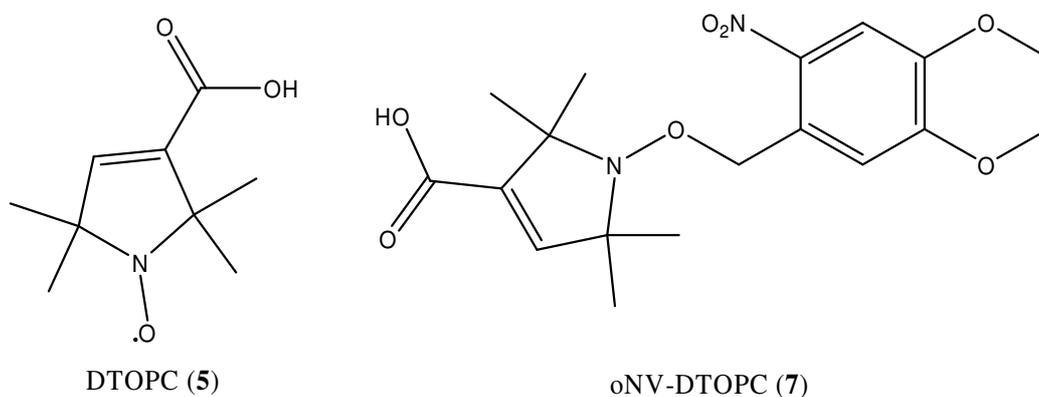
Die Entschützung des N-Oxides nach der Synthese des Peptides erfolgt bei der gewählten Nitroveratrylschutzgruppe durch UV-Licht bei 350 nm in einem UV-Reaktor (Leuchtmittel RPR3500 : 8 x 20 W;  $1.65 \times 10^{16}$  Photonen pro Sekunde und  $\text{cm}^3$ ). In den verschiedenen Beispielen konnte gezeigt werden, dass die Reaktion bei niedrigen Konzentrationen schnell abläuft. Es waren bei den verwendeten Konzentrationen von 1 bis 4 mg/ml (1.2 bzw 4.8  $\mu\text{M}$ ) an Peptid in keinem Fall Reaktionszeiten von mehr als 10 Minuten zu beobachten. Im Fall der Proteine RBD und *NpHtrII* war die Reaktion bereits nach maximal 2 Minuten quantitativ abgelaufen. Es konnte wie vorab vermutet das N-Oxid erhalten werden. Nach dem von Zehavi et al. (1972) postulierten Mechanismus würde das Hydroxylamin entstehen, welches dann gemäß McNulty et al. (2002) durch Luftsauerstoff zum N-Oxid oxidiert wird.



**Abb. 53:** Postulierter Mechanismus der N-Oxid-Entschützung nach Zehavi und McNulty

Neben der Masse des erwarteten Produktes findet sich auch die Masse des Peptides mit reduziertem N-Oxid. Zehavi postuliert als zweites Abspaltprodukt neben dem Hydroxylamin auch einen Nitrosobenzaldehyd (vgl. Abb. 53). Der Nitrosobenzaldehyd besitzt mit der Aldehyd- und der Nitrosfunktion zwei reaktive Gruppen. Die Nitrosogruppe weist ein Redoxpotential von  $E^0 = -0.5$  bis  $-1.3$  V (Nemeikaitė-Čėniene, 2006) auf, das Redoxpotential des Abspaltproduktes ist demzufolge vergleichbar dem von Thiophenol (siehe 4.2.3.1), dies könnte zur Reduktion des N-Oxides führen. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die durch Photolyse entstehenden Produkte eine große chemische Ähnlichkeit zu den Reaktanden im postulierten Mechanismus der Oxidation von Alkoholen und Aldehyden durch De Luca et al. (2003) in Gegenwart eines N-Oxides besitzen. De Luca et al. setzen hierbei das N-Oxid von TEMPO als Oxidationsmittel für den Alkohol oder Aldehyd ein und erhalten unter milden Bedingungen die Carbonsäure. Dabei wird das in katalytisch eingesetzten Mengen TEMPO durch Tricyanursäure reoxidiert. Das beide Annahmen plausibel sind, konnte durch das Zurückdrängen der Reaktion durch Zugabe eines Überschuss von TEMPO gezeigt werden. Eine schlüssige These für die beobachtete Bevorzugung des N-Oxides bei der Verwendung von 50 % Acetonitril in Wasser konnte nicht gefunden werden.

#### 4.2.4.1 Chemischen Eigenschaften der synthetisierten Spinlabel während der Peptidsynthese



**Abb. 54** : Die synthetisierten Spinlabel DTOPC (5) und oNV-DTOPC (7)

Die chemischen Eigenschaften der synthetisierten Spinlabel lassen sich wie folgt zusammenfassen. Beide Spinlabel sind in guten Ausbeuten darzustellen, beide Spinlabel können mit sehr guten Ausbeuten an das Peptid während der Festphasensynthese gekoppelt werden. Der Spinlabel DTOPC (5) ist stabil gegen die Bedingungen der HF-Abspaltung und gegen die Bedingungen bei der HPLC chromatographischen Aufreinigung. Der Spinlabel DTOPC (5) ist nicht stabil gegen die reduktiven Bedingungen während der Ligationsreaktion,

er wird während der Ligation zum Amin reduziert und kann nicht mehr regeneriert werden. Das Versagen von DTOPC (5) in der Ligationsreaktion macht die Synthese von oNV-DTOPC (7) überhaupt erst notwendig. Der geschützte Spinlabel oNV-DTOPC (7) ist gegenüber der HF-Abspaltung, der Aufreinigung mittels HPLC Chromatographie und zusätzlich die reduktiven Bedingungen während der Ligation stabil. Die Nitroveratrylschutzgruppe kann bei Bedarf durch Bestrahlung mit UV-Licht entschützt werden, hierbei muss das entstehende N-Oxid jedoch vor Folgereaktionen geschützt werden. Dies kann durch geschickte Wahl der Reaktionsbedingungen und den Zusatz von Additiven geschehen.

#### 4.2.4.2 Ras/RBD-System

Die Photolyse der Nitroveratrylschutzgruppe erfolgt im Fall von RBD(51-131/91Dpr(cagedSL)) unter denaturierenden Bedingungen. Die besten Reaktionsbedingungen waren hierbei 50 % Acetonitril in Wasser. Der Zusatz von TEMPO führte im Fall der RBD zu Modifikationen am Peptid, gemäß De Luca et al. (2002) wird es sich dabei vermutlich um Oxidationen von Cystein, Methionin und/oder Hydroxylseitengruppen handeln. Johnson und Kent (2006) berichten weiterhin von Additionsreaktionen des Nitrosobenzaldehyds an das Peptid, diese konnten allerdings in den gezeigten Fällen nicht nachgewiesen werden, könnten jedoch für den starken Hintergrund in einigen HPLC-Chromatogrammen verantwortlich zeichnen. Da diese Additionsprodukte nicht in einem vergleichbarem Anteil wie bei Johnson und Kent (2006) auftreten, könnte in der stärkeren Lichtquelle und der damit verbundenen kürzeren Reaktionszeit von maximal 10 Minuten gegenüber der Reaktionszeit von 60 Minuten bei Johnson begründet liegen. Die gefundene Ausbeute von 56 % dürfte ihre Ursache daher hauptsächlich in Aufreinigungsverlusten sowie in der nicht quantitativen Bildung (Ausbeute 70-80 %, siehe Tabelle 1) des N-Oxides haben. Berücksichtigt man, dass es sich bei der RBD um eine Domäne mit 81 Aminosäuren handelt, welche u.A. Methionin, Cysteine, Lysine, Serine und Threonine enthält, welche die oben aufgezählten Nebenreaktionen eingehen können, ist diese Ausbeute als gut anzusehen. Johnson und Kent (2006) benennen zwei Optimierungsmöglichkeiten. Die erste von Johnson und Kent genannte Möglichkeit ist die Alkylierung der benzyllischen Position. Bei der Abspaltung der Schutzgruppe entsteht dann ein weniger reaktives Keton. Die zweite Option ist der Verzicht auf die meta-Methoxygruppe des Aromaten. Johnson und Kent beobachteten eine Beschleunigung der Abspaltkinetik und eine Verringerung der gefundenen Nebenprodukte. Beide Optionen konnten zeitlich nicht mehr realisiert werden.

#### 4.2.4.2 *NpSRII/NpHtrII*-System

Die Entschützung des N-Oxides im *NpHtrII* erfolgt im solubilisierten Zustand. Daher konnte die für die RBD erfolgreiche Lösungsmittelzusammensetzung von 50 % MeCN in Wasser nicht verwendet werden. In Gegenwart von 500 mM NaCl, 10 mM TrisHCl und 0.1 % DDM konnte kein guter Umsatz zur spinaktiven NO-Form festgestellt werden. Erst die Variation der Salzkonzentration brachte den erwünschten Erfolg. Die beste beobachtete Effizienz wurde bei einer Absenkung der NaCl Konzentration auf 125 mM erzielt. Für diese Beobachtung konnte keine Erklärung gefunden werden.

