

**Chemische Synthese von Proteinen:
Generierung biologischer Aktivität ohne Nutzung des
zellulären Syntheseapparats**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund

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

eingereicht von

Dipl.-Chem. Christian F.W. Becker

aus Altena (Westf.)

Dortmund, März 2001

Eidstattliche Erklärung

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

Dortmund, den 27. März 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Mai 1998 bis März 2001 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung Physikalische Biochemie und bei Gryphon Sciences unter der Anleitung von PD Dr. M. Engelhard und Prof. Dr. R.S. Goody durchgeführt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. R.S. Goody**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. W. Kreiser**

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Ras-RBD-System.....	7
1.2. Die menschliche Thymidinmonophosphatkinase.....	10
2. Ziele dieser Arbeit.....	13
3. Experimenteller Teil – Materialien, Methoden und Synthesen.....	14
3.1. Chemikalien.....	14
3.2. Instrumentation.....	15
3.3. Proteinchemische Methoden.....	16
3.3.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	16
3.3.2. Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	16
3.3.3. Expression und Reinigung von C-terminal verkürztem H-Ras (p21c').....	17
3.3.4. Nukleotidaustausch an H-Ras (p21c').....	17
3.3.5. Herstellung von HeLa-Zellextrakten.....	18
3.3.6. Expression der menschlichen TMPK.....	18
3.3.7. Factor Xa-Verdau.....	19
3.4. Molekularbiologische Methoden.....	19
3.4.1. Zellanzucht.....	19
3.4.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	19
3.4.3. Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten.....	20
3.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA.....	20
3.4.5. Polymerase Kettenreaktion.....	20
3.4.6. DNA-Sequenzierung.....	20
3.4.7. Restriktion von DNA.....	21
3.4.8. Ligation von DNA.....	21
3.4.9. Transformation.....	21
3.5. Chemische Methoden.....	22
3.5.1. Synthese von N-Boc-L-(6,7-Dimethoxy-4-coumaryl)-alanin.....	22
3.5.2. Synthese von N-[Bis(methylthio)methylen]glycin-ethylester (1).....	22
3.5.3. Synthese von (2R)-N-{N-[Bis(methylthio)methyliden]glycyl}bornan-10,2-sultam (2).....	23
3.5.4. Synthese von 4-Chlormethyl-6,7-dimethoxycoumarin (3).....	24

3.5.5. Synthese von (2R)-N-{N-[Bis(methylthio)methyliden]-2-(6,7-dimethoxycoumaryl)alanyl}-bornan-10,2-sultam (4).....	24
3.5.6. Synthese von L-(6,7-Dimethoxy-4-coumaryl)-alanin (5).....	25
3.5.7. Synthese von N-Boc-L-(6,7-dimethoxy-4-coumaryl)-alanin (6).....	26
3.5.8. Synthese von N ² -Boc-N ³ -(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-L-2,3-diaminopropionsäure (7).....	26
3.5.9. Festphasensynthese von Peptiden.....	27
3.5.10. Entschützung und Abspaltung der Peptide.....	28
3.5.11. Aufreinigung der Peptide.....	29
3.5.12. Schutzgruppenabspaltung in Lösung.....	29
3.5.13. Chemische Ligation der Peptide.....	29
3.5.14. Ligation von chemisch synthetisierten Peptiden und biosynthetischen Proteinsegmenten.....	30
3.5.15. Immobilisierung der RBD.....	30
3.5.16. Peptidanalytik.....	30
3.5.17. Faltung der chemisch synthetisierten Proteine.....	31
3.6. Biophysikalische Methoden.....	32
3.6.1. Stopped flow Messungen.....	32
3.6.2. Fluoreszenzspektroskopie.....	32
3.6.3. Fluoreszenzlebensdauer messungen.....	32
3.6.4. CD-Spektroskopie.....	33
3.6.5. Gekoppelter, UV-spektroskopischer Enzymtest zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} für verschiedene TMPK-Proteine.....	33
4. Ergebnisse.....	35
4.1. Auswahl und Synthese der nicht-codierten, fluoreszierenden Aminosäuren.....	35
4.1.1. N ² -Boc-N ³ -Nitrobenzofurazan-L-2,3-diaminopropionsäure.....	35
4.1.2. N-Boc-L-(6,7-dimethoxy-4-coumaryl)-alanin.....	37
4.1.3. Fluoreszenzeigenschaften der Aminosäuren.....	38
4.1.4. Oberflächenimmobilisierung von Proteinen.....	39
4.2. Chemische Totalsynthese der modifizierten Ras-Bindungsdomäne von c-Raf1.....	41
4.2.1. Synthese von RBD(96-131).....	43
4.2.2. Synthese von RBD(51-95).....	46
4.2.3. Synthese von RBD(51-95)/L91NBD-Dap.....	47
4.2.4. Synthese von RBD(51-95)/L91Dmca.....	49
4.2.5. Synthese von RBD(96-131)/Histag.....	50

4.2.6. Synthese von RBD(96-131)/K(Lävulinsäure)L.....	52
4.2.7. Chemische Ligation der RBD-Peptide.....	53
4.3. Faltung und kinetische Charakterisierung der RBD-Proteine.....	58
4.3.1. Faltung der RBD-Proteine.....	58
4.3.2. Kinetische Charakterisierung der Wechselwirkung von chemisch synthetisierten RBD-Proteinen und H-Ras.....	59
4.4. Fluoreszenzeigenschaften der RBD/L91NBD-Dap und RBD/L91Dmca.....	65
4.4.1. RBD/L91NBD-Dap und RBD/L91NBD-Dap/Histag.....	65
4.4.2. RBD/L91Dmca.....	69
4.5. Immobilisierung der RBD/L91NBD-Dap/Histag auf Ni-NTA modifizierten Oberflächen.....	70
4.6. Chemische Totalsynthese von C-terminalen verkürztem H-Ras.....	77
4.6.1. Synthese von Ras(1-50).....	78
4.6.2. Synthese von Ras(51-117).....	79
4.6.3. Synthese von Ras(118-166).....	81
4.6.4. Chemische Ligation der Ras-Peptide.....	82
4.7. Faltung des Ras(1-166) und kinetische Charakterisierung des synthetischen Proteinsystems aus RBD/L91NBD-Dap und Ras(1-166).....	87
4.8. Semisynthese der C-terminal fluoreszenzmarkierten Proteine Ras und RBD....	90
4.8.1. Synthese des Ras/C191 _(Alexa 488) /His.....	91
4.8.2. Synthese der RBD/K137 _(Cy5) /His.....	95
4.8.3. Fluoreszenzeigenschaften von Ras/C191 _(Alexa 488) /His und RBD/K137 _(Cy5) /His.....	98
4.9. Semisynthese der Thymidinmonophosphatkinase (TMPK).....	100
4.9.1. Expression und Verdau des GST-TMPK Fusionsproteins.....	103
4.9.2. Synthese der N-terminalen Peptide.....	105
4.9.3. Ligation der chemisch synthetisierten Peptide und der biosynthetischen TMPKn`.....	106
5. Diskussion.....	112
5.1. Proteinsynthese.....	112
5.2. Faltung der Proteine	123
5.3. Die Fluoreszenzmarker.....	124
5.4. Kinetische und spektroskopische Charakterisierung der Proteine.....	126
5.5. Entwicklung eines Biosensors.....	133
6. Zusammenfassung.....	138
7. Literatur.....	140

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AP ₅ T	P ¹ -(5`-Adenosyl)-P ⁵ -(5`-thymidyl)-pentaphosphat
AS	Aminosäure(n)
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
Boc-ON	2-(tert-butyloxycarbonyloxyimino)-2-phenylacetonitril
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
cHex	Cyclohexyl
COSY	C-terminaler Thioester
d	Tag(e)
Dap	L-2,3-Diaminopropionsäure
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
Dde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl-
DIEA	Diisopropylethylamin
Dmca	L-6,7-(Dimethoxy-4-coumaryl)-alanin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenyl
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Erk	extrazellulär regulierte Kinase
ESI	Elektrosprayionisierung
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
FRET	Fluoreszenzresonanz Energie Transfer
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GppNHp	Guanosin-5`-(β,γ-imido)-triphosphat

GTP	Guanosintriphosphat
GdnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde(n)
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
His oder His-Tag	6 Histidinreste in Folge
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
i. Vak.	im Vakuum
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k_{ass}	Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation
k_{cat}	maximale Ratenkonstante bei mit zwei Substraten gesättigtem Enzym
K_D	Gleichgewichtskonstante
kD	Kilodalton
k_{diss}	Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
LDA	Lithiumdiisopropylamid
mant	2',3'-(N-methylantraniloyl)
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
Mat	N ¹ -Methyl-7-azatryptophan
MeCN	Acetonitril
MEK	MAPK/Erk-Kinase
M	relative Molekülmasse
MS	Massenspektrum
NBD-Dap	L-3-Nitrobenzofurazan-1,3-diaminopropionsäure
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
n'	N-terminal verkürzt
OD	Optische Dichte
Popop	1,4-Bis(5-Phenylloxazol-2-yl)benzol
Ras	H-Ras (abgeleitet von rat sarcoma)
PAM	Phenylacetamidomethyl

PCR	Polymerase Kettenreaktion
RBD	Ras-Bindungsdomäne von c-Raf1
RBD(ch)	chemisch synthetisierte RBD
RBD/H	Ras-Bindungsdomäne von c-Raf1 mit C-terminalem His-Tag
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>SOS</i>	<i>son of sevenless</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMPK	menschliche Thymidinmonophosphatkinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	<i>units</i>
wt	Wildtyp
Xan	Xanthyenyl
Z	Benzyloxycarbonyl
ϵ	Extinktionskoeffizient
ϕ	Quantenausbeute
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Excitationswellenlänge
τ	Fluoreszenzlebensdauer

Ein- und Dreibuchstabencode der 20 codierten 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

Mehr als 700 Aminosäuren wurden bisher in natürlichen Quellen, wie Bakterien, Pilzen, Algen oder anderen Organismen entdeckt. Sie existieren als Monomere oder sind Teile größerer Moleküle, wie Peptide oder Proteine (Barrett und Elmore, 1998).

Für die Proteinbiosynthese werden nur 20 Aminosäuren genutzt. Sie haben eine besondere Bedeutung, da sie in jedem lebenden Organismus die fundamentalen Bausteine für Peptide und Proteine bilden. Deshalb werden diese Aminosäuren auch proteinogene oder codierte Aminosäuren genannt. Peptide und Proteine, die nur aus codierten Aminosäuren aufgebaut sind, liefern bereits eine Vielzahl an Biopolymeren, deren Aufgaben von der hormonellen Aktivität kleiner Peptide bis zur strukturgebenden Funktion von Proteinen reicht.

Mit der Hilfe der Molekularbiologie gelingt es dem Menschen natürlich vorkommende Proteine zu verändern, in dem durch ortsgerichtete Mutagenese bestimmte Aminosäuren gegen andere ausgetauscht werden. Dadurch können neue Proteine bzw. Proteine mit anderer Funktion generiert werden, die Einsatz in der Medizin finden und es erlauben durch biophysikalische Messungen mehr über die Funktion dieses, oder wechselwirkender Proteine, zu lernen. Der Informationsfluss verläuft dabei von der DNA, die durch Mutation verändert werden kann, über RNA zum Ribosom, wo die Proteinsynthese stattfindet. Die Auswahl der austauschbaren Aminosäuren ist auf die genetisch codierten beschränkt, da nur sie durch Mutagenese zugänglich sind. Dies grenzt die Möglichkeit der Veränderung von Proteinen stark ein.

Für viele Fragestellungen wäre es wünschenswert, wenn mehr Möglichkeiten zur Modifikation von Proteinen zur Verfügung ständen. Ein Ansatz von Cornish und Schulz (1994) erlaubt es, die oben genannten Einschränkung zu umgehen und den Protein-syntheseapparat z.B. von *E. coli* zu nutzen, um in zellfreier Synthese nicht-codierte Aminosäuren in Proteine einzubauen. Grundlage dieser Methode ist die Suppression eines Stop-Codons durch eine chemisch aminoacylierte tRNA. Durch ortsgerichtete Mutagenese wird z.B. das Amber-Codon in der DNA bzw. mRNA des Zielproteins erzeugt und durch die semisynthetisch hergestellte tRNA supprimiert. Die tRNA, die das Stop-Codon erkennt, kann dabei mit einer beliebigen nicht-codierten Aminosäure beladen sein, die so in das Protein eingebaut wird. Auf diesem Weg wurden bereits zahlreiche nicht-codierte Aminosäuren in Proteine eingebaut, entweder durch zellfreie Synthese oder durch Suppression in bestimmten Organismen, wie *Xenopus* Oocyten (Dougherty, 2000;

Turcatti et al., 1999; Chung et al., 1993). Schwierigkeiten treten bei dieser Methode durch die labile Aminoacylbindung zwischen nicht-codierten Aminosäuren und tRNA auf, sowie durch die geringen Suppressionsraten für die Stop-Codons. Daraus resultieren sehr geringe Ausbeuten an Protein, die im ng- bis μg - Bereich liegen.

Um diese und andere Probleme der Proteinsynthese *in vivo* zu umgehen, wie die Herstellung cytotoxischer Proteine, sowie die heterologe Expression, die zu unlöslichen oder inaktiven Proteinen führt, kann heute die chemische Proteinsynthese genutzt werden. Eine Methode geht dabei auf die Arbeiten von Fischer zurück, der Peptide durch Verknüpfung von Aminosäuren in Lösung darstellte. Durch diese Methode wurde z.B. Insulin, das aus mehreren kurzen Peptidketten besteht, synthetisiert (Zahn, 1966). Eine andere Methode, die heute weit verbreitet ist, für die chemische Herstellung von Peptiden und Proteinen beruht auf den Arbeiten von Merrifield (1963), der mit der ersten Festphasensynthese von Peptiden den Weg für die chemische Totalsynthese von Proteinen ebnete (Merrifield, 1985). Sein Ziel, Proteine durch Festphasensynthese herzustellen, wurde bis vor wenigen Jahren jedoch nur für sehr kleine Proteine erreicht.

Die Synthese größerer Proteine bzw. Peptide mit einer Länge von mehr als 60 Aminosäuren ist bis heute sehr schwierig, da die entstehenden, einander sehr ähnlichen, Nebenprodukte die Aufreinigung erschweren (Sakakibara, 1999). Anfang der neunziger Jahre führte die Wiederentdeckung einer bereits bekannten Reaktion dazu, dass die Synthese von Proteinen mit bis zu 180 Aminosäuren möglich wurde (Dawson et al., 1994). Diese Reaktion beruht auf der Ausbildung einer Peptidbindung zwischen zwei chemisch synthetisierten Peptidsegmenten, wobei die Reaktion durch einen Thioester vermittelt wird (Abb. 1). Grundlage für diese Kopplung ist eine von Wieland schon 1953 beschriebene Reaktion. Voraussetzung ist das Vorhandensein eines Thioesters an der α -Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure des N-terminalen Peptids und eines Cys am N-Terminus des C-terminalen Peptids. Die Thiolgruppe des N-terminalen Cys greift den *in situ* erzeugten Phenylthioester an und es kommt zu einer Umesterung, wodurch die zwei Peptidsegmente in eine ideale räumliche Anordnung zueinander gelangen und der nukleophile Angriff der α -Aminogruppe des Cys auf den Thioester zur Ausbildung einer Amidbindung führt. Dieser S[?] N-Acylgruppentransfer stellt einen, unter den verwendeten Reaktionsbedingungen, irreversiblen Schritt dar, der die Reaktion in Richtung der über eine Amidbindung gekoppelten Peptide treibt. Diese Reaktion wird native chemische Ligation genannt und kann theoretisch, bei Verwendung passender

Schutzgruppenstrategien für die N-terminalen Cysteinreste, beliebig oft nacheinander durchgeführt werden. Dies würde den Zugang zu Proteinen beliebiger Größe eröffnen.

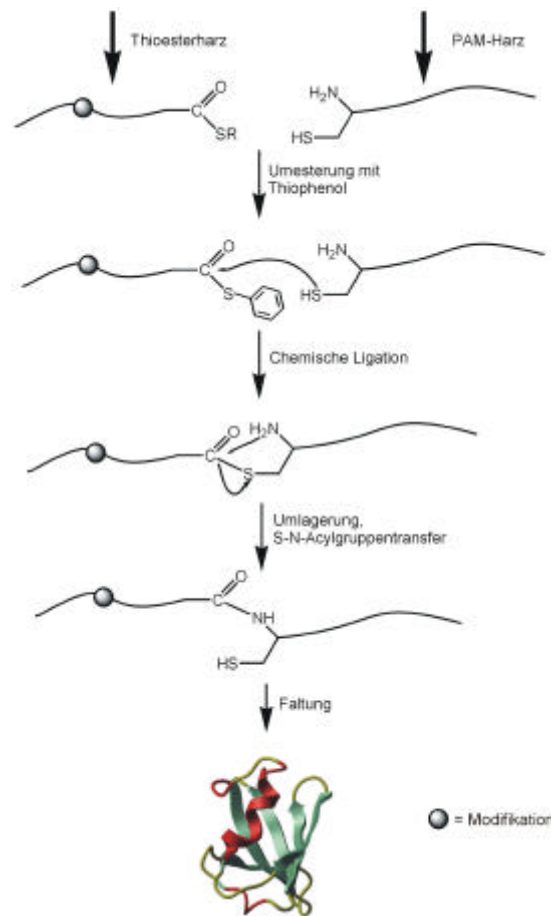


Abb. 1: Native chemische Ligation mit abschließender Faltung des Polypeptids.

Diese Methode weist aber auch fast 10 Jahre nach ihrer ersten Anwendung für die Synthese von Proteinen eine intrinsische Größenlimitierung auf, die auf der einen Seite durch die Festphasensynthese der benötigten Peptide und auf der anderen Seite durch die großen Verluste bei der Aufreinigung nach jedem Ligationsschritt festgelegt wird. Bei Proteinen, für deren Synthese mehr als 4 Ligationsschritte benötigt werden, ist die Ausbeute sehr gering und der Syntheseaufwand hoch. Deshalb ist bisher der Zugang durch diese Methode auf Proteine mit weniger als ca. 180 Aminosäuren beschränkt (Kochendoerfer und Kent, 1999).

Einen Weg die Größenlimitierung der oben beschriebenen Methode zu umgehen, lieferte die Entdeckung der Inteine in verschiedenen Organismen. Die Inteine ermöglichen es, dass der größte Teil eines Proteins durch Expression in *E. coli* hergestellt wird und nur der zu modifizierende Teil durch Peptidsynthese. Bei Inteinen handelt es sich um Polypeptide, die sich selbst aus einem Protein ausschneiden können und die

verbleibenden Proteinsegmente mit einer Peptidbindung verknüpfen (Cooper et al., 1993). Dieses Verhalten weist große Ähnlichkeit zum „*RNA-Splicing*“ auf und wird deshalb auch „*Protein-Splicing*“ genannt (Abb. 2).

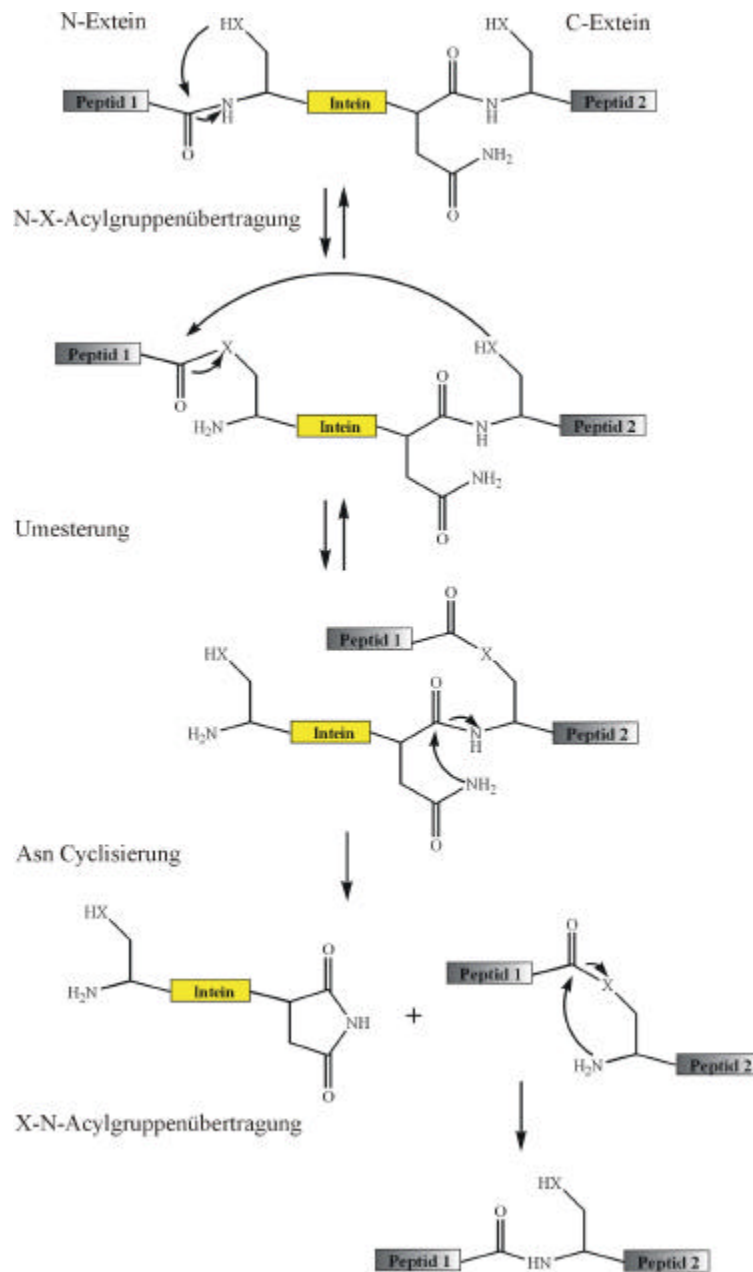


Abb. 2: Mechanismus des *Intein-Splicing* nach Noren et al. (2000). X = O oder S;

Der Mechanismus verläuft über eine Acylgruppenübertragung am N-terminalen Ende des Inteins, das ein Cys, Ser oder Thr aufweisen muss. Die anschließende Umesterungsreaktion wird durch die Struktur des Inteins begünstigt, die Peptid 1 und 2 in räumliche Nähe zueinander bringt. Die Cyclisierung des C-terminalen Asn des Inteins beendet das Herausschneiden und durch eine abschließende X? N-Acylgruppenübertragung werden

beide Peptide, durch eine Amidbindung, zu einem Protein verknüpft. Außerdem besitzen einige Inteine eine „*Homing Endonuklease*“-Aktivität, die für die Weiterverbreitung des Inteins sorgt. Die Endonuklease verursacht einen Doppelstrangbruch in Genen, die keine Kopie des Inteins besitzen und bei der Reparatur dieses DNA-Schadens wird die für das Intein kodierende DNA-Sequenz in diese Gene eingebaut. Auf diesem Weg sind Inteine am Informationsaustausch auf DNA-Ebene beteiligt. Es wurden bisher 102 verschiedene Inteine gefunden, die in allen drei Domänen des Lebens (Eubakterien, Archaea und Eukaryoten) auftreten¹.

Inteine können für die Generierung eines C-terminalen Thioesters oder eines N-terminalen Cys genutzt werden und auf diesem Weg für Reaktionen benutzt werden, die der nativen chemischen Ligation entsprechen. Dadurch gelingt die Kombination von biosynthetisch hergestellten Proteine bzw. Proteinsegmenten und chemisch synthetisierten Peptiden, oder genereller die Kombination von molekularbiologischen und chemischen Methoden.

Die synthetisierten Peptide können dabei am N-, C-Terminus oder zwischen zwei rekombinant hergestellten Proteinsegmenten eingebaut werden (Cotton und Muir, 1999). Diese Methode heißt „*Expressed Protein Ligation*“ und nutzt ein defektes Intein, das die Splicingreaktion nicht vollständig durchführen kann, aber in der Lage ist ein Intermediat mit einem C-terminalen Thioester zu bilden (Abb. 3).

¹ Aus „InBase“, die Intein Registrierung bei <http://www.neb.com/neb/inteins.html> (Stand: 12.01.01);

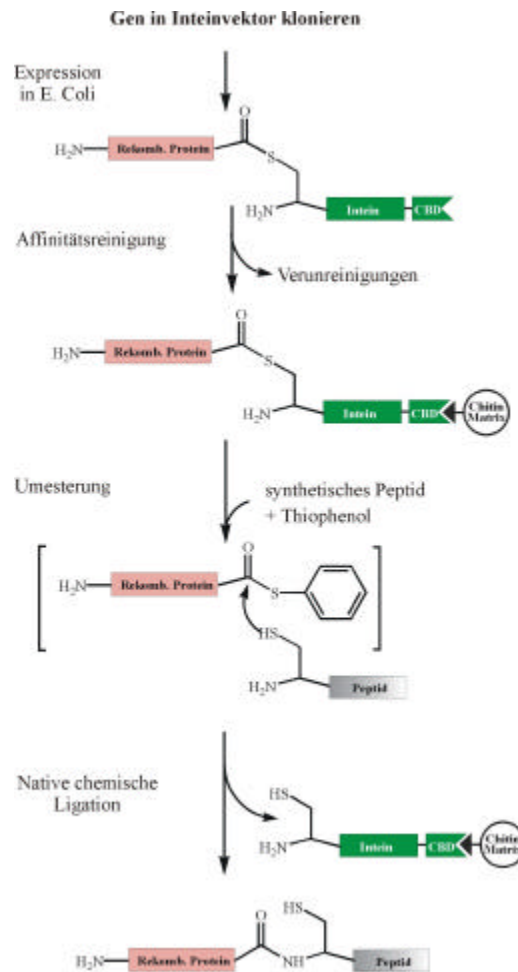


Abb. 3: Schematische Darstellung der „Expressed Protein Ligation“ nach Muir et al. (1998).

Der entstandene Thioester wird durch eine Umesterung mit einem Thiol vom Intein abgespalten. Geschieht dies in Anwesenheit eines synthetischen Peptids mit N-terminalen Cys kann eine native chemische Ligation stattfinden, die zur Verknüpfung des rekombinant hergestellten Proteins und des Peptids führt. Dabei ist das Intein über eine Chitin-Bindungsdomäne (CBD) an eine feste Matrix gebunden, wodurch die Aufreinigung erleichtert wird. Damit ist ein nahezu unbegrenzter Zugang zu semisynthetischen Proteinen jeder Größe und der Einbau beliebiger nicht-codierter Aminosäuren oder anderer Modifikationen, die auf chemischen Weg eingebracht werden können, möglich.

Mit Hilfe der beschriebenen Methode, wurden bereits zahlreiche Proteine chemisch synthetisiert oder semisynthetisch hergestellt. Dabei wurden nicht-codierte Aminosäuren eingebaut, die ein Signal, wie z.B. Fluoreszenzemission oder Isotopenmarkierung zur Verfügung stellen, das für biophysikalische Messungen genutzt werden kann (Cotton und Muir, 2000; Iakovenko et al., 2000; Blaschke et al., 2000). Des Weiteren kann die chemische Proteinsynthese den direkten Zugriff auf Proteine gewährleisten, deren Gene

im Rahmen von Genomsequenzierungsprojekten gefunden wurden. Hierbei ist die Identifikation der Funktion und Struktur dieser Proteine von großer Bedeutung. Für diese Aufgabe, d.h. die Untersuchung und Charakterisierung einer großen Anzahl an Proteinen stehen nur begrenzte Mittel zur Verfügung. Neueste Ansätze nutzen Proteinchips, bei denen Proteine über Affinitätstags oder über eine kovalente Bindung auf Oberflächen immobilisiert werden und bei denen die Funktion und Effektoren vieler Proteine identifiziert werden können (Zhu et al., 2000; McBeath und Schreiber, 2000). Der Nutzen von Oberflächen-immobilisierten Biopolymeren wird durch die frühe Anwendung der Biosensoren für *in vivo* Messungen in den sechziger Jahren belegt. Diese Biosensoren dienen zum Nachweis von Glucose, Lactat, Harnstoff und Glutamat/Glutamin. Alle diese Biosensoren basieren auf einem Enzym, das eine elektroaktive Verbindung bildet und eine elektrische Detektion ermöglicht (Wilson und Hu, 2000). DNA-Chips sind seit vielen Jahren die Grundlage für effiziente Methoden zur Identifikation von Mutationen oder zur Überprüfung von Genexpressionsniveaus (Persidis, 1998).

Die Entwicklung und Erforschung von Systemen zur Diagnose von Krankheiten oder zur Nutzung in Screening-Verfahren zur Identifikation von Wirkstoffen, die auf Proteinen basieren, ist eine wichtige Aufgabe der Biochemie. Dabei besitzt die gezielte Immobilisierung von Proteinen, die zur Detektion des Analyten dienen, ebenfalls große Bedeutung. Die Entwicklung von Protein-Chips steht jedoch noch am Anfang, obwohl es schon erste Ansätze gibt eine große Zahl verschiedener Proteine auf einer Oberfläche zu immobilisieren, um damit die Funktion dieser Proteine und ihrer Effektorproteine oder –moleküle zu identifizieren. Die Detektion der Wechselwirkung mit Substraten oder anderen Proteinen wird dabei mit Hilfe der Fluoreszenz oder durch radioaktive Markierung erreicht (MacBeath und Schreiber, 2000; Zhu et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Biosensor für aktiviertes H-Ras, der auf einer spezifisch immobilisierten und fluoreszenzmarkierten Ras-Bindungsdomäne (RBD) von c-Raf1 beruht, entwickelt werden.

1.1. Das Ras-RBD-System

Das H-Ras–c-Raf1-Proteinsystem ist ein wichtiges Zielsystem für die Entwicklung eines Biosensors, das gleichzeitig auch ein gutes Beispielsystem ist, da viele Eigenschaften der Wechselwirkung bereits erforscht sind. Die kleine GTPase H-Ras (189 Aminosäuren)

ist wichtig für die Signaltransduktion in Zellen und die Zellproliferation (Barbacid, 1987; Lowy und Willumsen, 1993). Sie ist ein Teil der mitogen aktivierten Proteinkinase-Kaskade (MAPK) (Burgering und Bos, 1995). Ras tritt in Zellen als ein membran-assoziiertes Protein auf, das über posttranslationale Farnesyl- oder/und Palmitoyl-Modifikationen an die Membran gebunden ist (Hancock et al., 1990). Die Struktur des Ras-Proteins wurde mit zwei verkürzten Formen des Proteins (166 und 171 Aminosäuren) durch Röntgenkristallographie erhalten (Scherer et al., 1989). Es wurde gezeigt, dass die C-terminal verkürzte Form des Ras-Proteins (Aminosäuren 1-166) ausreicht, um biologische Funktionen, wie die Bindung an die RBD und die Nukleotidbindung, zu gewährleisten (John et al., 1989). Einzige Ausnahme ist die Verankerung in der Plasmamembran, die über eine S-Farnesylierung und die Bildung eines Palmitinsäurethioesters am C-Terminus erfolgt (Resh, 1996). Einige biologische Funktionen kann Ras nur in dieser membran-assoziierten Form erfüllen, wie z.B. die Aktivierung des Effektorproteins c-Raf1. Die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade erfolgt über extrazelluläre Signale, wie z.B. Wachstumsfaktoren, die an transmembrane Rezeptoren binden (Abb. 4). Auf diesem Weg gelangt das Signal in das Zellinnere und mit Hilfe von Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), wie *SOS* wird Ras von der inaktiven GDP-Form in die aktivierte GTP gebundene Form überführt (Wittinghofer und Waldmann, 2000) (Abb. 5).

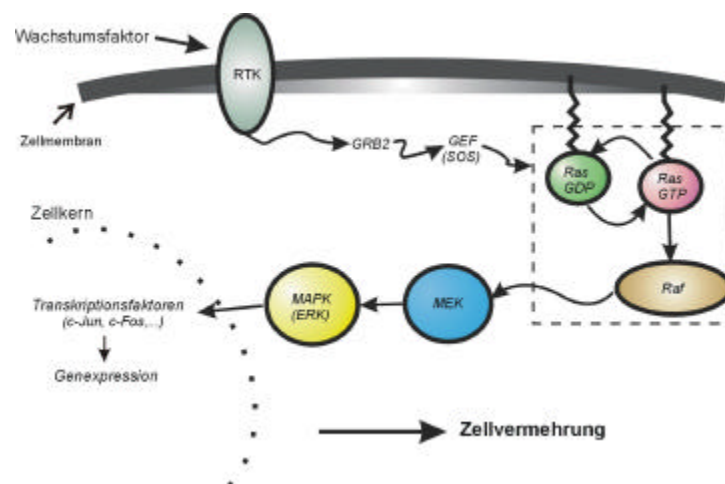


Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der MAPK-Signalkaskade. Die Ras-Raf-Wechselwirkung ist durch den gestrichelt gezeichneten Kasten hervorgehoben.

In diesem Zustand bindet Ras an Raf und aktiviert die Signalweiterleitung in das Zellinnere, was zur Genexpression und Zellvermehrung führt. Mutationen in Ras, die zu einer verlangsamten Hydrolyse des GTP, oder einer beschleunigten GDP-Freisetzung führen, treten in mehr als 30% aller menschlicher Krebstumore auf (Barbacid, 1987). Dies

macht Ras zum wichtigen Ziel für verschiedenste therapeutische und diagnostische Ansätze. Die Aktivierung des Raf-Proteins ist noch nicht vollständig verstanden, aber die Rekrutierung dieses Proteins an die Zellmembran durch das membran-assoziierte Ras spielt dabei eine wichtige Rolle. Des Weiteren sind andere Prozesse, wie allosterische Wechselwirkungen und Phosphorylierungen an der Aktivierung der Raf-Kinasefunktion beteiligt (Morrison und Cutler, 1997). Die Signalweiterleitung erfolgt so lange bis das Signal durch Hydrolyse des an Ras gebundenen GTP zu GDP abgeschaltet wird. Dieser Prozess wird durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) beschleunigt, da die intrinsische Hydrolyseaktivität des Ras so gering ist ($0,01 \text{ min}^{-1}$), dass die „Abschaltung“ der Signalweiterleitung ohne sie zu lange dauern würde (John et al., 1988).

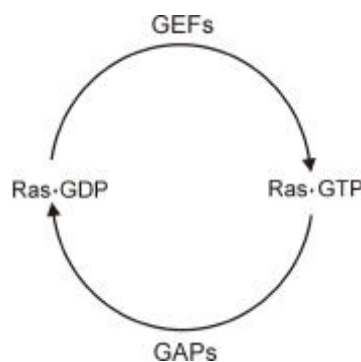


Abb. 5: Das Ras-Protein als molekularer Schalter. Wechsel zwischen dem aktivierten, GTP-gebundenen und dem inaktivem, GDP-gebundenem Zustand unter Einfluss der GTPase aktivierende Proteine (GAPs) und der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs).

C-Raf1 ist ein Protein, das aus 648 Aminosäuren besteht, wobei nur eine regulatorische Domäne aus dem N-terminalen Teil des Proteins, die aus 81 Aminosäuren (51-131) besteht für die Bindung an Ras-GTP benötigt wird (Voitek et al., 1993). Das Protein weist noch eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasefunktion auf und eine Zn^{2+} -bindende Cystein-reiche Domäne, die ebenfalls mit Ras wechselwirkt.

Die Struktur der Ras-bindenden Domäne (RBD) wurde durch NMR-Spektroskopie und im Komplex mit dem Ras-homologen Protein Rap1a und GppNHp aufgeklärt (Terada et al., 1999 und Nassar et al., 1995). Die RBD faltet sich unabhängig vom Rest des Raf-Proteins und zeigt eine Ubiquitin-Faltung.

Die Struktur der RBD im Komplex mit dem Ras-homologen Protein Rap1a-GppNHp erlaubte es eine geeignete Position in der RBD für den Einbau eines Fluoreszenzmarkers zu finden (Nassar et al., 1995). Die ausgewählte Position 91 liegt in der Nähe der Bindungsfläche zwischen RBD und Rap1a bzw. Ras (Abb. 6). Der Einbau eines

fluoreszierenden Trp-Analogons hat bereits gezeigt, dass die direkte Beobachtung des Bindungsprozesses in Stopped Flow-Untersuchungen möglich ist (Sydor et al., 1999).

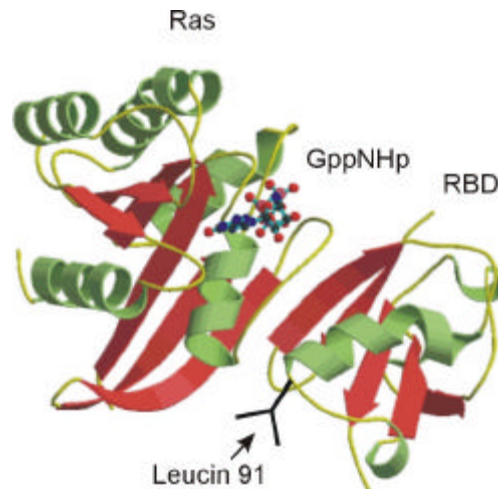


Abb. 6: Model des Ras-GppNHp-RBD-Komplexes basierend auf der Struktur mit Rap1a (Nassar et al., 1995). Das Leucin 91 ist geeignet für den Austausch gegen Fluoreszenzmarker zur Beobachtung der Bindung von Ras an die RBD.

1.2. Die menschliche Thymidinmonophosphatkinase

Ein weiteres wichtiges nukleotidbindendes Protein, das in dieser Arbeit untersucht werden soll, ist die menschliche Thymidinmonophosphatkinase (TMPK), die zur Klasse der Nucleosidmonophosphatkinasen (NMPKs) gehört und die Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP auf TMP katalysiert. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der „*de novo*“-Synthese von TTP und auch bei der Zurückgewinnung von TTP aus anderen Nucleotiden über den „*salvage pathway*“ in verschiedenen Organismen, wie *E. coli*, Hefe und dem Menschen. Die Übertragung der Phosphatgruppe verläuft vermutlich nach einem Random-Bi-Bi-Mechanismus, wie er schon für andere NMPKs beschrieben wurde (Li et al., 1996; Sheng et al., 1999).