#### 4.2.5 Komplexbildung von *Ras(1-180)GppNHp* und RBD nach der Photolyse

Um die natürliche Konformation der RBD festzustellen wurde ein CD-Spektrum angefertigt. Das CD Spektrum entspricht der Erwartung für die gefaltete RBD. Ausserdem wurde die Bindung der markierten RBD mit *Ras(1-180)GppNHp* (aktive Konformation) durch Gelfiltration untersucht. Die Ergebnisse beider Experimente können als gutes Indiz dafür gewertet werden, dass die Darstellung und Faltung der markierten RBD erfolgreich waren. Dennoch sollten die Bindung und die Bindungskinetik unabhängig durch eine Stopped Flow Messung geprüft werden. Dieses Experiment konnte nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden.

### 4.3 Spektroskopische Charakterisierung

Im Anschluss an diese Experimente wurden ESR-Spektren der dargestellten ESR aktiven Proteine angefertigt und ausgewertet. Dabei wurden die RBD, die RBD im Komplex mit Ras(1-180).GppNHp und die mittels Dpr(SL) und Cys(R1) markierten HtrII(1-114) Konstrukte vermessen. Die erstellten ESR Spektren zeigen, dass mit der in dieser Arbeit entwickelten Strategie spinmarkierte Proteine dargestellt werden können und das Ziel prinzipiell erreicht werden konnte.

Aus den ESR Spektren wurden Daten für die Mobilität extrahiert und mit Literaturdaten von Bordignon et al. (2005) verglichen. Die gefundenen Mobilitätsparameter sind in Tabelle 5 zusammengefasst, ein Vergleich unterschiedlicher Rotationskorrelationskoeffizienten ist in Tabelle 6 dargestellt.

Protein / Proteinkomplex	Mobilitätsparameter $\Delta H_{pp}^{-1}$ in $\text{mT}^{-1}$
RBD(51-131/91Dpr(SL))	5.6
RBD(51-131/91Dpr(SL)):Ras(1-180)GppNHp	5.6
SRII:HtrII(1-114/M100Dpr(SL))	4.1
SRII:HtrII(1-114/M100C(R <sub>1</sub> ))	4.1
SRII:HtrII(1-157/78C(R <sub>1</sub> ))*	1.5
SRII:HtrII(1-157/M100C(R <sub>1</sub> ))*	4.3

**Tab.5:** Mobilitätsparameter für verschiedene Proteine und Proteinkomplexe

\*entnommen aus Bordignon et al. (2005)

Molekül	$\tau_c$ in ns
RBD(51-131/91Dpr(SL))	0.63
RBD(51-131/91Dpr(SL)):Ras(1-180)GppNHp	0.55
SL-HN-Ras(40-50)-SR	0.10
SRII:HtrII(1-157/91C(R <sub>1</sub> )), mobile Komponent *	0.50
MTSSL (freier Spinlabel)	0.07

**Tab. 6:** Rotationskorrelationskoeffizienten  $\tau_c$ , \* entnommen aus Bordignon et al. (2005)

Anhand der Mobilitätsparameter (Tab.5) ist zu erkennen, dass der Spinlabel in der RBD mobil ist. Der gefundene Mobilitätsparameter liegt in der gleichen Größenordnung, wie in den als

mobil identifizierten Bereichen des HtrII(1-157) oberhalb von AS95 (Bordignon et al., 2005). Zu Vergleichszwecken ist mit dem Mobilitätsparameter von SRII:HtrII(1-157/78C(R<sub>1</sub>)) eine als immobil identifizierte Position aufgeführt. An dieser Position wurde der Mobilitätsfaktor  $\Delta H_{pp}^{-1} = 1.5 \text{ mT}^{-1}$  bestimmt, dieser liegt deutlich unterhalb des Mobilitätsfaktors der RBD. Zum Vergleich der Rotationskorrelationskoeffizienten dient die von Bordignon et al. (2005) identifizierte mobile Komponente von SRII:HtrII(1-157/91C(R<sub>1</sub>)), sowie der entschützte SL-HN-Ras(40-50)-Thioester und der ungebundene MTSSL Spinlabel. Das ermittelte  $\tau_c$  für die RBD und die RBD im Komplex mit Ras(1-180)GppNHp liegen innerhalb der gleichen Größenordnung und können gut mit der mobilen Komponente von SRII:HtrII(1-157/91C(R<sub>1</sub>)) verglichen werden. Die ermittelten Koeffizienten für den mit  $M = 1498.3 \text{ g/mol}$  deutlich kleineren spinmarkierten Ras(40-50) Thioester und den freien Spinlabel sind erwartungsgemäß deutlich kleiner. Sowohl der Mobilitätsparameter, als auch der ermittelte Rotationskorrelationskoeffizient zeigen, dass der Spinlabel in Position 91 der RBD mobil ist. Der Vergleich der beiden ESR Spektren des HtrII(1-114) mit den Vergleichsdaten für ein HtrII(1-157) Konstrukt mit einem MTSSL Label ebenfalls an Position 100 zeigt, dass sich beide Spinlabel im Rahmen der Messgenauigkeit identisch verhalten und das der gefundene Mobilitätsparameter mit dem des HtrII(1-157)-Konstruktes vergleichbar ist.

Im Fall der RBD fällt ins Auge, dass es keine starken Unterschiede in den ESR Spektren der einzeln vermessenen RBD und des Komplexes zwischen RBD und Ras(1-180)GppNHp gibt. Dafür sind zwei Gründe denkbar. Der erste Grund wäre ein Problem in der Probenbehandlung und/oder -haltbarkeit, wie z.B. ausfallende Proteine oder ein Abbau des Spinlabels. Der zweite Grund wäre, dass sich die Umgebung und damit verbunden die Mobilität des Labels nicht (ausreichend) ändern. Um diesen Gedankengang zu prüfen ist in Abb. 55 die Struktur der RBD mit Ras dargestellt. Die Seitenkette der Position 91 ist hervorgehoben.



**Abb. 55:** Struktur des RBD:Ras:GppNHp Komplexes mit ESR-Marker (Struktur nach Nassar et al. (1995), Modeling des ESR-Markers durch Klare

Anhand diese Modells kann man erkennen, das der in die RBD eingebrachte Spinlabel nicht zum Bindungsinterface zwischen den beiden Proteinen RBD und Ras(1-180)GppNHp orientiert ist. Werden der mögliche Konformationsraum des Spinlabels (In Abb. 19 durch Rotationsmöglichkeiten und Doppelbindungsanteile angedeutet) und die Flexibilität des Loops berücksichtigt, erscheint dies ein plausibler Grund für die beobachteten Spektren zu sein.

Die ESR Spektren der rekonstituierten SRII:HtrII Konstrukte weisen eine niedrige Konzentration auf. Die erhaltenen ESR Spektren zwischen dem *Np*HtrII(1-114/M100Dpr(SL)) und dem durch MTSSL Labeling erhaltenen *Np*HtrII(1-114/M100C(R<sub>1</sub>)) verhalten sich ähnlich und müssen als identisch im Rahmen der Messgenauigkeit angesehen werden. Es sollten an dieser Stelle jedoch zusätzliche Vergleichspositionen geprüft werden. Einerseits sollte Dpr(SL) in einem immobilen Bereich des HtrII eingebracht werden (z.B. As78 bis AS86) und in einem Bereich mit höherer Mobilität, wie z.B. AS120 mit einem Mobilitätsparameter von ca. 6.0 mT<sup>-1</sup>, nur dann kann der Einfluss der rigideren Struktur von Dpr(SL) im Vergleich zu Cys(R<sup>1</sup>) abgeschätzt werden.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es eine Technik zur Erweiterung des SDSL für die ESR Spektroskopie zu erarbeiten. Diese basiert auf voran gegangenen Arbeiten von McNulty et al. (2002). Es zeigte sich jedoch, dass der von McNulty verwandte Spinlabel weder mit den Bedingungen der NCL, noch mit der EPL kompatibel ist, da die Reaktionsbedingungen zur irreversiblen Zerstörung des N-Oxides führen. Dennoch ist diese Technik für z.B. Bindungsstudien mit kurzen Peptiden gut geeignet. Die einzige Voraussetzung ist, dass das ESR markierte Peptid ohne Ligationsreaktion dargestellt werden kann. Derzeit liegt diese Grenze bei ca. 60 Aminosäuren.

Der Ansatz wurde wegen der Reduktion des N-Oxides um eine Schutzgruppe für das N-Oxid erweitert. Es wurde eine Syntheseroute entwickelt, welche das geschützte Spinlabel oNV-DTOPC (7) in guten Ausbeuten zur Verfügung stellt. Der geschützte Spinlabel kann einfach im Anschluss an die Peptidsynthese an eine vorher festgelegte Position eingebaut werden. Während der folgenden Schritte (Abspaltung, Aufreinigung) ist die Handhabung des Peptides unproblematisch. Die Ausbeuten der Ligationsreaktionen betragen 5 %. Die gefundenen Daten und der Vergleich mit Literaturdaten lassen vermuten, dass dies ein gemeinsamer Effekt von Ligationsstelle und der großen hydrophoben Seitenkette ist.. Es bleibt offen ob die Ausbeute durch weitere Optimierungen (Position Label, Ligationsstelle, Reaktionsbedingungen) gesteigert werden kann.