Ohne Mg^{2+} tritt dabei keine katalytische Aktivität auf, denn dieses wird für die Koordination der Phosphatgruppen im Enzym benötigt.

Die TMPK ist ein essentielles Enzym für die Zellvermehrung, da nur unter Mithilfe der TMPK TTP synthetisiert werden kann, das als Baustein für die DNA und damit für die

Replikation des Genoms wichtig ist. Die TMPK ist als Homodimer aktiv und spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung nukleosidischer Medikamente für die Behandlung von Virus-Infektionen, wie HIV, und ist ein Ziel für die Entwicklung von Krebsmedikamenten. Die gezielte Hemmung der TMPK würde die TTP-Synthese und damit die Zellreplikation verhindern, was besonders die Vergrößerung und Verbreitung schnell wachsender Tumorzellen verhindern würde.

Die Bedeutung der TMPK für die Aktivierung nukleosidischer anti-HIV-Medikamente, wie z.B. 3'-Azido-2'-desoxythymidin (AZT), liegt darin, dass diese Substanzen ebenfalls zum Triphosphat phosphoryliert werden müssen, um dann als Substrat, z.B. für die reverse Transkriptase (RT), dienen zu können. Die pharmakologische Wirkung der nukleosidischen Medikamente beruht darauf, dass die DNA-Synthese durch das Enzym nicht fortgesetzt werden kann, da an der 3'-Position keine Hydroxylgruppe vorhanden ist. Eine ineffiziente Aktivierung kann die Wirksamkeit der nukleosidischen Medikamente stark herabsetzen und zur Anreicherung von toxischen Nebenprodukten führen.

Bei der Aktivierung des AZT hat sich die TMPK bei der Phosphorylierung vom AZTMP zum AZTDP als limitierender Faktor erwiesen, was zur Akkumulation von AZTMP führt. Nur ca. 4% des phosphorylierten AZT sind AZTDP oder AZTTP (Qian et al., 1994).

Die Verbesserung der Aktivierung bereits bekannter nukleosidischer RT-Hemmer erfordert eine Optimierung der zellulären Metabolisierung dieser Substanzen. Dies ist durch die sogenannte genetische Pharmakomodulation möglich, bei der durch Gentherapie ein Gen in Zellen eingebracht werden müsste, das für eine TMPK codiert, die selektiv nur AZTMP zu AZTDP phosphoryliert (Caruso und Klatzmann, 1994). Ansätze zur Verbesserung der AZT-Aktivierung auf Basis von Veränderungen der TMPK wurden bereits von Ostermann et al. (2000) vorgeschlagen. Alle Vorschläge beruhen auf Studien der 3-dimensionalen Strukturen der TMPKs aus Mensch, Hefe und *E. coli*.

Um diese Ansätze weiter zu verbessern ist ein vollständiges Verständnis des Enzyms und des Phosphatgruppenübertragungsmechanismus die Voraussetzung. Insbesondere die Funktion des Asp 15 im P-Loop der TMPK ist noch nicht verstanden. Aus den bekannten Kristallstrukturen kann geschlossen werden, dass diese Aminosäure über ihre Seitenkettencarboxylgruppe eine Wechselwirkung mit der 3'-Hydroxylgruppe des TMP ausbildet. Diese Wechselwirkung, oder eine andere Wechselwirkung dieser Gruppe, ist für die katalytische Aktivität essentiell, da Mutationsstudien, bei denen das Asp 15 gegen andere codierte Aminosäuren ausgetauscht wurde, zeigen, dass diese Mutanten keine katalytische Aktivität aufweisen (Brundiers et al., 1999). Der Austausch von bestimmten

Aminosäuren im katalytischen Zentrum gegen nicht-codierte Aminosäuren, wie z.B. fluoreszierende Aminosäuren, die eine direkte Beobachtung der Nukleotidbindung erlauben, oder ein L-3,3-Difluoraspartat, das durch den veränderten pK_a -Wert der Seitenkettencarboxylgruppe Studien über den katalytischen Mechanismus erlaubt, würden dieses Verständnis verbessern.

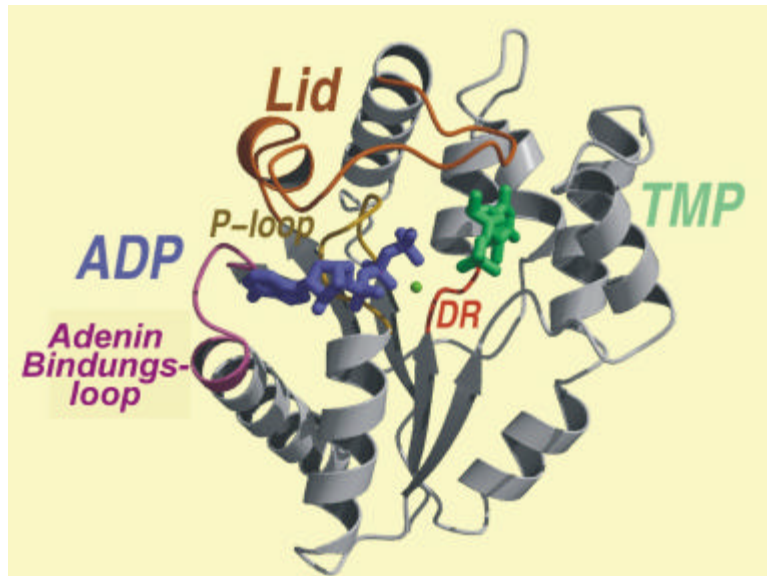


Abb. 7: Struktur der TMPK nach Ostermann et al. (2000). Das DR-Motiv und insbesondere das Asp96 ist an der Positionierung des katalytischen Mg^{2+} (grün) beteiligt. P-Loop, Lid und Adenin-Bindungsloop sind drei Sequenzmotive, die in Abhängigkeit von den zwei gebundenen Substraten, wie z.B. TMP und ADP, Konformationsänderungen vollziehen.

2. Ziele dieser Arbeit

Die Modifikation von nukleotidbindenden Proteinen und ihrer Effektoren, am Beispiel des H-Ras, der Ras-Bindungsdomäne (RBD) von c-Raf1 und der menschlichen Thymidinmonophosphatkinase (TMPK), durch die Kombination chemischer und biologischer Methoden ist Ziel dieser Arbeit. Dabei soll ein Detektionssystem für aktiviertes Ras, das auf einer fluoreszenzmarkierten und immobilisierten RBD beruht, entwickelt werden. Dies würde eine schnelle Methode zur Bestimmung von erhöhten Ras-GTP-Konzentrationen in Zellen darstellen, die in der Tumordiagnostik eingesetzt werden kann. Der Einbau von nicht-codierten Aminosäuren, wie Fluoreszenzmarkern, in die Zielproteine soll während der Peptidsynthese an festen Trägern erfolgen. Die Verknüpfung von verschiedenen Peptidsegmenten soll durch Ligation unter Knüpfung einer Peptidbindung erreicht werden. Mit Hilfe der fluoreszenzmarkierten Proteine sollen ebenfalls Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden, wobei auch der Einfluss von nicht-codierten Aminosäuren auf diese Wechselwirkung festgestellt werden kann.

Des Weiteren soll das C-terminal verkürzte Ras-Protein durch chemische Totalsynthese hergestellt werden, um einen Weg für die nahezu beliebige Modifikation dieses Proteins zu eröffnen. Dies wäre auch ein erster Schritt zur möglichen Entwicklung eines Verfahrens zur Suche nach Inhibitoren der Ras-RBD-Wechselwirkung, das auf zwei fluoreszenzmarkierten Proteinen beruht, oder zur weiteren Untersuchung des GTP-Hydrolysemechanismus. Dies könnte z.B. mit Hilfe von FTIR-Messungen durch Einbau ¹³C-markierter Aminosäuren, oder durch Veränderung der pK_a-Werte von katalytisch aktiven Seitenkettenfunktionalitäten geschehen. Ähnliche Möglichkeiten für mechanistische Untersuchungen durch Veränderungen bzw. direkte Beobachtung der Nukleotidbindungsdomäne sollen durch die semisynthetische Herstellung der TMPK geschaffen werden. Die TMPK soll dazu durch eine Kombination der Festphasensynthese von Peptiden und der biosynthetischen Herstellung von Proteinsegmenten dargestellt werden.

3. Experimenteller Teil – Materialien, Methoden und Synthesen

3.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad puriss. p.a, p.a oder molekularbiologische Reagenzien und wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von folgenden Firmen bezogen: Aldrich (Heidenheim), Anaspec (San Jose), Baker (Griesheim), Bachem (Heidelberg), Bio-Rad (München), Burdick & Jackson (Muskegon), Campro Scientific (Emmerich), Fluka (Neu-Ulm), Gerbu Biotechnik (Gaiberg), Halocarbon (River Edge), ICN (Aurora), Matheson (Newark), Merck (Darmstadt), Novabiochem (Schwalbach), Peptides International (Louisville), Riedel-de Häen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Stephens Scientific (Riverdale).

Das polymere Trägermaterial für die Festphasensynthese der Peptide wurde von Applied Biosystems (Foster City) und Novabiochem (Schwalbach) bezogen.

Für die Immobilisierungsexperimente wurden Ni^{2+} -NTA-beschichtete Mikrotiterplatten (96 wells) der Firma Qiagen (Hilden) und Pierce (Bonn) benutzt.

Der 1kb DNA-Molekulargewichtsstandard stammte von GIBCO BRL (Eggenstein).

Die Restriktionsenzyme wurden von Pharmacia (Uppsala) und New England Biolabs (Schwalbach) erhalten.

Das Caseinhydrolysat und der Hefeextrakt für die Zellanzucht wurde von GIBCO BRL (Eggenstein) bezogen.

RNaseA und die Protease Inhibitoren stammten von Boehringer (Mannheim).

T4 DNA Ligase wurde von GIBCO BRL (Eggenstein) geliefert.

Für die Polymerase Kettenreaktion, sowie für die DNA-Sequenzierung wurden die Reagenzien von Pharmacia (Uppsala) und Applied Biosystems (Weiterstadt) erhalten.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und die Reinigung von Plasmiden wurde mit Hilfe von Kits der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt.

Alle Angaben in Prozent für die verwendeten Puffer und Lösungen sind Gewichtsprozent bei Feststoffen und Volumenprozent bei Flüssigkeiten.

3.2. Instrumentation

Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit einem Mikrofluidizer M-110S der Firma Microfluidics Corporation (Newton).

Polymerase Kettenreaktionen wurden in einem OmniGene Temperature Cycler mit Deckelheizung und in-tube Temperaturkontrolle der Firma Hybaid (Heidelberg) durchgeführt.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte mit dem Mini-Protean II-System der Firma Biorad.

Automatisierte Peptidsynthese erfolgte mit dem 430 A Peptid Synthesizer von Applied Biosystems.

Hochleistungsflüssigchromatographie wurde mit Anlagen der Firmen Beckman (System Gold) und Rainin durchgeführt. Die verwendeten Säulen stammten von Vydac (Temecula), Macherey-Nagel (Düren) und Bischoff (Leonberg).

Für UV-VIS-Absorptionsmessungen wurde ein Lambda 9 UV/VIS/NIR Spektrophotometer der Firma Perkin Elmer benutzt.

Die Fluoreszenzmessungen in Lösung wurden am Aminco-Bowman Series 2 Lumineszenzspektrometer der Firma SLM-AMINCO (Rochester) durchgeführt.

Die Fluoreszenzmessungen auf der Oberfläche wurden mit dem Fluoroskan Ascent FL-Gerät von Labsystems durchgeführt.

Für die Fluoreszenzlebensdauer-messungen wurde ein ISS K2 Multifrequency Phase Fluorometer benutzt.

Die CD-Spektren wurden am J-710 Spektropolarimeter der Firma Jasco (Groß-Umstadt) gemessen.

Für die Stopped-flow-Messungen wurde das SF-61MX Multi Mixing Stopped-flow-System von Hi-Tech verwendet.

Die Massenspektren wurden mit einem API III Plus Massenspektrometer von Perkin Elmer SCIEX Instruments (Thornhill), einem LCQ Massenspektrometer von Finnigan (Bremen), oder einem Voyager-DE Pro MALDI-Massenspektrometer von Perseptive Biosystems (Weiterstadt) gemessen.

Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit einem AMX 500-Spektrometer der Firma Bruker (Karlsruhe) mit DMSO-d_6 , CDCl_3 oder D_2O als Lösungsmittel aufgenommen. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte durch die Lösungsmittelsignale.

3.3. Proteinchemische Methoden

3.3.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm des Farbstoffs Coomassie Blue G-250 bei Bindung an Proteine. Abhängig von der Proteinkonzentration (0,5 – 3 mg/ml) wurden 1 – 10 µl Proteinlösung mit Wasser auf 100 µl verdünnt und dann mit Bradford-Reagenz auf 1000 µl aufgefüllt. Nach 10 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer Rinderserumalbumin-Eichreihe als Standard berechnet.

3.3.2. Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Trennung von Proteinen nach apparentem Molekulargewicht wurden 1 mm dicke Vertikalgele nach Laemmli (1970) benutzt. Es wurden Minigelkammern der Firma BioRad verwendet. Die Proteine wurden in SDS-haltigem Probenpuffer (2% SDS, 10% Glycerin, 62 mM Tris/HCl, 5% β-Mercaptoethanol, 0,001% Bromphenolblau, pH 6,8) aufgenommen und falls nicht anders beschrieben bei 90°C hitzedenaturiert. Zur Fällung von geringen Proteinmengen oder zur Abtrennung von störenden Salzen wurden 10% TCA oder 4-6 Volumenäquivalente Aceton bei 4°C zugegeben. Das abzentrifugierte Präzipitat wurde gewaschen und anschließend in Probenpuffer (2,5 mM Tris·HCl, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerol, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,001% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Als Molekulargewichtstandard für Proteine diente eine Mischung aus Phosphorylase b (94 kD), Rinderserumalbumin (67 kD), Ovalbumin (43 kD), Carboanhydrase (30 kD), Trypsininhibitor (20,1 kD) und Lysozym (14,4 kD) von BioRad (München). Nach der Gelelektrophorese bei konstanter Stromstärke (40 mA pro Gel) wurden die Gele mit dem Farbstoff Coomassie gefärbt. Der nicht an die aufgetragenen Proteine gebundene Farbstoff wurde mit Entfärbelösung entfernt.

Für die Herstellung der Gele wurden folgende Lösungen verwendet:

	Sammelgellösung für 10 Gele mit 4 % Acrylamid	Trenngellösung für 10 Gele mit 15 % Acrylamid
Acrylamid / N,N'-Bisacrylamid (30 %)	5 ml	40 ml
H ₂ O	17,5 ml	20 ml
Trenngelpuffer	-	20 ml
Sammelgelpuffer	7,5 ml	-
APS (10 %)	240 µl	400 µl
TEMED	30 µl	40 µl

Trenngelpuffer: Für 1 l; 4fach konzentriert; 181,69 g Tris/HCl, 4 g SDS, pH 8,8.

Sammelgelpuffer: Für 1l; 4fach konzentriert; 60,56 g Tris/HCl, 4 g SDS, pH 6,8.

Elektrophoresepuffer: Für 10 l; 10fach konzentriert; 302,8 g Tris/HCl, 1441 g Glycin, 100g SDS, pH 8,3.

Färbelösung: 15 % Coomassie Blue in Entfärbelösung I.

Entfärbelösung I: Für 5 l; 2 l H₂O, 2 l Ethanol, 1 l Essigsäure.

Entfärbelösung II: 10 % Essigsäure in H₂O.

3.3.3. Expression und Reinigung von C-terminal verkürztem H-Ras (p21c')

H-Ras (p21c') wurde nach der von Tucker et al. (1986) beschriebenen Methode exprimiert und gereinigt. Für alle kinetischen Messungen wurde Ras in Puffer A (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTE, pH 7,4) verwendet und bei der Oberflächenbeladung in Puffer B (64 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7,4).

3.3.4. Nukleotidaustausch an H-Ras (p21c')

Der Austausch von an Ras gebundenem GDP gegen GppNHp oder GTP wurde nach der Vorschrift von John et al. (1990) durchgeführt, wenn nicht anders erwähnt..

3.3.5. Herstellung von HeLa-Zell-Extrakten

Die HeLa-Zellen wurden in Eagle Medium von Dulbecco mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung gezogen. Zur Herstellung der Zellextrakte wurden die Zellen abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT) und mit einem Puffer aus 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl und 5 mM MgCl₂ bei pH 7,4 gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Behandlung mit Ultraschall. Direkt nach der Lyse wurde ein EDTA-freies Gemisch aus Proteasehemmern zugegeben.

3.3.6. Expression der menschlichen TMPK

Für die Überexpression der menschlichen TMPK/R200A-Mutante, die im weiteren TMPK genannt wird, mit Factor Xa-Schnittstelle wurden *E.coli*(DE3)-Zellen, die mit einem für die TMPK als GST-Fusionsprotein kodierenden, rekombinanten Plasmidvektor (pGexRB) transformiert waren, verwendet (modifiziert nach Brundiers et al., 1999). Die Zellen wurden in 2TY-Medium mit 100 µg / ml Ampicillin als Antibiotikum bei 37°C und ca. 200 Upm im Schüttler gezüchtet. Eine Vorkultur wurde mit 2TY-Medium auf eine OD_{578 nm} von 0,06 verdünnt und nach ca. 3 h bei 37°C im Schüttler, bei einer OD_{578 nm} von 0,6, mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Drei Stunden nach Induktion wurden die Zellen geerntet, wozu die Gesamtkultur für 30 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Danach wurden die Zellen in Puffer 1 (150 mM KCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10% Glycerin, pH 7,5) resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde mit Puffer 2 (150 mM KCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert. Die frei gewordene DNA wurde mit DNase I (30 min bei 4°C) abgebaut. Dann wurden die Zellen in einem Microfluidizer lysiert. Das Lysat wurde 30 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert und die cytoplasmatische Fraktion wurde verworfen. Das erhaltene Pellet wurde mit Puffer 3 (7,5 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5) bei 4°C behandelt, um das in *inclusion bodies* exprimierte GST-TMPK-Protein zu lösen. Nach 4 h wurde erneut wie oben zentrifugiert und der Überstand wurde mit Puffer 4 (100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM CaCl₂, pH 8,0) auf 180 mM Harnstoff verdünnt.

3.3.7. Factor Xa-Verdau

Das GST-TMPK-Protein in Puffer 4 wurde auf ein Volumen von 25 ml auf-konzentriert und dann zusammen mit Glutathion-Sepharose-Matrix für 1 h bei 4°C geschüttelt. Danach wurde das Gemisch bei 1000 x g für 15 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Matrix wurde dann in 8 ml Puffer 4 mit 150 mM Harnstoff resuspendiert und es wurden 30 µl Factor Xa-Lösung (1 mg/ml) zugegeben. Der Verdau wurde nach ca. 22 h ständigem Schütteln bei RT beendet. Die Matrix und die unlösliche TMPKn' wurden abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Die in Puffer 4 unlösliche TMPKn' wurde in Puffer 5 (6M Guanidinium-Hydrochlorid, 100 mM NaPi, pH 7,0) gelöst.

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Zellanzucht

Die *E. coli* Bakterien wurden in 2TY-Medium (16 g Casein-hydrolysat, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1000 ml H₂O, PH 7,2) gezüchtet. Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wiesen nur Ampicillinresistenz auf. Aufgrund dessen wurden 100 µg Ampicillin pro ml Medium zur Selektion genutzt. Die Zellvermehrung wurde durch Trübungsmessung mit einem Spektrometer bei 578 nm kontrolliert.

3.4.2. Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde durch horizontale Gelelektrophorese analysiert und aufgetrennt. Hierzu wurden Gele mit 1-2 % Agarose in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 0,9 mM EDTA, pH 8,9) verwendet. Die Färbung der DNA-Banden erfolgte durch Zugabe von Ethidiumbromid-Lösung (0,6 mg/l). Die Proben wurden zur Analyse in Probenpuffer aufgenommen (TBE-Puffer, 10% Ficoll, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol).

3.4.3. Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht (302 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction–Kit von Qiagen.

3.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mit einem Kit von Qiagen durchgeführt. Abweichend von der Vorschrift des Herstellers wurde der RNaseA-Verdau vor dem Auftragen des Lysats auf die Anionenaustauschersäule durch Zugabe von 10 µg/ml RNaseA und einstündiges Inkubieren bei RT durchgeführt. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde außerdem zusätzlich mit Ethanol gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen.

3.4.5. Polymerase Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion durchgeführt (Mullis und Faloona, 1987). 10 ng der DNA-Matrize, 10 pmol beider Primer, 5 nmol jedes dNTPs und 1 U *Taq* Polymerase wurden in einem 50 µl Ansatz verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit Deckelheizung und „in tube“-Temperaturkontrolle durchgeführt. Die optimale Hybridisierungstemperatur der Primer wurde über die Basenzusammensetzung berechnet (Suggs et al., 1981). 3'-dAMP-Überhänge wurden durch Inkubation mit 1 U Klenow-Fragment der DNA Polymerase I für 15 min bei 37°C entfernt (Clark, 1988).

Mutationen wurden durch PCR mit der „Overlap Extension“-Methode eingeführt (Ho et al., 1989)

3.4.6. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem „ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ von Applied Biosystems durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit einem ABI 373 DNA Sequenzierungsapparat von Applied Biosystems.

3.4.7. Restriktion von DNA

Analytische Ansätze wurden mit 200 ng Plasmid-DNA und den jeweiligen Restriktionsenzymen in einem 10 µl Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert.

3.4.8. Ligation von DNA

Zur Ligation von DNA wurden normalerweise 100 ng des linearisierten Vektors und ein dreifacher Überschuss des Fragments mit 1 U T4 DNA Ligase in 20 µl Ligasepuffer (50 mM Tris·HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% (w/v) PEG8000, pH 7,6) über Nacht bei RT inkubiert. Die Ligase wurde durch 20minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert und der Ansatz mit H₂O (1:3)verdünnt.

3.4.9. Transformation

Für die Transformation von *E. coli* Bakterien mit Plasmid-DNA wurde die Elektroporation verwendet (Dower et al., 1988). 75 µl einer 10% Glycerinlösung mit kompetenten Zellen und 20 µl des verdünnten Ligationsansatzes wurden zusammengegeben und in eine Elektroporationsküvette gefüllt. Bei einem Elektrodenabstand von 2 mm wurde mit 1,5 kV, einem Widerstand von 800 Ω und einer Kapazität von 25 µF eine elektrische Entladung mit einer Zeitkonstante von 11 ms durchgeführt. Die Ansätze wurden dann in 1ml Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Die Selektion erfolgte durch Inkubation der transformierten Zellen auf Ampicillin-haltigen Agar-Platten.

3.5. Chemische Methoden

3.5.1. Synthese von N-Boc-L-(6,7-Dimethoxy-4-coumaryl)alanin

Die Synthese von N-Boc-L-(6,7-Dimethoxy-4-coumaryl)alanin erfolgte nach der modifizierten Methode von Bennett et al. (1998).

3.5.2. Synthese von N-[Bis(methylthio)methylen]glycin-ethylester (1)

5 g Glycinethylesterhydrochlorid (35,8 mmol) wurden mit 2,3 ml Kohlenstoffdisulfid (38,1 mmol) in 36 ml Chloroform suspendiert. Dazu wurden langsam 10,5 ml Triethylamin (TEA) (75,2 mmol) gegeben. Die Temperatur lag dabei zwischen 20 und 40°C. Die Reaktionslösung färbte sich bei Zugabe des TEA gelblich und das Hydrochlorid ging in Lösung. Es wurde 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 2,5 ml Iodmethan (39,4 mmol) so zugetropft, daß die Lösung schwach siedete und es wurde eine weitere Stunde unter Rückfluß erhitzt.

Die abgekühlte Reaktionslösung wurde 2mal mit je 20 ml Wasser gewaschen und die organische Phase wurde bis zur Trockene eingengt. Restliche Triethylammoniumhalogenide wurden durch Aufnehmen in 25 ml Diethylether und 2maligem Waschen mit jeweils 10 ml Wasser entfernt.

Ausbeute (Rohprodukt): 6,45 g = 33,4 mmol = 93% d. Th. bezogen auf Glycinesterhydrochlorid;

Das Rohprodukt wurde in 25 ml Aceton (trocken) gelöst und mit 7,3 g Kaliumcarbonat (wasserfrei) gerührt. Dazu wurden langsam 2,7 ml Iodmethan (43 mmol) getropft und 2 h unter Rückfluß erhitzt. Danach wurden nochmal 200 µl Iodmethan zugegeben und es wurde weitere 30 min unter Rückfluß erhitzt.

Nach dem Abkühlen wurde das Kaliumcarbonat abfiltriert und mit 10 ml Aceton gewaschen. Das Aceton wurde abdestilliert und der Rückstand in 25 ml Diethylether aufgenommen und 2mal mit je 10 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet. Das Natriumsulfat wurde abfiltriert und der Ether am Rotationsverdampfer entfernt.

Der ölige Rückstand wurde im Hochvakuum destilliert. Das Produkt wurde bei 78-80°C Kopftemperatur erhalten.

Ausbeute: 5,70 g (27,5 mmol) = 77% bezogen auf Glycinesterhydrochlorid

$C_7H_{13}NO_2S_2$: MW 207,3 g/mol

d_H (in $CDCl_3$; 500 MHz): 1,26 ppm (t, 3H, CH_2-CH_3); 2,41 ppm (s, 3H, SCH_3); 2,53 ppm (s, 3H, SCH_3); 4,20 ppm (q, 2H, CH_3-CH_2-); 4,20 ppm (s, 2H, $N-CH_2-CO$);

d_C (in $CDCl_3$): 14,2 ppm (s, 1C, CH_2-CH_3); 14,6 ppm (s, 1C, SCH_3); 14,9 ppm (s, 1C, SCH_3); 54,2 ppm (s, 1C, $N-CH_2-CO$), 60,9 ppm (s, 1C, CH_3-CH_2-); 163,2 ppm (s, 1C, $C=N$); 170,3 ppm (s, 1C, $C=O$);

3.5.3. Synthese von (2R)-N-{N-[Bis(methylthio)methyliden]-glycyl}bornan-10,2-sultam (2)

0,95 g (2R)-Bornan-10,2-sultam (4,4 mmol) wurden unter Argon in 10 ml Toluol (trocken) suspendiert. Dazu wurde 2,7 ml Trimethylaluminium (1,2 eq einer 2 M-Lösung in Hexan, 5,3 mmol) bei RT getropft. Die resultierende klare Lösung wurde 15-30 min weitergerührt. Zu der Lösung wurden 1,3 g (1) (6,3 mmol) in 5 ml Toluol getropft.

Anschließend wurde 24 h bei 50-55°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf Eis gekühlt, um anschließend 5 ml MeOH zuzugeben. Nach 30 min wurden 5 ml Wasser hinzugegeben und 1 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde durch eine Glasfritte (Pore 3) filtriert und 3mal mit je 10 ml Essigsäureethylester gewaschen. Das Filtrat wurde über $MgSO_4$ getrocknet.

Das $MgSO_4$ wurde abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Öl wurde an Kieselgel (Mesh 60-200) mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten von 97:3 auf 95:5 (v/v) als Eluent chromatographiert.

Ausbeute: 1,4 g (3,9 mmol) = 88%, bezogen auf (1);

$C_{15}H_{24}N_2O_3S_3$: MW 376,5 g/mol

d_H (in $CDCl_3$; 500 MHz): 0,90 ppm (s, 3H, $C-CH_3$); 1,10 ppm (s, 3H, $C-CH_3$); 1,26-1,39 ppm (m, 2H, CH_2); 1,80-1,88 ppm (m, 3H); 2,00-2,22 ppm (2H); 2,37 ppm (s, 3H, SCH_3); 2,49 ppm (s, 3H, SCH_3); 3,36-3,45 ppm (dd, 2H, $CO-CH_2$); 3,84-3,87 ppm (dd $J = 7,7$ Hz, 1 H, CHN); 4,55-4,64 ppm (dd $J = 18$ Hz, SO_2CH_2);

d_C (in $CDCl_3$): 15,3 ppm (s, 1C, $C-CH_3$); 15,7 ppm (s, 1C, $C-CH_3$); 20,6 ppm (s, 1C, SCH_3); 21,5 ppm (s, 1C, SCH_3); 27,1 ppm; 32,5 ppm; 39,0 ppm; 45,3 ppm; 48,5 ppm; 49,6 ppm; 53,5 ppm; 56,1 ppm; 65,9 ppm; 164,9 ppm; 168,9 ppm;

3.5.4. Synthese von 4-Chlormethyl-6,7-dimethoxycoumarin (3)

7,5 g 3,4-Dimethoxyphenol (49 mmol) wurden in 250 ml Toluol (trocken) suspendiert. Dazu wurden 6,6 ml 4-Chloracetessigsäureethylester (49 mmol) und 4,9 g Amberlyst 15 Ionenaustauscher-Perlen gegeben.

Das Reaktionsgemisch wurde 20 h unter Rückfluß am Wasserabscheider erhitzt. Danach wurde die Lösung zur Abtrennung des Ionenaustauschers heiß filtriert. Das Produkt fiel beim Abkühlen aus und der Feststoff wurde mit Hilfe einer Glasfritte (Porengröße 4) abgetrennt und aus insgesamt 1 l Ethanol umkristallisiert. Danach wurde das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 8,1 g (32 mmol) = 65% bezogen auf 3,4-Dimethoxyphenol;

$C_{12}H_{11}ClO_4$: MW 254,6 g/mol

d_H (in $CDCl_3$; 500 MHz): 3,93 ppm (s, 3H, OCH_3); 3,94 ppm (s, 3H, OCH_3); 4,61 ppm (s, 2H, CH_2-Cl); 6,39 ppm (s, 1H, Ar); 6,85 ppm (s, 1H, Ar); 6,99 ppm (s, 1H, Ar);

d_C (in $CDCl_3$): 41,6 ppm (s, 1C, CH_2-Cl); 56,4 ppm (s, 1C, OCH_3); 56,5 ppm (s, 1C, OCH_3); 100,4 ppm; 104,8 ppm; 109,8 ppm; 113,1 ppm; 146,4 ppm; 149,3 ppm; 150,0 ppm; 153,2 ppm; 160,9 ppm (s, 1C, C=O);

3.5.5. Synthese von (2R)-N-{N-[Bis(methylthio)methyliden]-2-(6,7-dimethoxycoumaryl)-alanyl}-bornan-10,2-sultam (4)

1,1 g (2) (3,0 mmol) wurden in 25 ml THF (trocken) auf $-78^\circ C$ gekühlt. Dazu wurden 2,2 ml n-BuLi (1,6 M Lsg. in Hexan, 3,5 mmol) getropft und 1 h bei $-78^\circ C$ gerührt. Dann wurden 3,5 ml HMPT (20 mmol) zugegeben und 10 min später 3,6 g (3) (14 mmol) in 8 ml THF (trocken). Nach 1 h wurde die Reaktionstemperatur auf ca. $-30^\circ C$ erhöht und weitere 16 h gerührt. Dann ließ man auf RT erwärmen und stoppte die Reaktion mit 10 ml gesättigter NaCl-Lösung. Es trat ein voluminöser gelber Niederschlag auf, der abfiltriert und im HV getrocknet wurde. Die wässrige Phase wurde 3mal mit je 10 ml Essigsäureethylester und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über $NaSO_4$ getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Filtrat eingengt. Zurück blieb ein öliges Produkt.

Gereinigt wurde das Produkt durch Chromatographie an 100 g Kieselgel mit EtOAc:Hexan (1:1) als Laufmittel. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden bis zur

Trockene eingengt und anschließend aus Ethanol kristallisiert. Das Produkt war feinkristallin und farblos.

Ausbeute: 790 mg (1,5 mmol) = 50% bezogen auf **(2)**;

$C_{27}H_{34}N_2O_7S_3$: MW 594,8 g/mol

d_H (in $CDCl_3$; 500 MHz): 0,93 ppm (s, 3H, C-CH₃); 0,97 ppm (s, 3H, C-CH₃); 1,32-1,38 ppm (m, 2H CH₂-C); 1,84-2,09 ppm (m, 5H); 2,34 ppm (s, 3H, SCH₃); 2,46 ppm (s, 3H, SCH₃); 3,10 ppm (dd J = 13 Hz, 1H, CHC); 3,40-3,52 ppm (4 H); 3,92 ppm (s, 3H, OCH₃); 3,97 ppm (s, 3H, OCH₃); 5,36 ppm (dd J 9 Hz, 1H, CHC); 6,23 ppm (s, 1H, Ar); 6,79 ppm (s, 1H, Ar); 7,36 ppm (s, 1H, Ar);

3.5.6. Synthese von L-(6,7-Dimethoxy-4-coumaryl-)alanin **(5)**

500 mg **(4)** (0,8 mmol) wurden in 5 ml HCl (1M) und 5 ml THF für 8 h bei RT gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde per DC oder HPLC verfolgt. War nach 12 h noch keine vollständige Entschützung erreicht, wurde ca. 1 ml HCl (25%) zugegeben. Danach wurde das Solvenz vollständig entfernt und der Rückstand über Nacht im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet. Dann wurde der Feststoff in 5 ml LiOH-Lösung (1 M) aufgenommen, mit 16 ml THF versetzt und 16 h bei RT gerührt. Das THF wurde nach 16 h entfernt und zur verbleibenden Suspension wurden 20 ml Wasser gegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 10 ml CH_2Cl_2 gewaschen um das chirale Auxiliar zurückzugewinnen.

Dann wurde mit HCl (1 M) auf pH 5-6 angesäuert, wobei das Produkt ausfiel und abfiltriert wurde. Die Reaktionslösung wurde vollständig eingengt um noch gelöstes Produkt zu erhalten. Das Produkt wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 200 mg (0,68 mmol) = 85% bezogen auf **(4)**;

$C_{14}H_{15}NO_6$: MW 293,3 g/mol

d_H (in $DMSO-d_6$; 500 MHz): 2,93 ppm (dd, 1H, CH); 3,52 ppm (m, 2H, CH₂); 3,82 ppm (s, 6H, 2x OCH₃); 6,25 ppm (s, 1H, Ar); 7,02 ppm (s, 1H, Ar); 7,32 ppm (s, 1H, Ar);

MS: 294,1 [M+H]⁺; 292,3 [M-H]⁻;

HPLC: analytische RP C18-Säule, Puffer A: 100 mM TEAAc, pH 7,0, B: 100 mM TEAAc, pH 7,0, 50% MeCN; Gradient: 5 min 5% B in A, in 20 min auf 100% B, 8 min bei 100% B, Retentionszeit: 24,0 min;

3.5.7. Synthese von N-Boc-L-(6,7-Dimethoxy-4-coumaryl)-alanin (6)

63 mg L-Dmca (0,22 mmol) wurden in 4 ml Dioxan/Wasser 1:1 suspendiert. Innerhalb von 15 min wurden 59 μ l Triethylamin (0,33 mmol) hinzugegeben. Nach 20 min wurden 60 mg BOC-On (0,24 mmol) als Feststoff zugefügt. Nach 4 h rühren bei Raumtemperatur wurden 4 ml Wasser und 6 ml Ethylacetat zu der Reaktionslösung gegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und verworfen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 6 ml Ethylacetat gewaschen und dann mit kristalliner Zitronensäure auf pH 4,0 eingestellt. Dann wurde wiederum dreimal mit je 6 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde zweimal mit je 10 ml wässriger Zitronensäure (pH 4,0) gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Natriumsulfat wurde abfiltriert und das Filtrat bis zur Trockene eingengt. Dabei erhielt man einen gelbweißlich gefärbten Feststoff. Die optische Reinheit wurde mit der HPLC unter Verwendung von Teicoplanin als chiraler stationärer Phase und Methanol mit 0,1% Essigsäure und 0,1% TEA als mobiler Phase kontrolliert (Berthod et al, 1996 und Peter et al., 1998). Das L-Enantiomer wurde zu mehr als 98% erhalten.

Ausbeute: 69 mg (0,18 mmol) = 82% bezogen auf (5);

$C_{19}H_{23}NO_8$: MW 393,4 g/mol

d_H (in $DMSO-d_6$; 500 MHz): 1,29 ppm (s, 9H, t-Bu); 2,98 ppm (dd, 1H, CH); 3,48 ppm (d, 1H, CH_2), 3,50 ppm (d, 1H, CH_2); 3,84 ppm (s, 3H, OCH_3); 3,85 ppm (s, 3H, OCH_3); 6,18 ppm (s, 1H, Ar); 7,06 ppm (s, 1H, Ar); 7,23 ppm (s, 1H, Ar);

MS: 392,1 [M-H]⁻ und 784,9 [2M-H]⁻;

3.5.8. Synthese von N²-Boc-N³-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-L-2,3-diaminopropionsäure (7)

400 mg N²-Boc-L-2,3-diaminopropionsäure (1,96 mmol) wurden in 30 ml Ethanol/Wasser 1:1 suspendiert. Dann wurden 321 μ l Triethylamin (2,3 mmol) zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde in einen Kolben mit 431 mg 7-Nitro-4-chlorbenzofurazan (2,16 mmol) gelöst in 35 ml Ethanol überführt. Es wurde 6 h bei RT gerührt und danach wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der halb feste Rückstand wurde durch Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 95:5 als Eluent gereinigt. Das erhaltene Produkt wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 350 mg (0,95 mmol) = 48% bezogen auf N²-Boc-L-2,3-diaminopropionsäure;

C₁₄H₁₇N₅O₇: MW 367,3 g/mol

*d*_H (in DMSO-*d*₆; 500 MHz): 1,30 ppm (s, 9H, t-Bu); 3,71 ppm (m, 2H, CH₂); 4,10 (m, 1H, CH); 6,45 ppm (d, 1H, Ar); 8,51 ppm (d, 1H, Ar);

3.5.9. Festphasensynthese von Peptiden

Alle für diese Arbeit verwendeten Peptide wurden durch Festphasensynthese synthetisiert (Merrifield, 1963). Die Peptide Ras(51-117)COSR, Ras(118-166), RBD(51-95) und RBD(96-131)/K_(Lävulinsäure)L wurden mit Hilfe eines Peptidsynthesizer hergestellt (Kent et al., 1984). Alle weiteren verwendeten Peptide wurden manuell synthetisiert, wobei das *in situ* Neutralisations- und HBTU [2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat] Aktivierungsprotokoll für die Boc-Schutzgruppenchemie (Schnölzer et al., 1992), bzw. wo erwähnt für die Fmoc-Schutzgruppenstrategie, verwendet wurde (Atherton und Sheppard, 1989). Die Synthese aller C-terminalen Peptidsegmente wurde an Boc-AS-OCH₂-phenylacetamidomethyl-Harzen oder Fmoc-AS-Wang-Harzen durchgeführt. Die Synthese aller anderen Peptidsegmente wurde an speziellen Thioester-Harzen durchgeführt, die bei Abspaltung des Peptids einen C-terminalen Thioester generierten, der für die chemische Ligation notwendig ist (Hojo et al., 1983; Dawson et al., 1994; Canne et al., 1995). Die Thioester-Harze wurden von Gryphon Sciences zur Verfügung gestellt.