Die Nitroveratrylschutzgruppe lässt sich durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 365 nm leicht abspalten. Die Herausforderung für diesen Schritt stellen die Ansprüche des Proteins an Salzgehalt, Lösungsmittel, Detergenzien und anderen Additiven, sowie der Schutz des N-Oxides vor Nebenreaktionen dar. Es konnte gezeigt werden, dass kurze Reaktionszeiten und eine geschickte Wahl der Bedingungen für die Gesamtausbeute wichtig sind. Diese Punkte konnten in den zwei gewählten Beispielsystemen gelöst werden. Der Spinlabel konnte sowohl unter nativen, als auch unter denaturierenden Bedingungen generiert werden. Mit dem spinmarkierten Protein konnte im Anschluss erfolgreich ESR-Spektroskopie betrieben werden.

## 6. Literatur

- Altenbach, C. A., Greenhalgh, D. A., Khorana, H. G. und Hubbel, W. L. (1994) "A collision gradient method to determine the immersion depth of nitroxides in lipid bilayers: application to spin-labeled mutants of bacteriorhodopsin." *PNAS* **91**, 1667-1671
- Aravind, L. und Ponting, C.P. (1999) "The Cytoplasmic helical linker Domain of receptor kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins" *FEMS Microbiol. Lett.* **176**, 111-116
- Becker, C. F. W. (2001) "Chemische Synthese von Proteinen: Generierung biologischer Aktivität ohne Nutzung des zellulären Syntheseapparats." Dissertation Universität Dortmund
- Becker, C. F. W., Lausecker, K., Balog, M., Kalai, T., Hideg, K., Steinhoff, H.-J. und Engelhard, M. (2005) "Incorporation of spin-labelled amino acids into proteins." *Magn.Reson.Chem.* **43**, 34-39
- Bordignon, E., Klare, J.P, Doebber, M., Wegener, A.A., Martell S., Engelhard, M. und Steinhoff, H.J. (2005) "Structural Analysis of a HAMP Domain – The Linker Region of the Phototransducer in complex with Sensory Rhodopsin II" *JBC*, **280**, 38767-38775
- Bordignon, E. und Steinhoff, H.J. (2007) "Membrane Protein Structure and Dynamics Studied by Site-Directed Spin Labeling ESR" Kap. 5 in Hemminga, M.A. und Berliner, M.J. (Eds.) "ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics" Springer Science, New York, 129-164
- Borsari, M., Cannio, M. und Gavioli, G. (2002) "Electrochemical Behavior of Diphenyl Disulfide and Thiophenol on Glassy Carbon and Gold Electrodes in Aprotic Media." *Electroanalysis* **15**, 1192-1197
- Buck, M. (1998) "Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins." *Quart. Rev. Biophys.* **31**, 297-355
- Chen, X. und Spudich, J. L. (2002) "Demonstration of 2:2 Stoichiometry in the Functional SRIHtrI Signaling Complex in *Halobacterium* Membranes by Gene Fusion Analysis." *Biochemistry* **41**, 3891-3896
- Chizhov, I., Schmies, G., Seidel, R. P., Sydor, J. R., Lüttenberg, B. und Engelhard, M. (1998) "The Photophobic Receptor from *Natronobacterium Pharaonis*: Temperature and pH Dependencies of the Photocycle of Sensory Rhodopsin II" *Biophys.J.* **75**, 999-1009
- Columbus, L., Kalai, T., Jekö, J., Hideg, K. und Hubbel, W. L. (2001) "Molecular Motion of Spin Labeled Side Chains in R-Helices: Analysis by Variation of Side Chain Structure." *Biochemistry* **40**, 3828-3846
- Cornish, V. W., Benson, D. R., Altenbach, C. A., Hideg, K., Hubbel, W. L. und Schultz, P. G. (1994) "Site-Specific Incorporation of Biophysical Probes into Proteins." *PNAS* **91**, 2910-2914

- Cornish, V. W. and Schultz, P. G. (1994) "A new tool for studying protein structure and function." *Curr. Op. Struct. Biol.* **4**, 601-607
- Crane, J. M., Mao, C., Lilly, A. A., Smith, V. F., Suo, Y., Hubbel, W. L. und Randall, L. L. (2005) "Mapping of the docking of SecA onto the chaperone SecB by site-directed spin labeling: insight into the mechanism of ligand transfer during protein export." *J. Mol. Biol.* **353**, 295-307
- Cuello, L. G., Cortes, D. M. und Perozo, E. (2004) "Molecular architecture of the KvAP voltage dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid bilayer." *Science* **306**, 491-495
- Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I. und Kent, S. B. H. (1994) "Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation." *Science* **266**, 776-779
- De Luca, L., Giacomelli, G., Masala, S. und Porcheddu, A. (2003) "Trichloroisocyanuric / TEMPO Oxidation of Alcohols under Mild Conditions: A Close Investigation." *J. Org. Chem.* **68**, 4999-5001
- Fanucci, G. E. und Cafiso, D. S. (2006) "Recent advances and applications of site-directed spin labeling." *Curr. Op. Struct. Biol.* **16**, 644-653
- Fanucci, G. E., Cogshall, K. A., Cadieux, N., Kim, M., Kadner, R. J. und Cafiso, D. S. (2003) "Substrate-induced conformational changes of the periplasmic N-terminus of an outer-membrane transporter by site-directed spin labeling." *Biochemistry* **42**, 1391-1400
- Freed, H.J. (1976), in Berliner, L.J. (ed.) "Spin labeling: Theory and Application" Academic Press, New York
- Grieco, P., Gitu, P. M. und Hruby, V. J. (2001) "Preparation of 'side-chain-to-side-chain' cyclic peptides by Allyl and Alloc strategy: potential for library synthesis." *J. Pept. Res.* **57**, 250-256
- Hemminga, M.A. (2007) "Introduction and Future of Site-Directed Spin Labeling of Membrane Proteins" Kap. 1 in Hemminga, M.A. und Berliner, M.J. "ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics", Springer Science, New York, 1-16
- Hippler-Mreyen, S., Klare, J. P., Wegener, A. A., Seidel, R. P., Herrmann, C., Schmies, G., Nagel, G., Bamberg, E. und Engelhard, M. (2003) "Probing the Sensory Rhodopsin II Binding Domain of its Cognate Transducer by Calorimetry and Electrophysiology." *J. Mol. Biol.* **330**, 1203-1213
- Holloway, P. W. (1973) "A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples." *Analytical Biochemistry* **53**, 304-308
- Hubbel, W. L., Gross, A., Langen, R. und Lietzow, M. A. (1998) "Recent advances in site-directed spin labeling of proteins." *Curr. Op. Struct. Biol.* **8**, 649-656
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J. U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J. E., Lupas, A. N. und Coles, M. (2006) "The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling." *Cell* **126**, 929-940

- Iakovenko, A., Rostkova, E., Merzlyak, E., Hillebrand, A. M., Thoma, N. H., Goody, R. S. und Alexandrov, K. (2000) "Semi-synthetic Rab proteins as tools for studying intermolecular interactions." *FEBS Lett.* **468**, 155-158
- John, J., Frech, M. und Wittinghofer, A. (1988) "Biochemical Properties of Ha-ras Encoded p21 Mutants and Mechanism of the Autophosphorylation Reaction." *J. Biol. Chem.* **263**, 11792-11799
- John, J., Sohmen, R., Feuerstein, R., Linke, R., Wittinghofer, A., Goody, R.S. (1990) "Kinetics of Interaction of Nucleotides with Nucleotide-Free H-Ras p21" *Biochemistry* **29**, 6058-6065
- Johnson, E. C. B. und Kent, S. B. H. (2006) "Synthesis, stability and optimized photolytic cleavage of 4-methoxy-2-nitrobenzyl backbone-protected peptides." *Chem. Comm.* **2006**, 1557-1559
- Jones, D. P., Go, Y.-M., Anderson, C. L., Ziegler, T. R., Kinkade Jr., J. M. und Kirilin, W. G. (2004) "Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control." *FASEB J.* **18**, 1246-1248
- Jung, K.-H. (2007) "The Distinct Signalling Mechanisms of Microbial Sensory Rhodopsins in Archae, Eubacteria and Eukarya" *Photochem. & Photobio.* **83**, 63-69
- Kane, P. M., Yamashiro, C. T., Wolczyk, D. F., Neff, N., Goebel, M. und Stevens, T. H. (1990) "Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar hydrogen ion-adenosine triphosphatase." *Science* **250**, 651-657
- Klare, J. P. (2002) "Strukturelle und funktionelle Untersuchungen des photophoben Rezeptor/Transducer-Komplexes aus *Natronobacterium pharaonis*." Dissertation Universität Dortmund
- Klare, J. P., Gordeliy, V. I., Labahn, J., Büldt, G., Steinhoff, H.-J. und Engelhard, M. (2004) "The archaeal sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer." *FEBS Lett.* **564**, 219-224
- Kochendoerfer, G. G., Salom, D., Lear, J. D., Wilk-Orescan, R., Kent, S. B. H. und DeGrado, W. F. (1999) "Total Chemical Synthesis of the Integral Membrane Protein Influenza A Virus M2: Role of Its C-terminal Domain in Tetramer Assembly." *Biochemistry* **38**, 11905-11913
- Lüttenberg, B., Wolff, E.K. und Engelhard, M. (1998) "Heterologous coexpression of the blue light receptors pSRII and its transducer pHtrII from *Natronobacterium pharaonis* in the *Halobacterium Salinarium* strain Pho81/w restores negative phototaxis" *FEBS Lett.* **426**, 117-120
- McNulty, J. C., Thompson, D. A., Carrasco, M. R. und Millhauser, G. L. (2002) "Dap-SL: a new site-directed nitroxide spin labeling approach for determining structure and motions in synthesized peptides and proteins." *FEBS Lett.* **529**, 243-248
- Merrifield, R. B. (1963) "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide." *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154

- Merrifield, R. B. (1985) "Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture)." *Ang. Chem. Int. Ed.* **24**, 799-810
- Miranda, L. P., Jones, A., Meutermans, W. D. F. und Alewood, P. F. (1998) "p-Cresol as a Reversible Acylium Ion Scavenger in Solid-Phase Peptide Synthesis." *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 1410-1420
- Muir, T. W., Sondhi, D. und Cole, P. A. (1998) "Expressed protein ligation: A general method for protein engineering." *PNAS* **95**, 6705-6710
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F. und Wittinghofer, A. (1995) "The 2.2 Å crystal structure of the Ras-Binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1a and a GTP analogue." *Nature* **375**, 554-560
- Nelson, W. D., Blakely, S. E., Nesselov, Y. E. und Thomas, D. D. (2005) "Site-directed spin labeling reveals a conformational switch in the phosphorylation domain of smooth muscle myosin." *PNAS* **102**, 4000-4005
- Nemeikaitė-Čėnienė, A., Miliukienė, V., Šarlauskas, J., Maldutis, E., Čėnas, N. (2006) "Chemical aspects of cytotoxicity of nitroaromatic explosives: a review." *CHEMIJA* **17**, 34-41
- Nordio, P.L. (1976) "General Magnetic Resonance Theory." In Berliner, L.J. (Ed.), "Spin Labeling - Theory and Applications." Academic Press, New York, San Francisco, London, 5-52
- Rigaud, J. L., Mosser, G., Lacapere, J. J., Olofsson, A., Levy, D. und Ranck, J. L. (1997) "Bio-beads : An efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins." *J. Struc. Biol.* **118**, 226-235
- Rozantsev, E.G. (1970) "Free Nitroxyl Radicals" Plenum Press, New York
- Sakakibara, S. (1999) "Chemical Synthesis of Proteins in Solution." *Biopolymers* **51**, 279-296
- Sarin, V. K., Kent, S. B. H., Tam, J. P. und Merrifield, R. B. (1981) "Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction." *Analytical Biochemistry* **117**, 147-157
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379
- Schnölzer, M., Alewood, P. F., Jones, A., Alewood, D. und Kent, S. B. H. (1992) "In Situ Neutralisation in Boc-chemistry Solid Phase Peptide Synthesis." *Int. J. Pept. Prot. Res.* **40**, 180-193
- Singh, R. und Whitesides, G.M. (1993) "Thiol-disulfide interchange." in Patai, S. und Rappoport, Z. (Eds.) "Supplement S: The Chemistry of Sulphur-containing Functional Groups" Wiley, Chichester, 633-658
- Snyder, S.W. und Thurnauer, M.C. (1993) "The Photosynthetic Reaction Center" Academic Press, New York

- Storck, S. W. und Makinen, M. W. (1998) "Facile Synthesis of 3-Formyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxypyrroline." *Synthesis* **8**, 1309-1312
- Sydor, J. R. (1998) "Protein Engineering am Beispiel der Ras-Bindungsdomäne von c-Raf-1 und ihrer Funktionalisierung." Dissertation Universität Dortmund
- Sydor, J. R., Engelhard, M., Wittinghofer, A., Goody, R. S. und Herrmann, C. (1998) "Transient Kinetic Studies on the Interaction of Ras and the Ras-Binding Domain of c-Raf-1 Reveal Rapid Equilibration of the Complex." *Biochemistry* **37**, 14292-14299
- Sydor, J. R., Herrmann, C., Kent, S. B. H., Goody, R. S. und Engelhard, M. (1999) "Design, total chemical synthesis, and binding properties of [Leu-91-N1-methyl-7-azaTrp]Ras-binding domain of c-Raf-1." *PNAS* **96**, 7865-7870
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., Cooper, J.A. (1993) "Mammalian Ras Interacts Directly with the Serine/Threonine Kinase Raf" *Cell*, **74**, 205-214
- Wang, L. und Schultz, P. G. (2004) "Expanding the Genetic Code." *Ang. Chem. Int. Ed.* **44**, 34-66
- Wegener, A. A. (2000) "Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Lichtrezeptors pSRII mit seinem Transducerprotein pHtrII." Dissertation Universität Dortmund
- Wegener, A. A., Chizov, I., Engelhard, M. und Steinhoff, H.-J. (2001) "Time-resolved Detection of Transient Movement of Helix F in Spin-labelled Pharaonis Sensory Rhodopsin II." *J. Mol. Biol.* **301**, 881-891
- Wegener, A. A., Klare, J. P., Engelhard, M. und Steinhoff, H.-J. (2001) "Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archael phototaxis." *EMBO J.* **20**, 5312-5319
- Wieland, T., Bokelmann, E., Bauer, L., Lang, H. U. und Lau, H. (1953) "Über Peptidsynthesen. 8. Mitteilung Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten." *Liebigs Ann. Chem.* **583**, 129-149
- Wittinghofer, A. und Waldmann, H. (2000) "Ras - A molecular Switch Involved in Tumor Formation." *Ang. Chem. Int. Ed.* **39**, 4192-4214
- Yan, B., Takahashi, T., Johnson, R. und Spudich, J. L. (1991) "Identification of signaling states of a sensory receptor by modulation of lifetime of stimulus-induced conformations : The case of sensory rhodopsin II." *Biochemistry* **30**, 10686-10692
- Yoshihisa, T. und Anraku, Y. (1990) "A novel pathway of import of a-mannosidase, a marker enzyme of vacuolar membrane, in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **265**, 22418-22425
- Zehavi, U., Amit, B. und Patchornik, A. (1972) "Light- Sensitive Glycosides. I. 6-Nitroveratryl P-D-Glucopyranoside and 2-Nitrobenzyl P-D-Glucopyranoside." *J. Org. Chem.* **37**, 2281-2285

## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Engelhard und Prof. Dr. Roger S. Goody für die herausfordernde Themenstellung, die Unterstützung während der Arbeit und ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Henning Mootz danke ich für die kurzfristige Übernahme des Koreferates und sein Interesse an dieser Arbeit.

Anschließend danke ich Herrn Dr. Ralf Seidel, Herrn Dr. Christian Becker, Herrn Prof. Dr. Jürgen Steinhoff, Herrn Dr. Johann Klare, Herrn Dr. Yoann Marsac, Herrn Dr. Eric Schiffer, Herrn Dr. Rolf Kalmbach, Frau Dr. Nadine Mennes, Frau Dr. Jelena Milic, Frau Dr. Enrica Bordignon und Herrn Dr. Branko Kolaric für praktische Hilfen, zahlreiche hilfreiche Diskussionen, aufmunternde Worte, durchgeführte Messungen und die Möglichkeit von ihren Erfahrungen zu profitieren.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Sascha Gentz für die praktische Hilfe im Labor und die freundliche Unterstützung bei den automatisierten Festphasensynthesen bedanken.

Bei meinen Kollegen in Labor und Büro Herrn Dipl. Chem. Jörg Sauermann, Dipl. Chem. Lars Gogolin, Dipl. Chem. Jens Moser, B. Sc. Mark Dittmann, B. Sc. David Wiegmann, Frau Dipl. Chem. Diana Olschewski, Dipl. Chem. Swetlana Martell, Dipl. Chem. Sunanda Lahiri, Dipl. Biol. Maria Schumacher, B. Sc. Ilka Thiel, M. Sc. Renate Szweda, Evelyne Merten und Philipp Adamitzki sowie den weiteren technischen Mitarbeitern Frau Annika Göppner, Frau Anke Reulen, Frau Karin Vogel-Bachmayr und Frau Martina Wischnewski für die sehr gute und freundliche Arbeitsatmosphäre und die kleinen Hilfen im Alltag und das Ertragen meiner Launen.

Bei meinen Eltern Wolfgang und Dagmar bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums. Meiner Schwester Angela Lausecker und Stefan Kähler, meinem Bruder Dusty Lausecker und meiner Schwester Sally Lausecker danke ich für die familiäre Unterstützung.

Meinen besten Freunden Thomas Linkowski, Stefan Grösch und Gordon Scholz danke ich dafür, das sie immer ein offenes Ohr hatten, auch wenn ich manchmal nicht die Zeit aufbringen konnte, die eigentlich für eine Freundschaft notwendig gewesen wäre. Gleiches möchte ich über Stefans Ehefrau Steffi und über Simone Gosewinkel sagen. Einen herzlichen Dank für euer Verständnis.

Bei meinem ehem. Chemielehrer Herrn Rauh bedanke ich mich, da er mir bei der Berufsfindung mit seinem interessanten und praxisnahen Unterricht die Entscheidung leicht gemacht hat.

## Lebenslauf

Name : Kester Lausecker

Geburtsdatum : 01.10.1977  
Geburtsort : Hamm/Westf.  
Nationalität : Deutsch

Schule : 1988 – 1997 Märkisches Gymnasium Hamm,  
Abitur am 06.06.1997 mit der Durchschnittsnote 1,6  
  
1984 – 1988 Lessingschule Hamm

Zivildienst : 01.07.1997 bis 31.07.1998 Rehabilitationswohnheim Rosa-  
Luxemburgstr. 41 (Hamm) des Arbeitskreis für Jugendhilfe  
Hamm e.V.