Die reaktiven Seitenketten der für die Peptidsynthese verwendeten Boc-Aminosäuren waren mit den folgenden Gruppen geschützt: Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHxl), Cys(Acm), Cys(p-MeBzl), Dap(Fmoc), Glu(OcHxl), His(DNP), Lys(CLZ), Lys(Fmoc), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(2-Br-Z). Die Seitenketten aller nicht aufgeführten Aminosäuren waren ungeschützt. Die Seitenketten der verwendeten Fmoc-Aminosäuren waren mit folgenden Gruppen geschützt: Cys(Trt), Lys(Dde), His(Trt). Die Seitenketten aller nicht aufgeführten, verwendeten Aminosäuren waren ungeschützt.

Die manuellen Synthesen wurden in Maßstäben von 0,1 bis 0,21 mmol durchgeführt. Für die Reaktion wurden dabei Glasgefäße mit Fritte (Porengröße 3 oder 4), Vakuum- und gegebenenfalls Schutzgasanschluss verwendet.

Boc-Chemie:

Die Polymerharze wurden mindestens 20 min in DMF gequollen. Die N-terminale Boc-Gruppe der ersten Aminosäure wurde durch Behandeln mit 100% TFA (zweimal 1 min)

abgespalten. Das TFA wurde durch einminütiges Waschen mit DMF (ca. 90 ml) entfernt. Im 0,21 mmol-Maßstab wurden 2,1 mmol der zu koppelnden Boc-geschützten Aminosäure in 3,8 ml einer 0,5 M HBTU-Lösung (1,9 mmol) in DMF und 1 ml DIEA 2-3 min aktiviert. Das Harz wurde dann in dieser Lösung für 12 min inkubiert. Bei nicht vollständiger Kopplung wurde die Prozedur wiederholt. Danach wurde 1 min mit DMF gewaschen. Alle Kopplungsschritte wurden nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Vor und nach der Kopplung von Gln wurde mit DCM gewaschen. Bei der Synthese von Peptiden mit C-terminalen Thioestern wurde vor der Kopplung der ersten Aminosäure die Thiolschutzgruppe vom Linker mit einer Lösung aus 3,1 ml Piperidin, 2,3 ml β -Mercaptoethanol und 10 ml DMF (Reaktionszeit: 20 min) abgespalten. Anschließend wurde 1 min mit DMF gewaschen.

Die Kopplung der nicht-codierten Aminosäuren L-NBD-Dap und L-Dmca erfolgte wie oben beschrieben, nur wurde die Kopplungszeit auf 1 h verlängert. Die Lävulinsäurekopplung an das Lys132 in der RBD96-133 wurde mit einem 10fachen Überschuß an Lävulinsäure und einer entsprechenden Menge HBTU und DIEA für 45 min durchgeführt. Die Entschützung der Seitenkettenaminogruppe des Lys132 wurde durch Behandeln mit 2 Äquivalenten DBU in DMF für 3 min erreicht.

Fmoc-Chemie:

Das Harz wurde vor der Synthese für 80 min in DMF gequollen. Die N-terminale Fmoc-Gruppe der ersten Aminosäure wurde durch zweimaliges Behandeln mit 20 % Piperidin in DMF für jeweils 3 bzw. 7 min abgespalten. Dann wurde mit 10 ml DMF pro Gramm Harz für 1 min gewaschen. 2,5 Moläquivalente der Fmoc-Aminosäure wurden mit 2,38 Moläquivalenten HBTU und 5 Moläquivalenten DIEA für 3 min aktiviert. Dann wurde das Harz für 15 min mit dieser Lösung inkubiert. Danach wurde das Harz 10mal mit jeweils 10 ml DMF pro Gramm Harz gewaschen.

Die Kopplung des Fluoreszenzmarkers Cy5-NHS an die entschützte Seitenkettenaminogruppe von Lysin erfolgte durch Inkubieren des Harzes mit dem Fluoreszenzmarker in DMSO. Die Abspaltung der Dde-Gruppe von der Seitenkettenaminogruppe des Lysin wurde durch Behandeln mit 5 ml 2% Hydrazin-Lösung in DMF pro Gramm Harz erreicht. Die Hydrazin-Lösung wurde durch 5maliges waschen mit DMF entfernt.

Zur Überprüfung der Entschütungs- und Kopplungseffizienz wurden Kaiser-Tests durchgeführt (Sarin et al., 1981).

3.5.10. Entschützung und Abspaltung der Peptide

Bei einem hohen Anteil an Histidin (His-Tag) wurden die DNP-Gruppen im Anschluß an die Festphasensynthese abgespalten, indem das Peptid-Harz zweimal mit einem Gemisch aus 6 ml β -Mercaptoethanol, 3 ml DIEA und 21 ml DMF für 30 min behandelt wurde. Zwischendurch wurde jeweils 1 min mit DMF gewaschen.

Die N-terminalen Boc- und Fmoc-Gruppen wurden entsprechend den Entschützungreaktionen bei der Kettenverlängerung abgespalten. Vor der Abspaltung wurden die Harze mit DCM gewaschen und unter reduziertem Druck getrocknet. Zur Abspaltung der durch Boc-Chemie synthetisierten Peptide wurden diese 1 h bei 0°C mit 10 ml wasserfreiem HF und 500 μ l p-Kresol behandelt. Das HF wurde danach unter reduziertem Druck bei 0°C entfernt. Das Rohpeptid in wasserfreiem Diethylether suspendiert und nach dem Abfiltrieren mit Diethylether gewaschen. Anschließend wird das Rohpeptid in einem Gemisch aus 50% Puffer B (Acetonitril, 0,08% (v/v) TFA) in Puffer A (H₂O, 0,1% (v/v) TFA) gelöst und dann lyophilisiert.

Die durch Fmoc-Chemie synthetisierten Peptide wurden nach dem Trocknen des Harzes mit einem Cocktail aus 33 mg Phenol, 25 μ l Ethandithiol, 50 μ l H₂O, 50 μ l Thioanisol und 900 μ l TFA (pro 100 mg Harz) für 2 h bei RT inkubiert. Das Rohpeptid wurde mit wasserfreiem Diethylether aus der TFA-Lösung gefällt und 1 h auf Eis stengelassen. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und 3mal mit wasserfreiem Diethylether gewaschen. Das Pellet wurde in Wasser aufgenommen und die Lösung lyophilisiert.

3.5.11. Aufreinigung der Peptide

Die Aufreinigung der Peptide erfolgte durch RP-HPLC im analytischen Maßstab auf C4- oder C8-Säulen (250 x 4,6 mm bzw. 125 x 4 mm) und im präparativen Maßstab auf C4-Säulen (250 x 10 mm bzw. 250 x 22 mm) bei Flussraten von 1-10 ml/min. Dazu wurden die Peptide in 6 M Guanidinium-Hydrochlorid, 100 mM NaOAc, pH 4,0 gelöst und auf die Säule aufgetragen. Nach Waschen mit 5% Puffer B in Puffer A wurde mit einem Gradienten von 5% Puffer B in Puffer A nach 65 % Puffer B in Puffer A in 30 bzw. 60 min eluiert. Die Detektion erfolgte bei 214 nm und bei einer 2. Wellenlänge, die dem Absorptionsmaximum des verwendeten Fluoreszenzmarkers entsprach. Die vereinigten, das aufgereinigte Peptid enthaltenden, Fraktionen wurden lyophilisiert.

3.5.12. Schutzgruppenabspaltung in Lösung

Die Abspaltung der Acetamidomethyl-(Acm)-Schutzgruppe von N-terminalen Cysteinen in den gereinigten Peptiden wurde durch 2 h Inkubation mit 1,5 Moläquivalenten Quecksilber(II)-acetat pro Thiolgruppe im Peptid in einem Puffer mit 2 M Harnstoff bei pH 3,5-4,0 erreicht. Danach wurde das Peptid erneut durch RP-HPLC gereinigt.

3.5.13. Chemische Ligation der Peptide

Für die Ligrationsreaktionen wurden 1-2 mM des Peptids mit C-terminalen Thioester und 1,1 Äquivalente des Peptids mit N-terminalen Cys in einem Puffer mit 6 M Guanidinium, 300 mM NaPi und 1% Thiophenol bei pH 7,0 eingesetzt. Es wurde 14-24 h bei RT langsam gerührt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 Volumenäquivalenten 6 M Guanidinium, 50 mM Tris, pH 8,6 und 1 Volumenäquivalent β -Mercaptoethanol für 1-2 h abgebrochen. Die Aufreinigung der Polypeptide erfolgte durch RP-HPLC. Der pH-Wert der Lösung wurde vor dem Auftragen auf die HPLC auf 4,0 eingestellt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden lyophilisiert.

3.5.14. Ligation von chemisch synthetisierten Peptiden und biosynthetischen Proteinsegmenten („*Expressed Protein Ligation*“)

Die verkürzt exprimierte TMPKn` wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen mit den chemisch synthetisierten N-terminalen Fragmenten ligiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Rückfaltung des vollständigen Proteins durch Dialyse gegen Guanidinium-freien, nukleotidhaltigen Puffer. Die nicht ligierten Peptide und Proteine fallen während der Dialyse aus und werden abzentrifugiert.

Die Ligation der C-terminalen, fluoreszenzmarkierten Peptide mit den als C-terminalen Intein klonierten Proteinen erfolgte nach Abspaltung von der Chitin-Matrix in Gegenwart von 4% Ethanthiol und/oder 3% MESNA unter Bedingungen bei denen das Protein in der nativen Struktur vorlag. Das im Überschuß eingesetzte fluoreszenzmarkierte Peptid wurde durch Dialyse oder Zentrifugation durch eine Membran mit 12-14 kD *cut-off* für das Ras-Protein und mit 6-8 kD *cut off* für die RBD

entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose.

3.5.15. Immobilisierung der RBD

Ni-NTA-beschichtete HisSorb Mikrotiterplatten der Firma Qiagen wurden über Nacht mit Puffer 7 (150 mM NaCl, 50 mM KPi, pH 7.4), der 5% fettfreies Milchpulver enthielt, inkubiert. Die Platten wurden dann mit Puffer 8 (150 mM NaCl, 50 mM KPi, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7,4) gewaschen und mit verschiedenen Konzentrationen der fluoreszenzmarkierten und der nicht markierten RBD für 12 h inkubiert. Danach wurden die Platten mit Puffer 8, der 0,05% Tween 20 enthielt, und dann nur mit Puffer 8 gewaschen.

3.5.16. Peptidanalytik

RP-HPLC:

Die Analyse der Peptide erfolgte durch RP-HPLC auf C4- oder C8-Säulen (250 x 4,6 mm) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Es wurden vier verschiedene analytische C4-Säulen der Hersteller Macherey-Nagel (Nr. 1), Bischoff (Nr. 3) und Vydac (Nr. 2 und 4) benutzt und ein Gradient von 5% Puffer B in Puffer A nach 65% Puffer B in Puffer A gewählt (HPLC-System 1). Die präparative Aufreinigung erfolgte mit jeweils für das Peptid angepasstem Gradienten mit Puffer A und B.

Puffer A: 0,1% TFA in H₂O; Puffer B: 0,08% TFA in MeCN;

Die Probenvorbereitung für die RP-HPLC-Kontrolle der Ligationsreaktionen erfolgte durch Verdünnen von 10 µl der Reaktionslösung mit 30 µl Puffer aus 6 M Guanidinium (pH 8,6) und 10 µl β-Mercaptoethanol. Nach 20 min wurden dann 10 µl Essigsäure, 40 µl 6 M Guanidinium (pH 4,0) und 0,5 mg TCEP zugegeben. Nach weiteren 5 min wurde zentrifugiert und der lösliche Überstand injiziert.

Massenspektrometrie:

Für die Bestimmung der Massen wurde ein „Triple Quadrupole“-, ein „Ion Trap“- und ein MALDI-Massenspektrometer verwendet. Die Proben wurden in 50% Puffer B in Puffer A gelöst. Als Matrix für die MALDI-Messungen wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure als gesättigte Lösung in Wasser mit 0,1% TFA benutzt.

3.5.17. Faltung der chemisch synthetisierten Proteine

RBDs:

Für die biophysikalischen Messungen wurde jeweils 1 mg der lyophilisierten Proteine in 1 ml Puffer 6 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,4) unter Zusatz von 5 mM DTT gelöst und die Lösung über Nacht bei 4°C leicht gerührt.

H-Ras:

Es wurde 0,5-1 mg des lyophilisierten Proteins in Puffer 6 suspendiert und ein 20facher Überschuß an GppNHp zugegeben. Nach 14 h leichtem Rühren bei 4°C löste sich ca. die Hälfte des Proteins. Der unlösliche Rückstand wurde abzentrifugiert und in Puffer 9 (5 M Guanidinium-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂ und 5 mM DTT, pH 8,0) aufgenommen, mit einem 20fachen Überschuß an GppNHp versetzt und mit Puffer 9 ohne Guanidinium 100fach verdünnt. Diese Lösung wurde 16 h gegen Puffer 6 dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt und die Proteinlösungen wurden schockgefroren und bei -80°C gelagert (Bradford, 1976).

3.6. Biophysikalische Methoden

3.6.1. Stopped-flow-Messungen

Alle Stopped-flow-Messungen wurden in Puffer 6 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7,4) durchgeführt. Die Anregung der Tryptophanfluoreszenz erfolgte bei 290 nm, die der mant-Gruppe bei 366 nm und die des L-NBD-dap bei 436 nm. Die zeitabhängige Änderung der Fluoreszenz wurde mit Kantenfiltern bei 398, 408 und 530 nm gemessen. Die Datenerfassung und erste Analyse wurde mit dem Softwarepaket von Hi-Tech durchgeführt. Die weiteren Analysen erfolgten mit Origin 6.0 von MicroCal und GraFit 3.0 von Erithacus.

3.6.2. Fluoreszenzspektroskopie

Emissionspektren in Lösung wurden in Küvetten mit 0,2 cm Schichtdicke in Puffer A bei 25°C gemessen. Die Anregung erfolgte mit einer Xenon-Lampe.

Die Messungen auf Ni-NTA-beschichteten Oberflächen wurden mit einem Fluoroskan Ascent FL-Gerät von Labsystems durchgeführt. Das verwendete Filterpaar bestand aus einem Filter bei 485 nm für die Anregung und einem Filter bei 538 nm für die Emission.

3.6.3. Fluoreszenzlebensdauermessungen

Die Fluoreszenzlebensdauer der RBDs wurde mit Hilfe der Frequenzdomänen-Methode an einem ISS K2 Multifrequency Phase Fluorometer bestimmt. Eine gesättigte Lösung von POPOP in Ethanol diente als Referenzprobe. RBD/L91NBD-Dap wurde bei 460 nm und RBD/L91Dmca bei 350 nm angeregt. Für die Emission der RBD/L91Dmca wurde ein Kantenfilter bei 400 nm verwendet. Bei der RBD/L91NBD-Dap wurde ohne Filter gemessen.

3.6.4. CD-Spektroskopie

CD-Spektren wurden mit einer Xenon-Lampe in einer Quarzglasküvette mit 0,1 oder 0,2 cm Schichtdicke aufgenommen. Die Proteinkonzentration lag zwischen 50 und 70 μM in 20 mM Phosphat-Puffer oder 25 mM Tris·HCl-Puffer bei pH 7,4. Die Spektren wurden jeweils um die Pufferbeiträge korrigiert.

3.6.5. Gekoppelter, UV-spektroskopischer Enzymtest zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} für verschiedene TMPK-Proteine

Die Grundlage dieses Tests lässt sich wie folgt beschreiben:

Die TMPK katalysiert die reversible Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP auf TMP bzw. andere TMP-Analoga. Das durch die Hinreaktion gebildete ADP wird in

Gegenwart von Phosphoenolpyruvat (PEP) durch die Pyruvatkinase (PK) unter Bildung von Pyruvat zum Triphosphat phosphoryliert. Die Carbonylgruppe des in dieser Reaktion gebildeten Pyruvats wird in Gegenwart von Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH), durch die Lactatdehydrogenase (LDH) reduziert. Dies führt zum L-Lactat. Als indirektes Messsignal der Thymidilatkinasereaktion diente die Abnahme der UV-Absorption von NADH bei der Oxidation zu NAD bei einer Wellenlänge von 340 nm.

Voraussetzung für diesen gekoppelten Assay ist, dass die beiden Reaktionen, die durch die Hilfsenzyme PK und LDH katalysiert werden, um mehrere Größenordnungen schneller sind, als die zu bestimmende Thymidilatkinasereaktion.

Alle Messungen wurden in 1 ml Gesamtvolumen bei 25°C an einem UV-Spektrophotometer der Fa. Beckman (DU 640 Spektrophotometer) durchgeführt. Der verwendete Puffer bestand aus 100 mM KCl, 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM NADH und 0,4 mM PEP bei pH 7,5. Dazu wurde jeweils ATP (1 mM), 10 µl eines 2:5-Gemisches aus LDH und PK mit einer Konzentration von 10 mg/ml, TMP (0,5 mM) und die TMPK-Proteine (150 nM) gegeben. Vor Zugabe des ATP wurde jeweils kontrolliert, ob die UV-Absorption konstant ist (Reinstein et al., 1988 und Berghäuser, 1975).

4. Ergebnisse

4.1. Auswahl und Synthese der nicht-codierten, fluoreszierenden Aminosäuren

Fluoreszierende, nichtcodierte Aminosäuren, die direkt in das Rückgrat von Proteinen inkorporiert werden sollen, müssen verschiedenen Kriterien genügen. Zwei der wichtigsten Kriterien sind, dass die Fluoreszenzeigenschaften wesentlich besser als die der am stärksten fluoreszierenden natürlichen Aminosäure Tryptophan sein sollten und dass der sterische Anspruch der Aminosäuren nicht wesentlich größer ist, als der vergleichbarer natürlicher Aminosäuren. Beides ist notwendig um die Detektion des Fluoreszenzsignals, auch in Gegenwart von Tryptophan, zu vereinfachen, ohne dass die Struktur des Proteins durch sehr große Fluorophore gestört wird.