Studium : 24.09.2003 Abschluss des Diplomstudiengangs Chemie an der  
Universität Dortmund  
  
03.2003 bis 09.2003 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Martin  
Engelhard am Max Planck Institut für molekulare Physiologie in  
Dortmund zum Thema „Synthese von fluoreszenzmarkierten  
Aminosäuren und Peptiden“  
  
15.08.2000 Vordiplom Chemie  
  
WS 1998/99 Aufnahme des Diplomstudienganges Chemie an  
der Universität Dortmund (heute Technische Universität  
Dortmund)

Promotion : seit Januar 2004 bei Prof. Dr. Martin Engelhard und Prof. Dr.  
Roger S. Goody am Max Planck Institut für molekulare  
Physiologie in Dortmund.

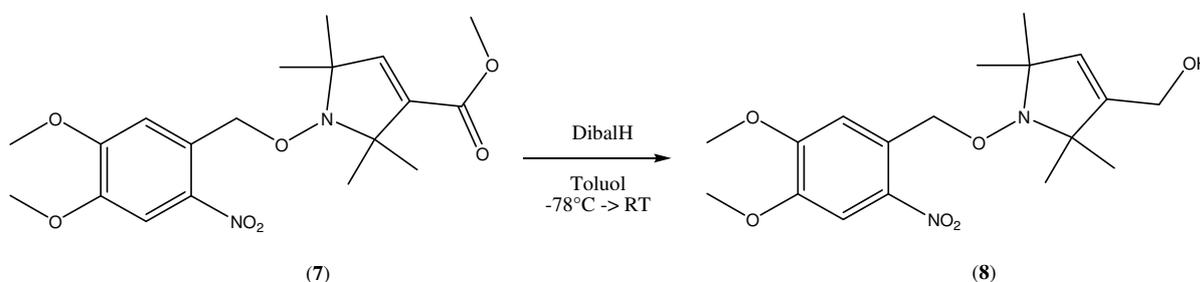
Tätigkeit : seit 01.07.2008 Fachberater REACH bei Fa. KiK Textilien &  
Non-Food GmbH in 59199 Bönen

## Publikationen

Becker, C. F. W., Lausecker, K., Balog, M., Kalai, T., Hideg, K., Steinhoff, H.-J. und Engelhard, M. (2005) „Incorporation of spin-labelled amino acids into proteins.“ *Magn. Reson. Chem.* **43**, 34-39

## Appendix A – zusätzlich durchgeführte Synthesen

Synthese von (1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-yl)methanol (**8**):

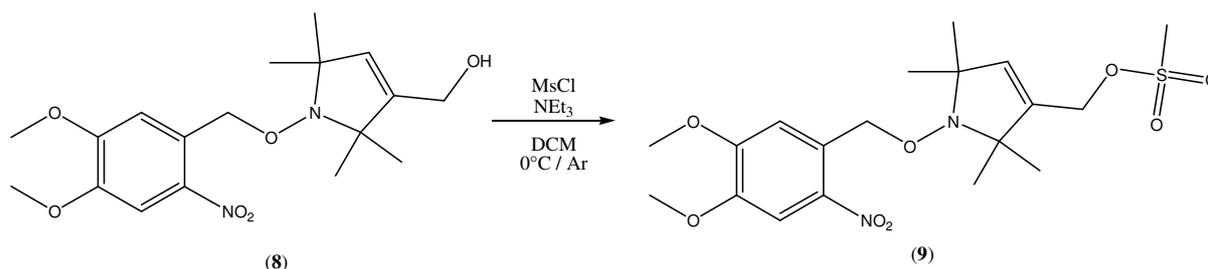


In einem mehrmals im Vakuum ausgeheizten und mit Argon gespülten 100 ml Dreihalskolben werden 2.46 g (6.45 mmol) (4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-methylester (**7**) in 65 ml abs. Toluol gelöst und auf -78°C gekühlt. In der Kälte werden 19 ml einer 1 M Lösung von DibalH in Toluol (18.75 mmol; 3 Äq.) langsam hinzuge tropft. Die Reaktionsmischung wird weitere 4 h bei -78°C gehalten und dann über Nacht auf Raumtemperatur aufgewärmt. Die Reaktion wird unter Eiskühlung mit 2 ml Methanol gequencht und bis zur Beendigung der Gasproduktion gerührt. Die Reaktion wird mit 50 ml Diethylether verdünnt und dreimal mit jeweils 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Der organische Extrakt wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Eine weitere Aufreinigung ist nicht notwendig.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.65 ppm (s, 1H, arom. meta); 7.29 ppm (s, 1H, arom. ortho); 5.43 ppm (s, 1H, vinyl); 5.21 ppm (s, 2H, benzyl); 4.13 ppm (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH) 3.96 ppm (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 3.92 ppm (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 1.24 ppm (s, 12H, CH<sub>3</sub>)

Ausbeute: 0.405 g (17 % d.Th.) (1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-yl)methanol (**8**)

Synthese von (1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-yl)methyl-methanesulfonat (**9**)

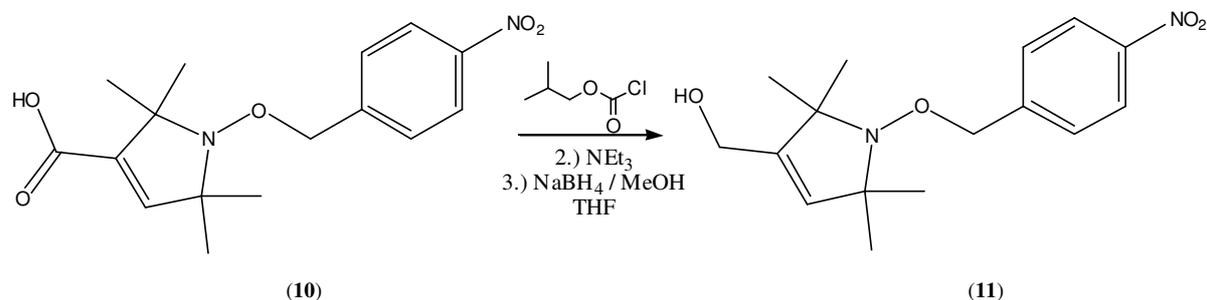


In einem im Vakuum ausgeheizten und mehrmals mit Argon gespülten 100 ml Zweihalskolben werden 0.405 g (1.1 mmol) (1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-yl)methanol (**8**) in 35 ml abs. Dichlormethan gelöst und auf 0°C gekühlt. In der Kälte werden nacheinander zuerst 3.35 ml Triethylamin (24 mmol; 22 Äq.) und 0.86 ml Methansulfonylchlorid (11 mmol, 10 Äq.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und dabei auf Raumtemperatur gebracht. Die Reaktion wird durch Zugabe von 35 ml Wasser beendet und dreimal mit jeweils 30 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Extrakte werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Eine weitere Aufreinigung ist nicht notwendig.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.66 ppm (s, 1H, arom. meta); 7.27 ppm (s, 1H, arom. ortho); 5.68 ppm (s, 1H, vinyl); 5.22 ppm (s, 2H, benzyloxy); 4.70 ppm (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-OR) 3.97 ppm (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 3.94 ppm (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 3.02 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>R) 1.24 ppm (s, 12H, CH<sub>3</sub>)

Ausbeute: 0.118 g (24 % d.Th.) (1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-yl)methyl-methanesulfonat (**9**)

Synthese von (4-Nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-yl)methanol  
(11)

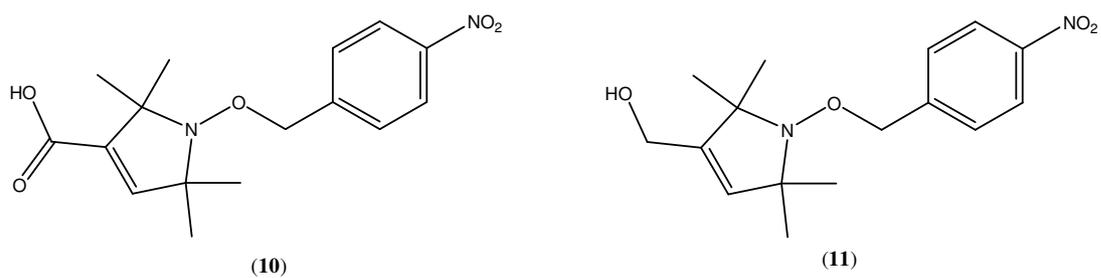
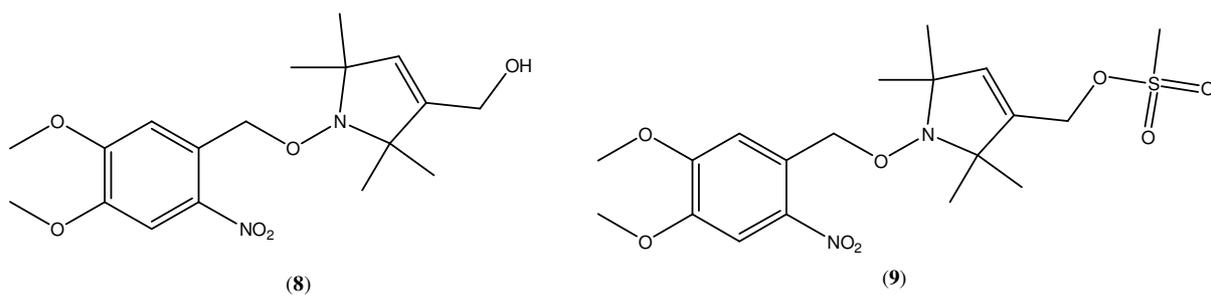
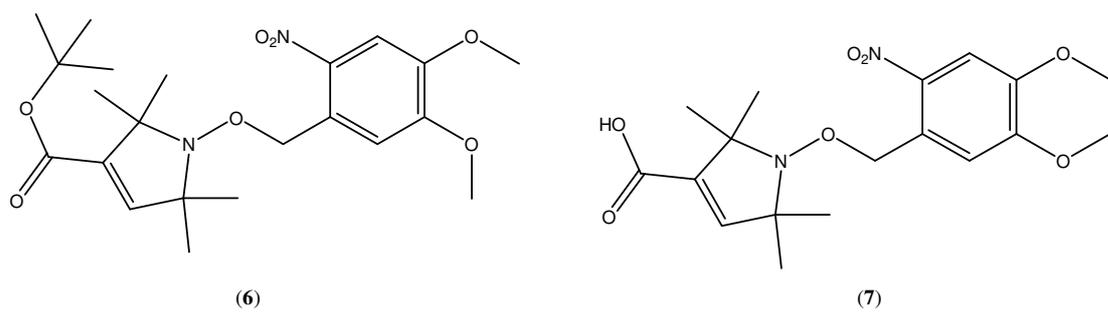
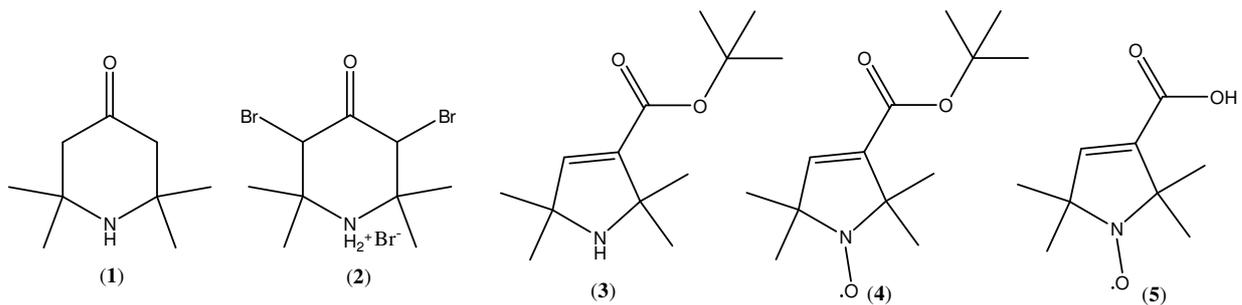


In einem im Vakuum ausgeheizten und mehrmals mit Argon gespülten 100 ml Zweihalskolben mit großem Rückflusskühler werden 0.93 g (2.9 mmol) (4-nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-carbonsäure (**10**) in 15 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und auf  $-10^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Nach ca. 10 Minuten werden nacheinander 0.43 ml (3.2 mmol; 1.1 Äq.) Chlorameisensäureisobutylester und 0.52 ml (3.8 mmol; 1.3 Äq.) Triethylamin hinzugegeben und für 1 h bei  $-10^{\circ}\text{C}$  gerührt. Nach 1 h wird das ausgefallene  $\text{NEt}_3\text{HCl}$ -Salz unter der Argondusche abgefiltert und der Filterkuchen mit 20 ml abs. Tetrahydrofuran extrahiert. Die Reaktionsmischung wird abermals auf  $-15^{\circ}\text{C}$  gekühlt, ehe 0.33 g (8.7 mmol, 3 Äq.)  $\text{NaBH}_4$  in drei Portionen zugefügt werden, anschließend werden 5 ml Methanol zugegeben. Die Reaktion läuft unter sehr starker Gasbildung ab. Sobald die Reaktion zur Ruhe gekommen ist, wird sie weitere 8 Stunden gerührt und dann mit Wasser beendet und dreimal mit jeweils 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Extrakte werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8.21 ppm (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, arom. meta); 7.53 ppm (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, arom. ortho); 5.45 ppm (s, 1H, vinyl); 4.94 ppm (s, 2H, benzyloxy); 4.15 ppm (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ); 1.23 ppm (s, 12H,  $\text{CH}_3$ )

Ausbeute : 0.684 g (77 % d.Th.) (4-Nitrobenzyloxy)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-3-yl)methanol (**11**)