Erste Ergebnisse wurden dabei mit N¹-Methyl-7-Azatriptophan (Mat) erzielt (Sydor et al., 1999). Bei dieser Aminosäure handelt es sich um ein Tryptophan-Analogon, das sich vom Tryptophan lediglich durch die Einführung eines Stickstoffs an der Position 7 und der Methylierung der N¹-Position unterscheidet. Diese Veränderungen führen zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptions- und Emissionsmaximums und einer erhöhten Quantenausbeute. Diese verbesserten Fluoreszenzeigenschaften erlauben es Veränderungen in der Umgebung des Fluorophors und damit in der Umgebung des Proteins zu detektieren. Allerdings ist die Sensitivität des Mat gegenüber solchen Umgebungseinflüssen relativ gering, was dazu führt, dass andere kleine fluoreszierende Aminosäuren benötigt werden, die wesentlich empfindlicher auf Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren. Dabei besteht diese Reaktion entweder aus einer Verschiebung des Emissionsmaximums oder aus einer deutlichen Veränderung der Fluoreszenzintensität.

4.1.1. N²-Boc-N³-Nitrobenzofurazan-L-2,3-diaminopropionsäure

Die Nitrobenzofurazan-Gruppe als kleiner, umgebungsempfindlicher Fluoreszenzmarker ist seit langem bekannt und seine Eigenschaften erfüllen einen Großteil der oben genannten Kriterien (Ghosh und Whitehouse, 1968). Als Aminosäuregerüst bietet sich die N²-Boc-L-2,3-diaminopropionsäure an, da sie enantiomerenrein kommerziell erhältlich ist und in einer einstufigen Reaktion mit 4-Chlor-7-nitrobenzofurazan das Produkt liefert.

Die Boc-geschützte N²-Position erlaubt dabei nur eine Reaktion der N³-Position mit dem NBD-Cl und außerdem kann die so geschützte Aminosäure für die Peptidsynthese verwendet werden. Die Reaktion wird in Gegenwart von Triethylamin als Base durchgeführt, um die Aminosäure in Lösung zu bringen und entstehendes HCl abzufangen (Abb. 8).

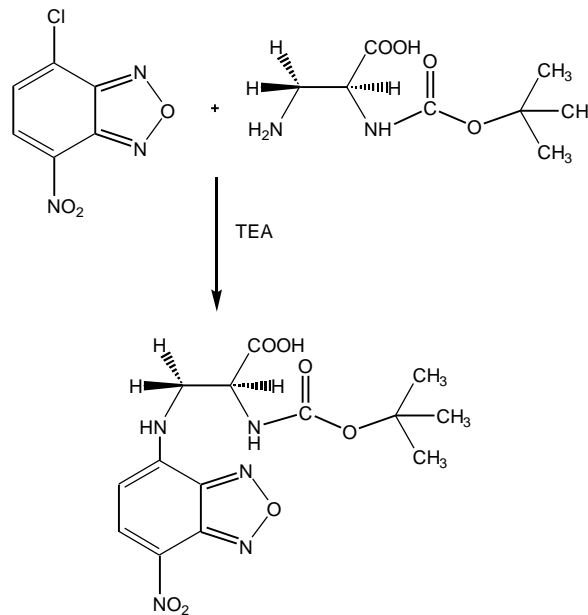


Abb. 8: Synthese von N²-Boc-L-N³-Nitrobenzofurazan-2,3-diaminopropionsäure (NBD-Dap).

Ein weiterer Vorteil der Diaminopropionsäure ist, dass die NBD-Gruppe sehr nahe am Proteinrückgrat ist und nicht, wie bei längeren Linkern zwischen NBD und α -C-Atom wesentlich weiter entfernt und somit eventuell stark Lösungsmittel exponiert ist. Dies könnte dazu führen, dass Veränderungen der Proteinkonformation keinen Einfluß mehr auf den Fluorophor haben. Aus diesem Grund wurde z.B. kein Lysin eingesetzt.

NBD-Dap wurde bereits in ein Membranprotein, den Tachykinin NK2 Rezeptor, mittels der Suppression des UAG Nonsenscodons während der heterologen Expression in *Xenopus* Oocyten eingebaut (Turcatti et al., 1996).

4.1.2. N-Boc-L-(6,7-dimethoxy-4-coumaryl)-alanin

Eine andere fluoreszierende Aminosäure, die die genannten Bedingungen erfüllt, ist N-Boc-L-(6,7-dimethoxy-4-coumaryl)-alanin. Diese Aminosäure wurde nach einer Methode von Bennett et al. (1998) synthetisiert. Das Dimethoxycoumarin-Grundgerüst wird ausgehend von Dimethoxyphenol und 4-Chloracetessigsäure-ethylester in einer säurekatalysierten Kondensationsreaktion hergestellt. Die Synthese der Aminosäureeinheit geht vom Glycin-ethylester aus, der in einem ersten Schritt zum N-[Bis(methylthio)methylen]glycin-ethylester umgesetzt wird, um die aciden Aminoprotone gegen inerte Reste zu ersetzen (Hoppe und Beckmann, 1979). Dann wird das Oppolzer-Sultam (2R-Bornan-10,2-sultam) eingesetzt, um eine Amidbindung zum geschützten Glycin-Derivat herzustellen (Oppolzer et al, 1989). Dieses chirale Glycin-Äquivalent wird an der Methylen-Gruppe deprotoniert und das 4-Chlormethyl-6,7-dimethoxycoumarin wird im Überschuß zugegeben. Das Oppolzer-Sultam als chirales Auxiliar bewirkt bei dieser Reaktion, dass zu mehr als 98% das L-Enantiomer entsteht.

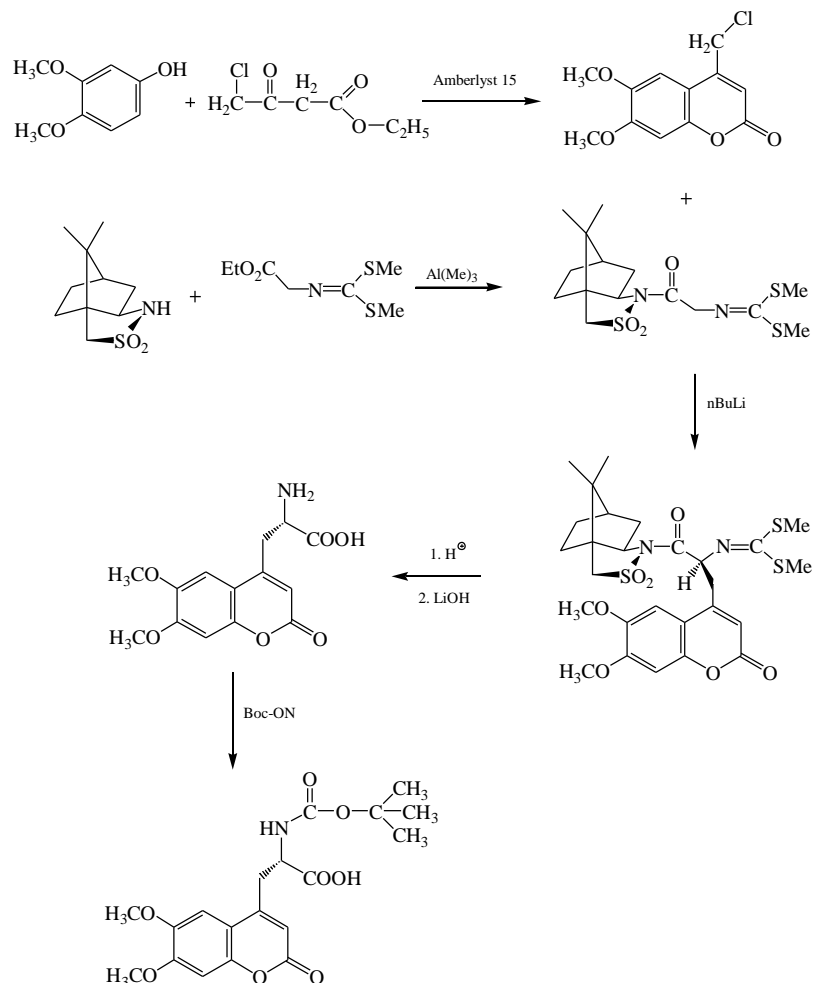


Abb. 9: Syntheseroute für N-Boc-L-(6,7-dimethoxy-4-coumaryl)-alanin.

Die Iminschutzgruppe wird durch Zugabe von HCl hydrolysiert. Anschließend wird mit LiOH das Sultam abgespalten. Dieses kann zurückgewonnen werden und steht für weitere Synthesen zur Verfügung. Im letzten Schritt wird die Aminogruppe geschützt, damit diese nicht-codierte, fluoreszierende Aminosäure in der Peptidsynthese eingesetzt werden kann (Abb. 9).

4.1.3. Fluoreszenzeigenschaften der Aminosäuren

Die Fluoreszenzeigenschaften der beschriebenen Aminosäuren unterscheiden sich bezüglich des Excitations- und Emissionsmaximums, des Extinktionskoeffizienten und auch der Quantenausbeute deutlich von einander und erlauben es damit einen relativ weiten Wellenlängenbereich abzudecken.

Verbindung	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\epsilon/M^{-1}\text{cm}^{-1}$	F	Sensitivität $\epsilon F/10^2$
Tryptophan ^a	280	351	5400	0,20	11
N ¹ -Methyl-7-azatryptophan ^a	289	409	8300	0,53	44
N ³ -Nitrobenzofurazan-L-1,3-diaminopropionsäure	475	535	22000	0,2-0,6 ^b	44-132 ^b
L-(6,7-dimethoxy-4-coumaryl)-alanin ^c	345	439	10900	0,52	57

Tab. 1: Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften verschiedener fluoreszierender Aminosäuren. Alle Daten beziehen sich auf Messungen bei pH 7.

^a Rich et al., 1995; ^b umgebungsabhängig: Die Fluoreszenzintensität nimmt im hydrophoben Medium zu. ^c Bennett et al., 1999;

Die beiden Aminosäuren NBD-Dap und Dmca zeigen im Vergleich zum Tryptophan eine deutliche bathochrome Verschiebung der Emissionwellenlängen und erlauben somit eine unabhängige Detektion von Trp. Desweiteren unterscheiden sich die Emissionmaxima von NBD-Dap und Dmca um 96 nm, was ebenfalls eine unabhängige Beobachtung beider Fluoreszenzsignale erlaubt. Die relative Sensitivität der Fluorophore ist direkt proportional zur Quantenausbeute F und zum Extinktionskoeffizienten ϵ und kann deshalb mit Hilfe des Produkts aus beiden Größen vergleichend betrachtet werden. Das Dmca bietet im Vergleich zum N¹-Methyl-7-azatryptophan eine um 30% höhere Sensitivität. Ein Vergleich mit NBD-Dap ist deshalb schwierig, weil die Quantenausbeute

dieses Fluorophors sehr stark von seiner Umgebung abhängt. Im günstigsten Fall ist die Sensitivität jedoch dreimal höher als beim N¹-Methyl-7-azatryptophan und sogar zwölfmal größer als beim Trp (Tab. 1). Der Einsatz von wesentlich sensitiveren Farbstoffen ist dadurch limitiert, dass diese gewöhnlich ein sehr großes chromophores System aufweisen und somit für den Einbau in das Proteinerückgrat allein aufgrund ihrer Größe nicht geeignet sind.

Die sich überschneidenden Absorptions- und Emissionsbereiche von Tryptophan und Dmca, sowie von Dmca und NBD-Dap lassen vermuten, dass es möglich ist diese Paare für Energieübertragungsexperimente (FRET) zu benutzen.

4.1.4. Oberflächenimmobilisierung von Proteinen

Der Histidin-Tag (His-Tag) wird häufig zur Aufreinigung von rekombinant hergestellten Proteinen verwendet. Dabei wird das Zielprotein mit einer Sequenz von 6 zusätzlichen Histidinen am N- oder C-Terminus markiert. Die Aminosäure Histidin kann durch seine Imidazolseitenkette gut mit zweiwertigen Metallionen wechselwirken, insbesondere die Affinität zu Ni²⁺-Ionen ist sehr hoch (Abb. 10). Dadurch ist es möglich Proteine mit einem His-Tag reversibel an Ni²⁺-beladene Oberflächen zu binden. Um eine stabile, selektive Wechselwirkung zu erreichen sind 6 Histidine notwendig, deren K_D-Wert für die Wechselwirkung mit Ni²⁺-Oberflächen bei ca. 100 fM liegt (Schmitt et al., 1993; Conti et al., 2000). Das Protein kann durch Verdrängung mit Imidazol wieder freigesetzt werden und steht dann in aufgereinigter Form wieder zur Verfügung.

Mit dem His-Tag werden routinemäßig Proben für Biacore-Messungen auf Oberflächen immobilisiert und es wurden damit bereits Peptide auf Lipidinterphasen immobilisiert (Dietrich et al., 1995). Bei diesen Anwendungen ist es erforderlich, dass die Proteine in einer Orientierung auf die Oberfläche aufgebracht werden, in der sie vollständig aktiv sind.

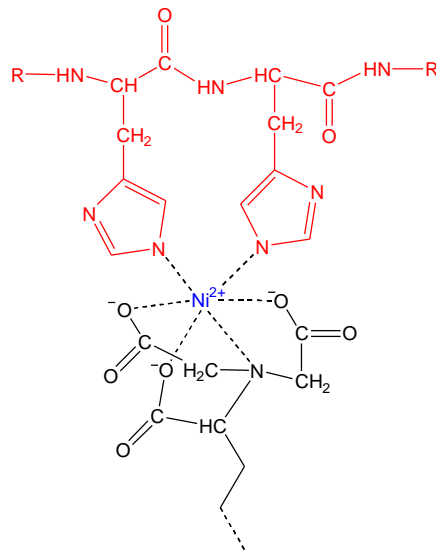


Abb. 10: Wechselwirkung von benachbarten Histidinresten im His-Tag mit NTA-chelatisiertem Ni²⁺.

Der His-Tag stellt eine Methode für die reversible Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen dar, die den Vorteil bietet, dass funktionsfähige Proteine zurückgewonnen werden können. Allerdings tritt, trotz der starken Bindung, nach einiger Zeit das Problem auf, dass sich Proteinmoleküle von der Oberfläche lösen und die Beladungszahl sinkt. Dieses Problem ließe sich nur durch eine kovalente Immobilisierung der Proteine lösen. Dazu ist es nötig, dass das Protein gezielt modifiziert wird und dadurch über eine chemische Funktionalität verfügt, die mit modifizierten Oberflächen reagieren kann und dort spezifisch bindet. Die Funktionalität muß sich in ihren chemischen Bindungseigenschaften deutlich von denen der natürlichen Aminosäuren unterscheiden. Ein Beispiel dafür wäre das Einführen einer Ketogruppe, die gezielt mit Hydrazin-modifizierten Oberflächen umgesetzt werden kann. Ketogruppen wurden bereits dazu verwendet um Farbstoffe an Proteine über Hydrazinfunktionen zu binden (Cornish et al., 1996). Der Einbau von Ketonen an bestimmte Positionen kann durch chemische Synthese von Proteinen erreicht werden, indem z.B. eine orthogonale Schutzgruppenchemie verwendet wird, die das selektive Abspalten von Seitenkettenschutzgruppen und Einführen der Ketofunktion erlaubt. Ein Beispiel wäre der Einbau von Lysin, dessen Seitenkette Fmoc-geschützt ist, während der Peptidsynthese mit Boc-Schutzgruppenchemie. Die Fmoc-Gruppe kann selektiv abgespalten werden und die Aminofunktion der Lysinseitenkette steht für eine Reaktion mit Lävulinsäure zur Verfügung (Canne et al., 1995 und Sydor et al., 1999).

4.2. Chemische Totalsynthese der modifizierten Ras-Bindungsdomäne von c-Raf1

Die fluoreszierenden Aminosäuren NBD-Dap und L-Dmca sollten ortsspezifisch in die RBD eingebaut werden. Die Position für den Einbau wurde nach Analyse der Kristallstruktur des RBD·Rap1A-Komplexes festgelegt (Nassar et al., 1995). Dabei sollen die Eigenschaften der RBD weitestgehend erhalten bleiben, um eine möglichst natürliche Wechselwirkung mit dem Effektorprotein Ras zu gewährleisten. Dies steht im Gegensatz zur ansonsten häufig durchgeführten Mutationsanalyse von Proteinen, wobei einzelne Aminosäuren gegen andere ausgetauscht werden, um drastische Veränderungen zu bewirken und so Rückschlüsse auf die Funktion der ausgewählten Aminosäure machen zu können.

Der Einbau der Fluoreszenzmarker erfolgt nahe des Teils der RBD, der mit den Effektorproteinen, wie Rap1A und Ras wechselwirkt. Dabei soll die Wechselwirkung und auch die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen nicht verhindert werden.

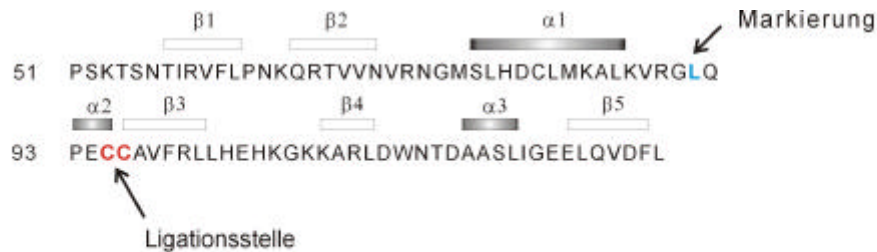
Durch den Einbau von Mat an die Position 91 der RBD durch Sydor et al. (1999), anstelle eines Leucins, wurde gezeigt, dass diese Position die genannten Kriterien erfüllt. Die Sekundärstruktur bleibt erhalten und die Wechselwirkung zwischen der RBD und Ras ist nahezu unverändert. Das Leucin 91 befindet sich in einer Loopregion zwischen den α -Helices $\alpha 1$ und $\alpha 2$ (Abb. 11). Die Seitenkette ist vollständig Lösungsmittel exponiert und nimmt keine strukturbildenden Funktionen wahr.

Der His-Tag sollte am C-Terminus eingeführt werden um eine orientierte Immobilisierung der RBD zu ermöglichen, ohne die Funktion und Struktur der RBD zu stören. Die Lävulinsäure zur kovalenten Immobilisierung wurde an ein zusätzlich eingeführtes Lys am C-Terminus der RBD gekoppelt.

Die Peptidsegmente der RBD wurden durch Festphasensynthese unter Verwendung der Boc-Schutzgruppenstrategie hergestellt (Schnölzer et al., 1992 und Merrifield, 1963) und die Proteinsynthese erfolgte durch native chemische Ligation der Peptidsegmente (Dawson et al., 1994). Für die chemische Ligation wird ein C-terminales Segment mit einem N-terminalen Cystein benötigt und ein N-terminales Segment mit einem C-terminalen Thioester. Die RBD enthält insgesamt drei natürliche Cysteinreste, wobei zwei davon in der Mitte des Proteins vorkommen (Position 95 und 96, Abb. 11). Das Cystein 96 wurde als N-terminale Aminosäure des 2. Peptids verwendet, da Sydor et al. (1999)

gezeigt haben, dass diese Position eine problemlose Ligation beider Peptidsegmente ermöglicht. Das Cystein 95 bildet also die C-terminale Aminosäure des 1. Peptids.

Zuerst wurde die RBD mit natürlicher Sequenz synthetisiert, um die Synthesestrategie zu überprüfen und um einen Vergleich mit rekombinant hergestellter RBD zu gewinnen.