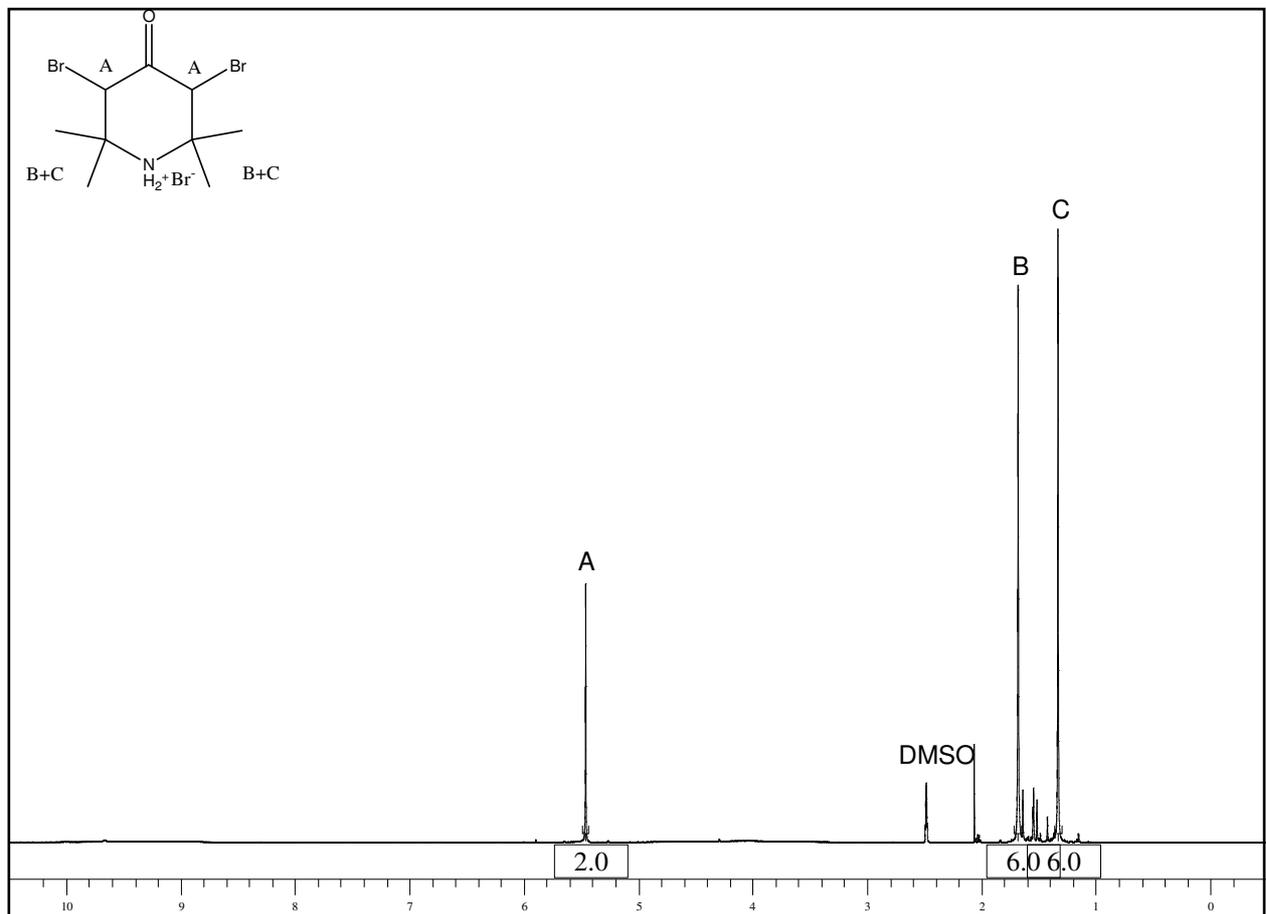
## Appendix B – Molekülverzeichnis



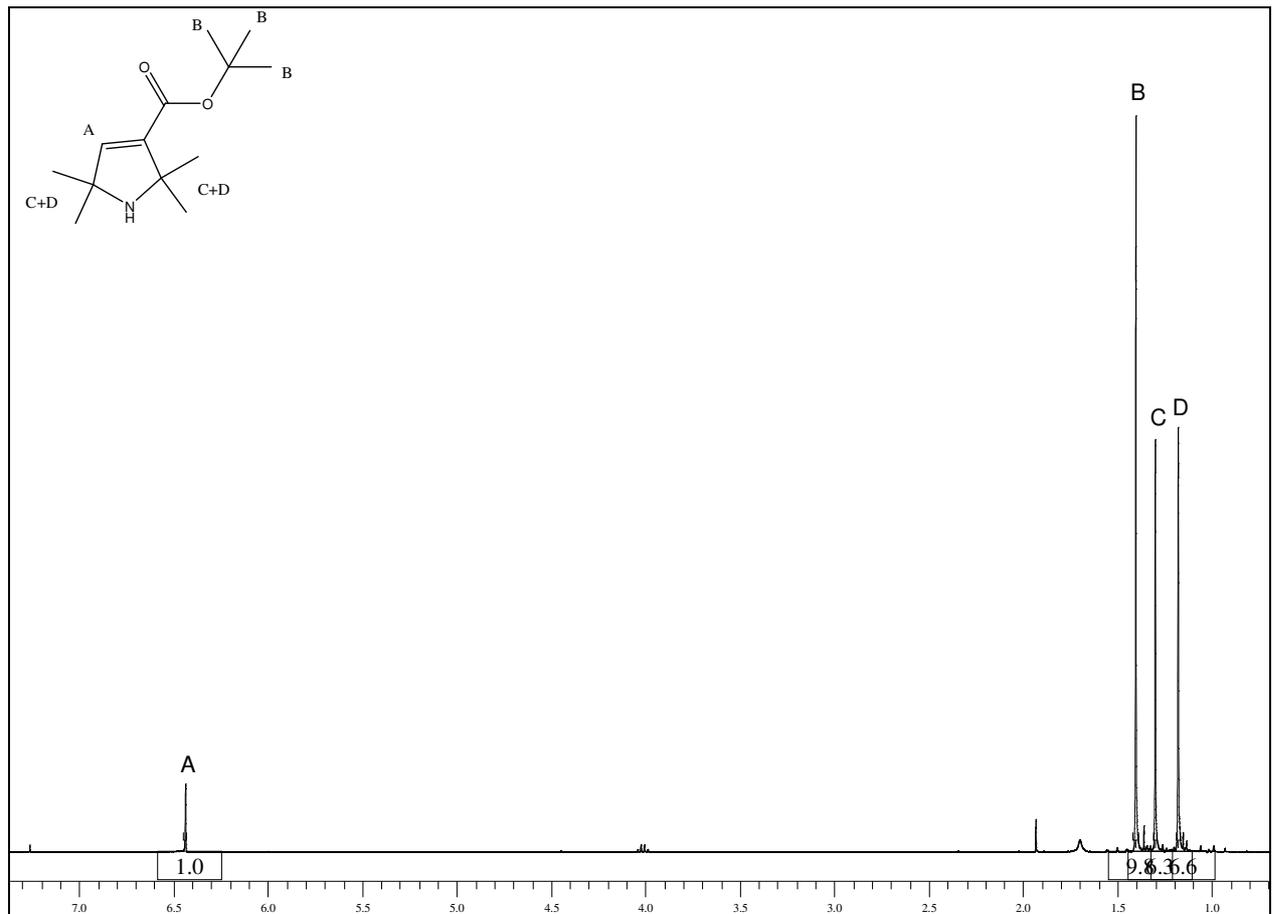
## Appendix C – NMR-Spektrenanhang

In den Spektren wurden, wo notwendig, Lösungsmittelsignale aus der Chromatographie (z.B. Cyclohexan, Ethylacetat) und vom Reinigen der Geräte (z.B. Aceton, Methanol) entfernt. Um die Zuordnung der Signale zu vereinfachen, ist stets das Molekül abgebildet. Die Zuordnung kann über die Indizierung der sichtbaren Protonen mit Buchstaben erfolgen. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen sind Amine, Carboxygruppen, sowie Alkohole in der Regel nicht sichtbar. Von spinaktiven Substanzen (z.B. (4)) konnten wegen der Signalverbreiterung keine auswertbaren NMR Spektren aufgenommen werden.

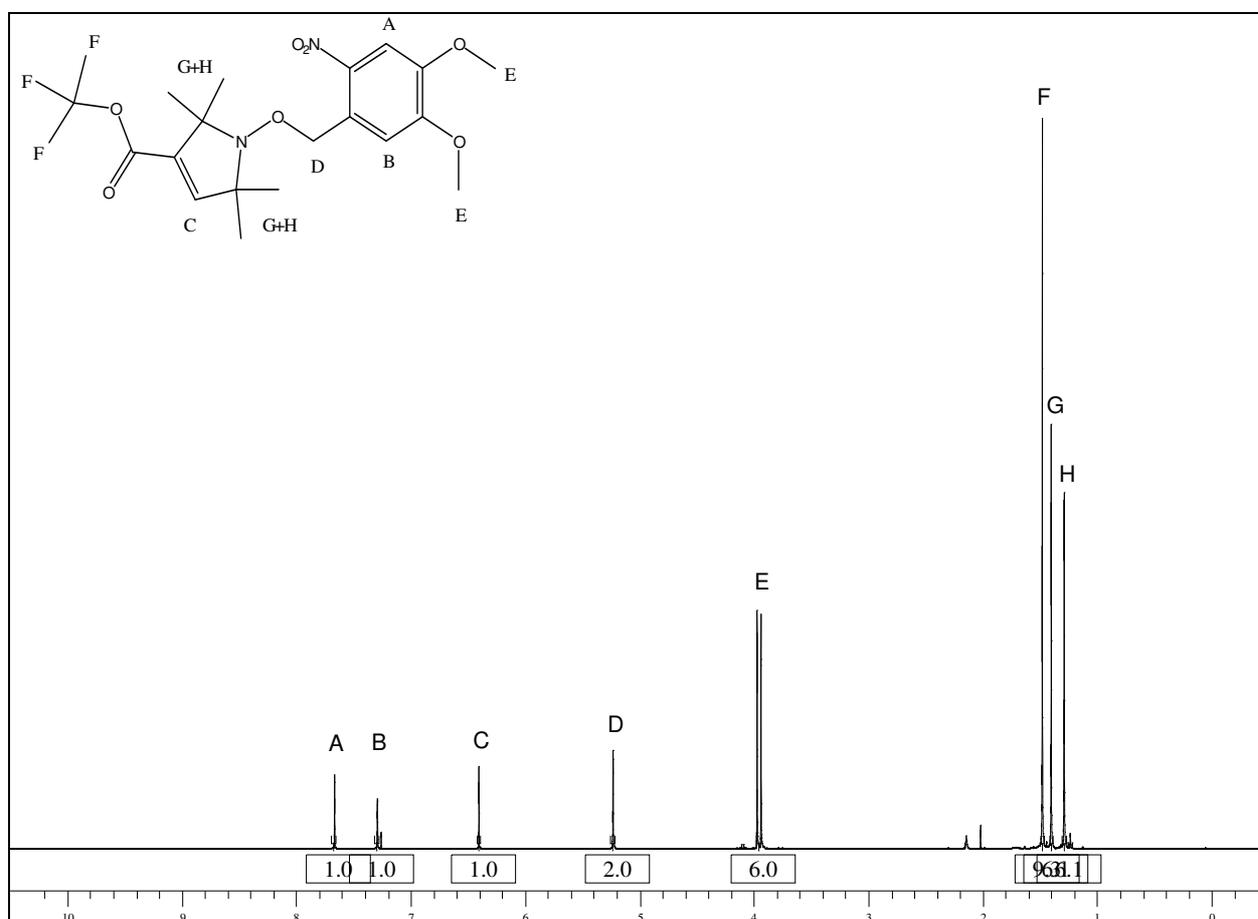
### C.1 – $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) von (2)



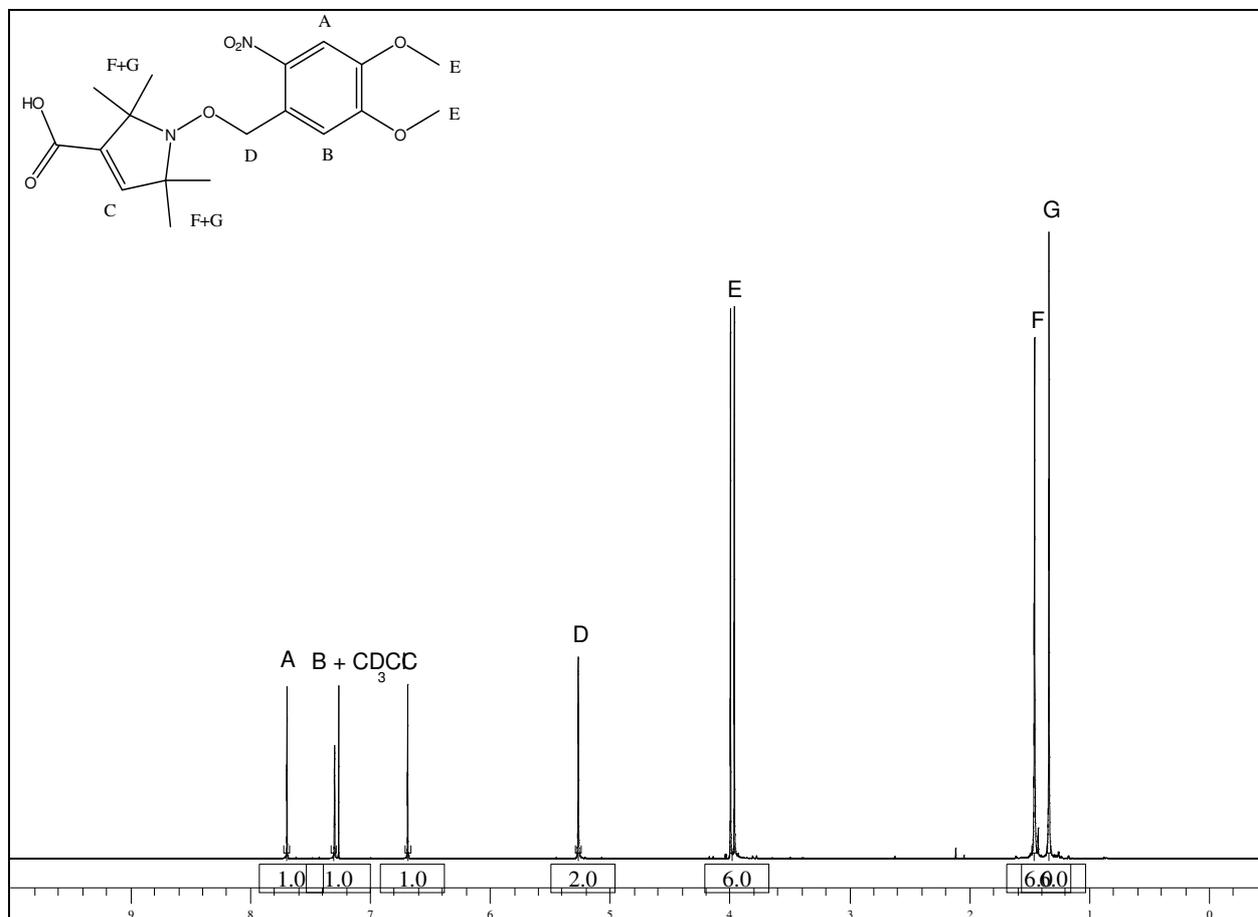
C.2 –  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von (3)