Synthetisierte Peptide:

1. RBD(51-95)COSR
2. RBD(51-95)/L91NBD-COSR
3. RBD(51-95)/L91Dmca-COSR
4. RBD(96-131)
5. RBD(96-131)/Histag
6. RBD(96-131)/K_(Lävulinensäure)L

Ligationen:

1. RBD(51-95)COSR + 4. RBD(96-131)
2. RBD(51-95)/L91NBD-COSR + 4. RBD(96-131)
1. RBD(51-95)COSR + 5. RBD(96-131)/Histag
2. RBD(51-95)/L91NBD-COSR + RBD(96-131)/Histag
2. RBD(51-95)/L91NBD-COSR + RBD(96-131)/K_(Lävulinensäure)L

Abb. 11: Strategie für die Synthese der RBDs. Über der Aminosäuresequenz sind die Sekundärstrukturelemente gekennzeichnet (α = α -Helix; β = β -Faltblatt). Die synthetisierten RBD-Segmente mit Modifikationen werden gezeigt und auch die jeweils durchgeführten Ligationen. COSR = C-terminaler Thioester; NBD steht hier für NBD-Dap;

Des weiteren wurden die Peptidsegmente mit den Fluoreszenzmarkern an Position 91 synthetisiert und auch die C-terminalen Segmente mit den oben genannten Modifikationen.

4.2.1 Synthese von RBD(96-131)

96 H₂N-CAVFRLLEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFL-COOH 131

M = 4125 g/mol

Die Synthese des C-terminalen RBD-Segments erfolgte im 0,2 mmol-Maßstab ohne Modifikationen. Es wurde ausgehend von einem Boc-Leu-PAM-Harz manuell synthetisiert. Die Boc-Schutzgruppe wurde durch Zugabe von 100% Trifluoressigsäure (TFA) zum Harz abgespalten. Das entstandene Trifluoressigsäuresalz der freien Aminosäuregruppe wurde durch Zugabe von N,N-Diisopropylethylamin (DIEA) zusammen mit dem Aktivierungsreagenz *in situ* neutralisiert. Die Aktivierung der Aminosäuren erfolgte durch Zugabe von HBTU-Lösung in DMF (Abb. 12). Bei dieser Aktivierungsreaktion entsteht der Boc-geschützte 1-Hydroxybenzotriazolester der AS (Schnölzer et al., 1992).

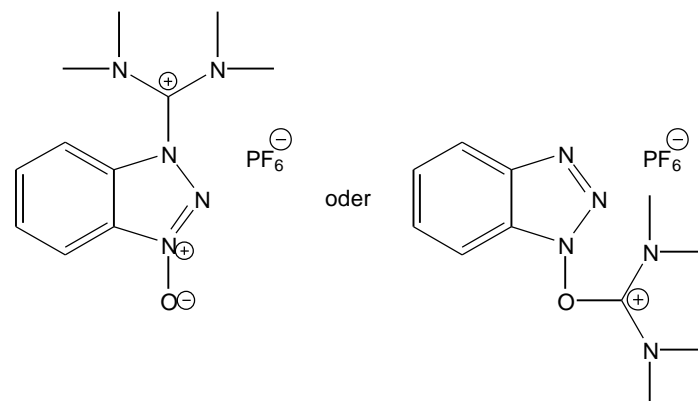


Abb. 12: HBTU als Guanidiniumderivat (Aminiumverbindung, links) und als Uroniumverbindung (rechts) dargestellt. In kristallinem Zustand liegt diese Verbindung als Guanidiniumderivat vor (Jones, 1995).

Dann wurden die Aminosäuren entsprechend der vorgegebenen Sequenz gekoppelt. Die Zugabe des HBTU sollte nie im Überschuß bezogen auf die Aminosäure erfolgen, da dies zur Bildung einer Guanidiniumgruppe mit der freien Aminofunktion des Peptids führen kann. Danach wäre die Kopplung einer weiteren Aminosäure nicht mehr möglich. Die Kopplungszeit für eine Aminosäure lag bei 12 min. Die Kopplung von Thr(Bzl) wurde immer zweimal durchgeführt um eine höhere Kopplungseffizienz zu erreichen. Die Vollständigkeit der Kopplungsreaktionen wurde stichprobenartig durch den Kaiser-Test überprüft (Sarin et al., 1981). Nach Kopplung der N-terminalen AS und Abspaltung der

Boc-Gruppe wurde das Peptid-Harz in DCM überführt und anschließend getrocknet. Die Abspaltung des Peptids vom Harz und aller vorhandenen Schutzgruppen, außer der DNP-Gruppen an den Histidinen und der ACM-Gruppe am N-terminalen Cys, erfolgte mit wasserfreiem HF (Tam und Merrifield, 1985). Unter den Abspaltungsbedingungen kann es zur Bildung von Carbeniumionen kommen, die das Peptid modifizieren können. Um dies zu verhindern wurde p-Kresol dem Spaltungscocktail zum Abfangen dieser reaktiven Spezies zugesetzt (Miranda et al., 1998). Weitere Nebenreaktionen wurden durch Zugabe von L-Cystein vermieden (C. Hunter, persönliche Mitteilungen). L-Cystein darf aber bei der Abspaltung von Peptiden mit C-terminalem Thioester nicht zugegeben werden, da dies zu einer irreversiblen Ligation des Cys an das Peptid führen würde.

Das Peptid wurde, nach Entfernen des HF, in wasserfreiem Diethylether suspendiert, gewaschen und dann in 50% Puffer B in Puffer A aufgenommen. Von dieser Lösung wurde ein Massenspektrum aufgenommen (Abb. 13). Die verbleibende Lösung wurde lyophilisiert und das Peptid dann in einer Lösung aus 8 M Harnstoff und 3% Essigsäure aufgenommen. Diese Lösung wurde mit einem Volumenäquivalent Chloroform gewaschen, um eventuell noch vorhandenes p-Kresol zu entfernen und auf die HPLC injiziert (Abb. 13).

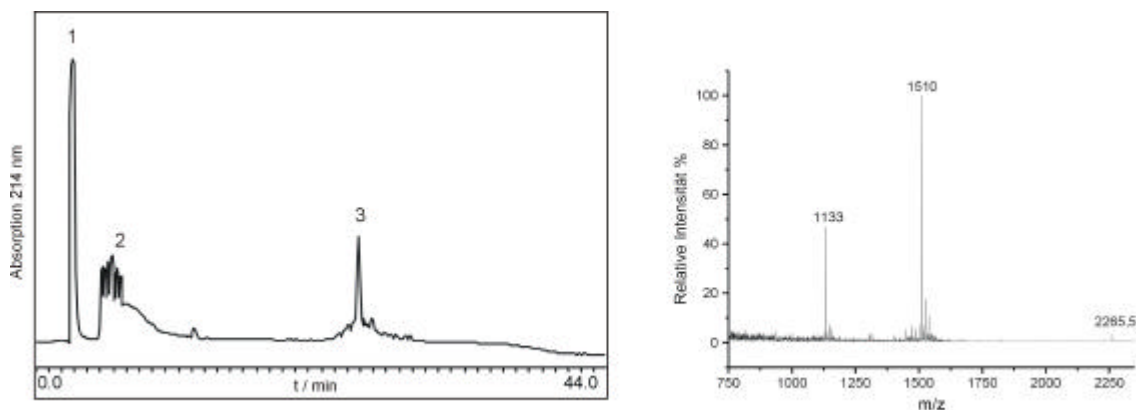


Abb. 13: HPLC-Chromatogramm und MS der RBD(96-131) vor der Aufreinigung.

HPLC-System 1, mit analytischer C4-Säule (1);

Der 1. Peak, der im Chromatogramm auftritt, entsteht durch Harnstoff, bei dem 2. Peak handelt es sich um ein Säulenartefakt, da dieser Peak bei HPLC-Läufen ohne Injektion einer Probe auf dieser Säule immer auftritt und der 3. Peak entspricht laut Massenspektrum dem Syntheseprodukt RBD(96-131). Dieser Peak ist stark verbreitert, was durch die vielen, sehr ähnlichen Nebenprodukte zu erklären ist, die während der

Synthese durch Kettenabbruch oder Auslassung einzelner AS entstehen (Kent, 1988). Im Massenspektrum des Peptids vor dem Lyophilisieren treten Peaks bei 1133, 1510 und 2265,5 m/z auf. Diese Peaks korrespondieren mit den 2 bis 4fach positiv geladenem Peptid und stimmen sehr gut mit der berechneten relativen Molekülmasse von 4530 g/mol überein. Dabei ist zu beachten, dass das Peptid noch immer zwei DNP-Gruppen an den Histidinen enthält und eine ACM-Gruppe am Cys-96. Zur Abspaltung dieser Schutzgruppen wurde das Peptid in 8 M Harnstoff gelöst und der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 3,5-4,0 eingestellt. Dann wurde Quecksilber(II)-acetat zugegeben, um die ACM-Gruppe zu entfernen. Anschließend wurde der pH-Wert mit Natriumcarbonat auf 8,0-8,6 eingestellt und es wurden 30% (v/v) β -Mercaptoethanol zugegeben, um die DNP-Gruppen von den Imidazolseitenketten durch Thiolyse abzuspalten. Außerdem diente das β -Mercaptoethanol zur Verdrängung des Hg^{2+} von den Thiolgruppen der Cysteinsseitenketten.

Die Aufreinigung des vollständig entschützten Peptids erfolgte über präparative RP-HPLC auf einer C4-Säule. Es wurden ca. 45 mg aufgereinigtes Peptid isoliert. Die Ausbeute beträgt, bezogen auf den Synthesemaßstab, 5,5%.

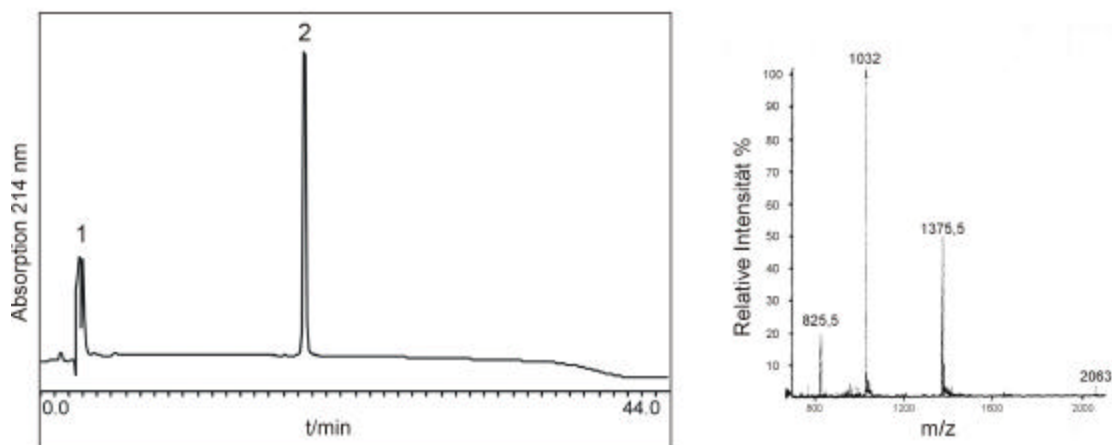


Abb. 14: HPLC-Chromatogramm und MS der aufgereinigten RBD(96-131).

HPLC-System 1, mit analytischer C4-Säule (2);

Der 2. Peak im Chromatogramm entspricht der aufgereinigten RBD(96-131) und der 1. Peak entsteht durch die Injektion. Das MS zeigt die Massenpeaks bei 825,5, 1032, 1375,5 und 2061 m/z, die einer berechneten relativen Masse von 4125 g/mol entsprechen. Die Peaks entsprechen demnach der vollständig entschützten RBD(96-131) mit Ladungszuständen von 2 bis 5 positiven Ladungen pro Molekül (Abb. 14).

4.2.2. Synthese von RBD(51-95)

51 H₂N-PSKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVVRGLQPEC-COSR 95

M = 5435 g/mol [mit His(DNP) und Thioester]

Die Synthese des N-terminalen Segments der RBD wurde auf einem automatischen Peptidsynthesizer durchgeführt, wobei ein spezielles Harz verwendet wurde, das bei Abspaltung des Peptids einen C-terminalen Thioester generiert. Die Synthese wurde im 0,21 mmol-Maßstab durchgeführt. Das Harz wurde mit β -Mercaptoethanol unter basischen Bedingungen behandelt, um die Thiolfunktion des Harzes zu entschützen. Danach wurde die HBTU-aktivierte C-terminale AS, hier Cys, an die Thiolgruppe gekoppelt. Die Kettenverlängerung erfolgte wie für RBD(96-131) beschrieben. Das Peptid-Harz wurde nach der Entschützung der letzten AS getrocknet und das Peptid wurde mit HF vom Harz abgespalten. Die DNP-Schutzgruppe vom His wurde in diesem Fall nicht abgespalten, da das dazu nötige β -Mercaptoethanol auch den C-terminalen Thioester angreifen würde. Die Entschützung des His erfolgte während der Ligation der Peptidsegmente durch die Zugabe von Thiophenol. Die RBD(51-95) wurde wiederum durch präparative RP-HPLC an einer C4-Säule aufgereinigt. Dazu wurden ca. 300 mg Rohprodukt in 20 ml 6 M Guanidinium, 100 mM NaOAc, pH 4,0 und 5 ml TFE gelöst und auf die C4-Säule aufgetragen.

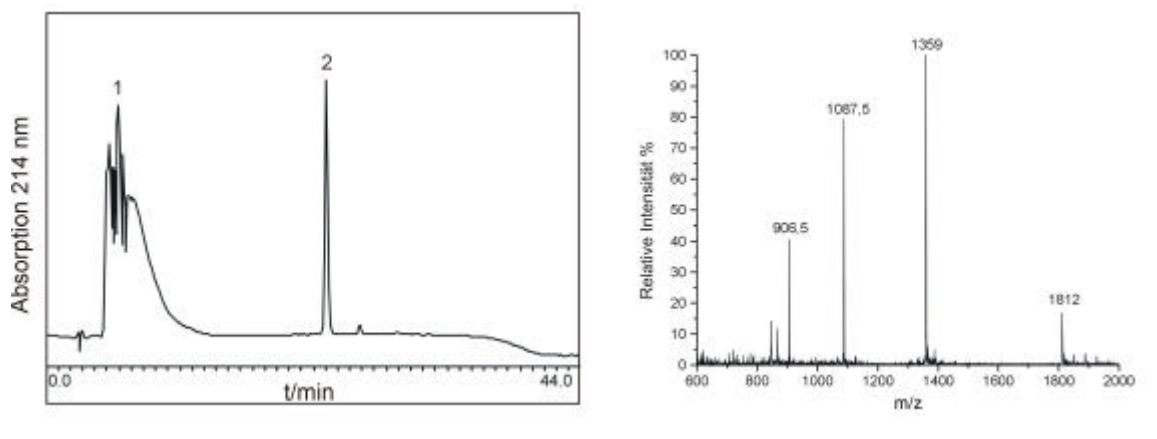


Abb. 15: HPLC-Chromatogramm und MS der aufgereinigten RBD(51-95).

HPLC-System 1, analytische C4-Säule (1);

Im RP-HPLC-Chromatogramm der aufgereinigten RBD(51-95) tritt, wie bereits oben erwähnt, ein Säulenartefakt auf (Peak 1, Abb. 15). Der 2. Peak entspricht laut Massenspektrum der RBD(51-95). Im MS treten die Peaks der 3 bis 6fach protonierten

Zustände des Peptids bei 1812, 1359, 1087,5 und 906,5 m/z auf. Diese Peaks stimmen mit der berechneten relativen Molekülmasse von 5435 g/mol sehr gut überein. Die Menge an aufgereinigter RBD(51-95) beträgt ca. 60 mg, was einer Ausbeute von 5,3%, bezogen auf den Synthesemaßstab, entspricht.

4.2.3. Synthese von RBD(51-95)/L91NBD-Dap

51 H₂N-PSKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVVRG~~X~~QPEC-COSR 131

M = 5569 g/mol [mit X = NBD-Dap, His(DNP) und Thioester]

Die Synthese des N-terminalen Segments der RBD mit NBD-Dap an Position 91 wurde manuell im 0,21 mmol Maßstab durchgeführt. Es wurde wieder ein Thioester-Harz verwendet, der wie unter 4.2.2. beschrieben mit der 1. AS beladen wurde. Die unnatürliche Aminosäure NBD-Dap wurde wie alle anderen AS gekoppelt, nur wurde, vor und nach der Boc-Abspaltung mit TFA, gründlich mit DCM gewaschen, um Wärmeentwicklung und dadurch ausgelöste Nebenreaktionen zu vermeiden. Die Kopplungseffizienz wurde durch Ninhydrin-Tests kontrolliert und diese zeigten nach 15 min keine Blaufärbung mehr.

Die weitere Kettenverlängerung wurde, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Das Peptid-Harz wurde nach abgeschlossener Synthese getrocknet und danach wurde das Peptid mit HF vom Harz abgespalten. Im HPLC-Chromatogramm ist der Guanidinium-Peak (1) zu sehen. Das Guanidinium ist in dem Puffer als chaotropes Reagenz enthalten und unterstützt den Lösungsprozeß des lyophilisierten Peptids im Puffer. Der 2. Peak entspricht der nicht aufgereinigten RBD(51-95)/L91NBD-Dap. Die Verbreiterung dieses Peaks ist durch Verunreinigungen zu erklären, die dem Zielpeptid sehr ähnlich sind. Im MS treten die Peaks bei 1858, 1393, 1115,5, 930 und 797,5 m/z für die Ladungszustände von 3 bis 7 positiven Ladungen pro Molekül auf. Diese Peaks entsprechen einer relativen Masse des Peptids von 5569 g/mol. Die anderen Peaks, die im MS bei etwas höheren Massen auftreten, als die bereits genannten, zeigen, dass die Abspaltung der letzten Schutzgruppe nicht vollständig war (Abb. 16).

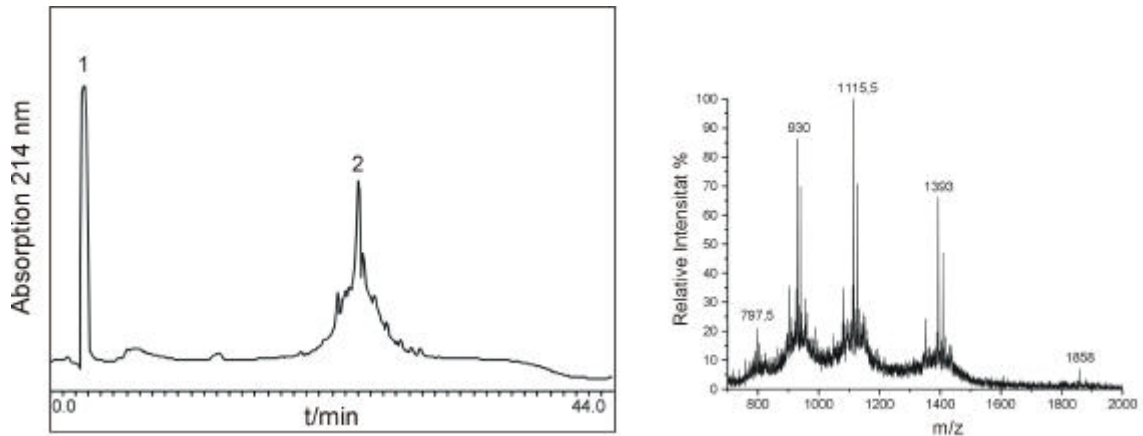


Abb. 16: HPLC-Chromatogramm und MS von RBD(51-95)/L91NBD-Dap nach der HF-Spaltung. HPLC-System 1, analytische C4-Säule (3);

Die Aufreinigung der RBD(51-95)/L91NBD-Dap wurde wiederum mit Hilfe einer präparativen C4-Säule durchgeführt.