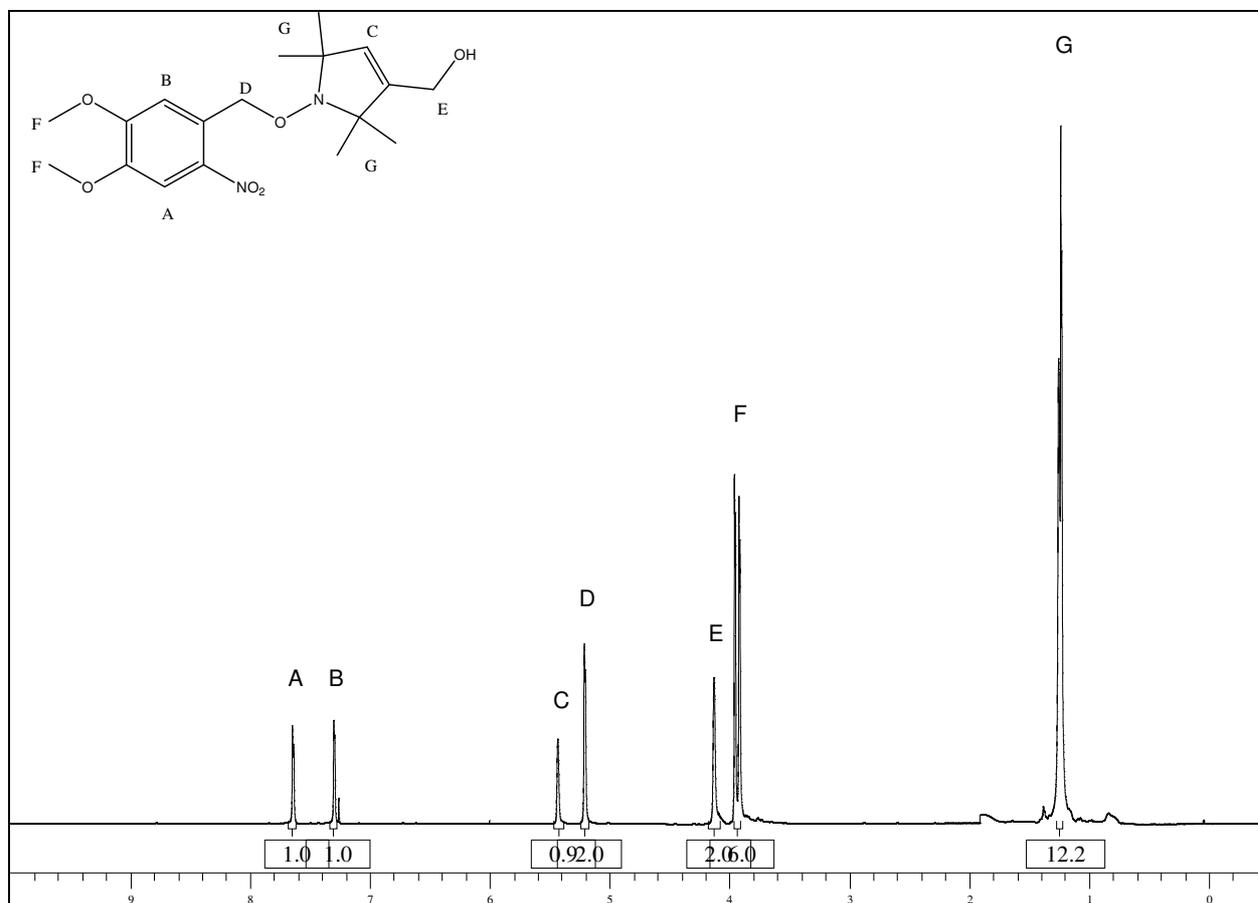
C.3 –  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von (**6**)



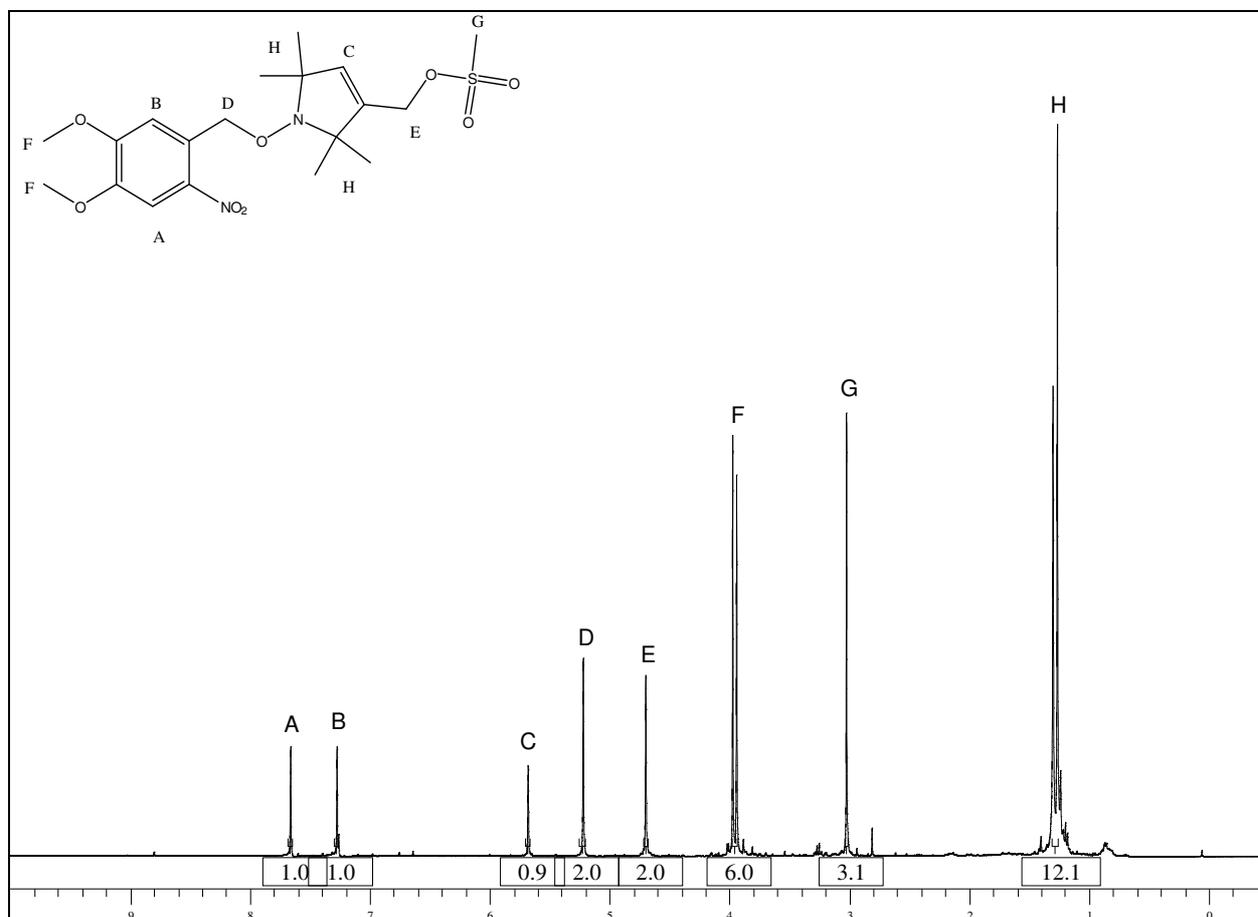
C.4 –  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von (7)



C.5 –  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von (8)



C.6 –  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von (9)



C.7 –  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von (11) :