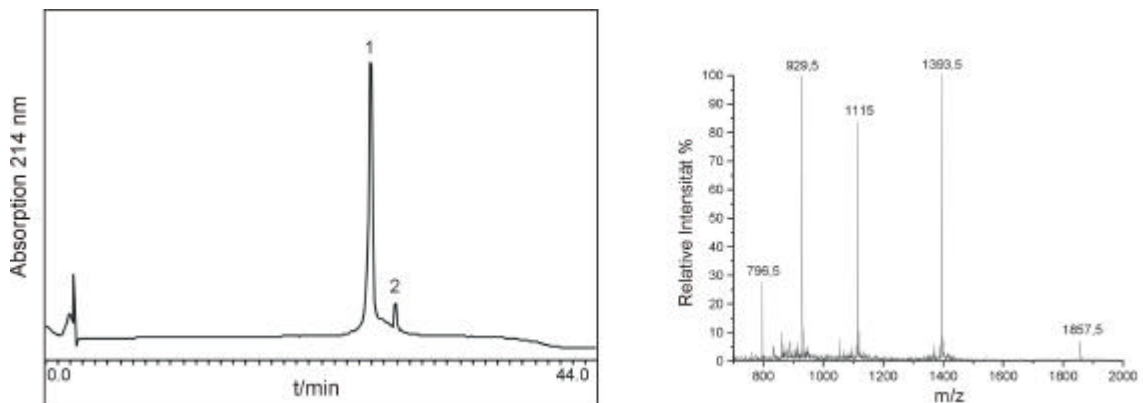


Abb. 17: HPLC-Chromatogramm und MS der aufgereinigten RBD(51-95)/L91NBD-Dap. HPLC-System 1, analytische C4-Säule (2);

Das Chromatogramm der aufgereinigten RBD(51-96)/L91NBD-Dap (Peak 1) ist nach dem Vereinigen der Produkt-enthaltenden Fraktionen nicht ganz sauber. Die Verunreinigung (Peak 2) konnte durch Massenspektrometrie nicht identifiziert werden (Abb. 17). Im MS treten die Ladungszustände von 3 bis 7 positiven Ladungen pro Molekül auf. Die Masse entspricht der relativen Masse von 5569. Die Massenpeaks für das Peptid mit Schutzgruppe treten nicht auf. Die Menge an aufgereinigtem Peptid beträgt ca. 65 mg, was einer Ausbeute von 5,6%, bezogen auf den Synthesemaßstab, entspricht.

4.2.4. Synthese von RBD(51-95)/L91Dmca

51 H₂N-PSKTSNTIRVFLPNKQRTVVNVRNGMSLHDCLMKALKVRG**X**QPEC-COSR 95
 M = 5595 g/mol [mit **X** = Dmca, His(DNP) und Thioester]

Die Synthese der RBD(51-95)/L91Dmca wurde manuell im 0,1 mmol Maßstab durchgeführt. Das verwendete Thioesterharz wurde, wie vorher beschrieben, entschützt und mit der 1. AS beladen. Die unnatürliche AS Dmca wurde entsprechend dem NBD-Dap gekoppelt und die Kettenverlängerung erfolgte wie beschrieben. Nach dem Trocknen des Peptid-Harzes wird das Peptid mit HF vom Harz abgespalten und lyophilisiert.

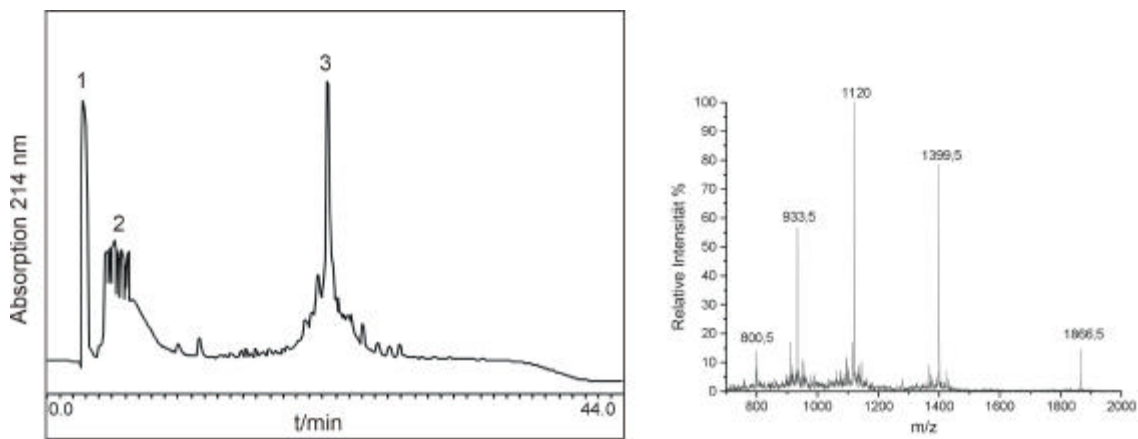


Abb. 18: HPLC-Chromatogramm und MS der nicht aufgereinigten RBD(51-95)/L91Dmca. HPLC-System 1, mit analytischer C4-Säule (1);

Im Chromatogramm wird der 1. Peak durch das Guanidinium verursacht, das in dem Puffer enthalten ist, der zum Lösen des Peptids verwendet wurde (Abb. 18). Der 2. Peak ist das bereits beschriebene Säulenartefakt und der 3. Peak entspricht der RBD(51-95)/L91Dmca. Im MS sind die verschiedenen Ladungszustände des Peptids mit 3 bis 7 positiven Ladungen zu sehen. Die Peaks bei 1866,5, 1399,5, 1120, 933,5 und 800,5 m/z entsprechen einer relativen Masse von 5595 g/mol, was sehr gut mit der berechneten Masse übereinstimmt. Das Peptid wurde über eine präparative C4-Säule aufgereinigt.

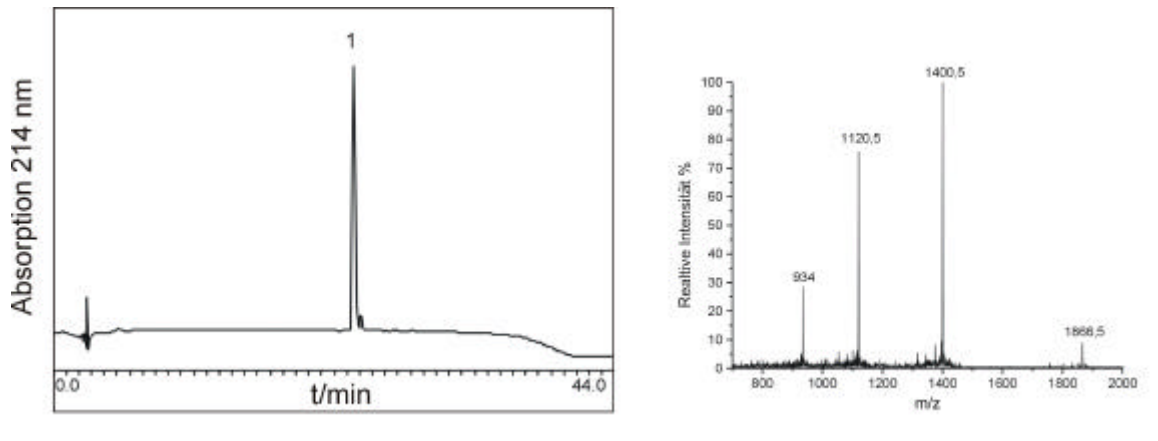


Abb. 19: HPLC-Chromatogramm und MS der aufgereinigten RBD(51-95)/L91Dmca.
HPLC-System 1, mit analytischer C4-Säule (2);

Der im HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten Peptids zu sehende Peak (1) entspricht der RBD(51-95)/L91Dmca. Das MS zeigt die zu den Ladungszuständen von 3 bis 6 positiven Ladungen pro Molekül gehörenden Peaks. Die daraus erhaltene relative Molekülmasse von 5596 g/mol stimmt mit der berechneten Masse gut überein (Abb. 19). Die erhaltene Menge an aufgereinigtem Produkt beträgt 26 mg, was einer Ausbeute von 4,6% bezogen auf den Synthesemaßstab entspricht.

4.2.5. Synthese von RBD(96-131)/His

96 H₂N-CAVFRLLHEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFLHHHHHHH-COSR¹ 131
M = 6535 g/mol [mit 8 x His(DNP), Cys96(ACM) und Thioester]

Die Synthese der RBD(96-131)/His wurde manuell im 0,21 mmol Maßstab durchgeführt. Alle eingebauten Histidine waren am Imidazolring mit DNP geschützt. Die Thiolgruppe des N-terminalen Cysteins war ACM-geschützt. Zur Synthese wurde ein spezielles Thioesterharz (R¹) benutzt, das mit Boc-His beladen wurde, da kein mit Histidin beladenes Harz zur Verfügung stand. Nach Kopplung aller AS wurde das Peptid-Harz getrocknet und das Peptid mit HF vom Harz gespalten. Zur Abspaltung der 8 DNP-Schutzgruppen und des Thioesters wurde das Peptid direkt in einem Puffer mit 6 M Guanidinium, 100 mM Tris, pH8,0 und 30% β-Mercaptoethanol gelöst. Der HPLC-Lauf aus Abb. 20 wurde direkt nach dem Lösen durchgeführt. Der 1. Peak entsteht durch eluierendes Guanidinium und der 2. Peak wird durch das zugegebene β-Mercaptoethanol

verursacht. Das Peptid eluiert als Peak 3 und zeigt die typische Verbreiterung des Peaks durch verkürzte Peptide, die als Nebenprodukte während der Synthese entstanden sind.

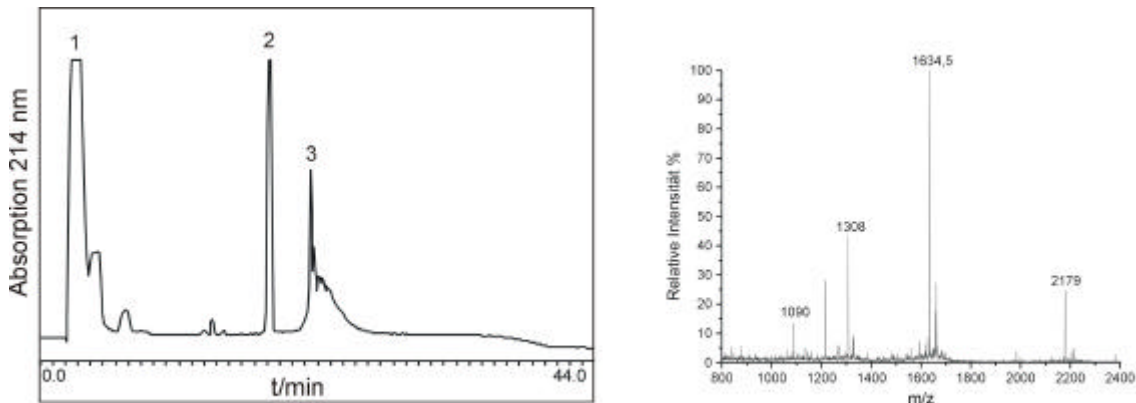


Abb. 20: HPLC-Chromatogramm und MS der RBD(96-131)/His nach der HF-Abspaltung. HPLC-System 1, mit analytischer C4-Säule (2);

Im MS treten die Ladungszustände von 3 bis 6 positiven Ladungen pro Molekül bei 2179, 1634,5, 1308 und 1090 m/z auf. Daraus resultiert eine relative Masse von 6535 g/mol, was mit der berechneten Masse für das vollständig geschützte Peptid übereinstimmt.

Nach 2 h in dem genannten Puffer sind alle DNP-Gruppen abgespalten und auch der C-terminale Thioester wurde hydrolysiert. Die Lösung wurde dann mit Essigsäure auf pH 4,0 eingestellt und durch präparative HPLC gereinigt. Die erhaltenen 93 mg aufgereinigtes und lyophilisiertes Peptid wurden in einer Lösung mit 8 M Harnstoff aufgenommen und mit einer 3%igen Essigsäure-Lösung auf eine Endkonzentration von 2 M Harnstoff verdünnt. Es wurden 1,5 Moläquivalente Quecksilber(II)-acetat pro Thiolgruppe des Peptids zugegeben, um die ACM-Gruppe vom N-terminalen Cys zu entfernen. Nach 1 h war die Entschützung nahezu komplett und das HPLC-Chromatogramm zeigt einen Hauptpeak (2), der laut MS der vollständig entschützten RBD(96-131)/His entspricht (Abb. 21 A). Zuerst eluiert auch hier wieder der Harnstoff (1). Zu der Peptidlösung wurden anschließend 20% β -Mercaptoethanol gegeben, um das Hg^{2+} zu komplexieren, und das Peptid wurde ein zweites Mal über eine präparative C4-Säule gereinigt. Im HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten Peptids sind zwei Signale zu erkennen, eines wird durch Guanidinium (1) und das andere durch das aufgereinigte Peptid (2) verursacht (Abb. 21 B).

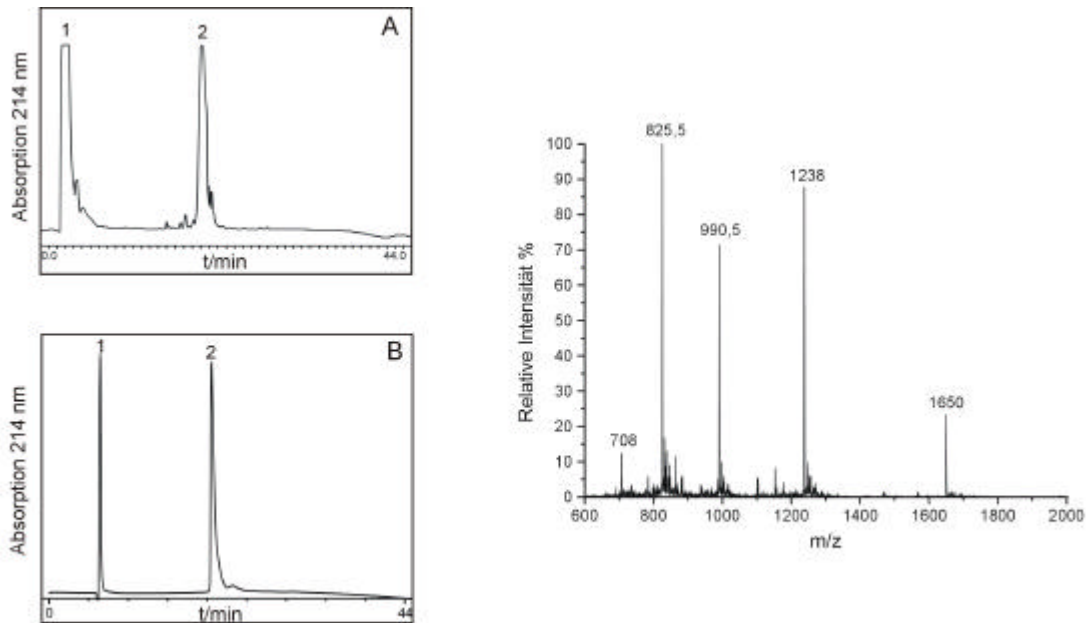


Abb. 21: HPLC-Chromatogramme und MS der vollständig entschützten RBD(96-131)/His. **A:** Kontrolle der Entschützung; **B:** aufgereinigtes und entschütztes Peptid; HPLC-System 1, mit analytischer C4-Säule (2).

Im MS sind die Peaks bei 1650, 1238, 990,5, 825,5 und 708 m/z sehen, die den Ladungszuständen von 3 bis 7 positiven Ladungen pro Molekül entsprechen. Die daraus erhaltene relative Masse von 4947 g/mol entspricht der berechneten Masse für das vollständig entschützte Peptid. Nach dem 2. Reinigungsschritt wurden 38 mg RBD(96-131)/His erhalten. Damit beträgt die Ausbeute, bezogen auf den Synthesemaßstab, 3,8%.

4.2.6. Synthese von RBD(96-131)/K(Lävulinsäure)L

96 H₂N-CAVFRLLEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFLK(Lävulinsäure)L-COOH 133
M = 4796 g/mol [mit 2 x His(DNP) und Lävulinsäure an Lys132]

Die Synthese der RBD(96-131)/KL wurde auf einem Peptidsynthesizer im 0,21 mmol Maßstab durchgeführt. Die Seitenkette des Lys132 war durch eine Fmoc-Gruppe geschützt. Diese, zur Boc-Gruppe orthogonale, Schutzgruppe konnte, nach dem alle AS gekoppelt waren, abgespalten werden. Dadurch stand eine ungeschützte Aminofunktion zur Kopplung der Lävulinsäure zur Verfügung. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde durch Zugabe von 2 Moläquivalenten DBU erreicht. Die Carboxylfunktion der Lävulinsäure wurde genau wie die AS zur Kopplung mit HBTU aktiviert. Nach 45 min Kopplungszeit war der Ninhydrintest farblos. Danach wurde die N-terminale Boc-Gruppe

entfernt, das Peptid-Harz getrocknet und die HF-Abspaltung durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte über eine präparative C4-Säule.

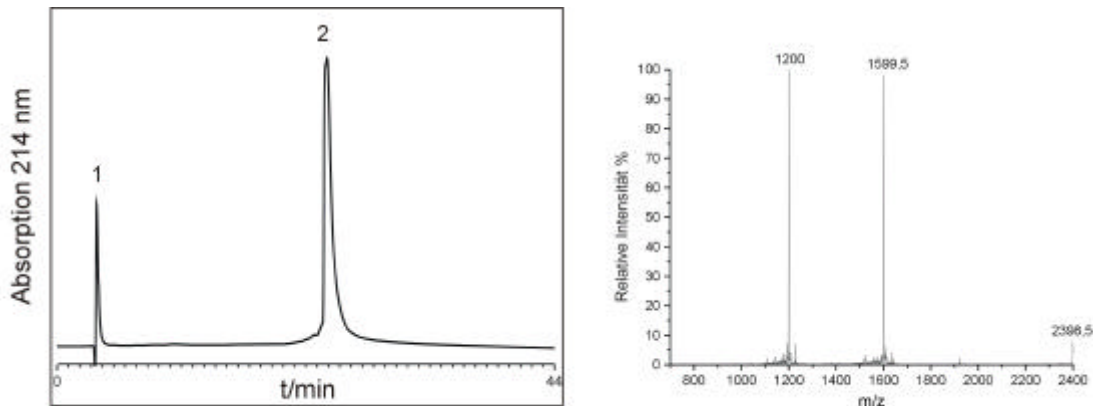


Abb. 22: HPLC-Chromatogramm und MS der aufgereinigten RBD(96-131)/K(Lävulinsäure)L. HPLC-System 1, mit analytischer C4-Säule (2);

Im Chromatogramm des aufgereinigten Peptids ist der Injektionspeak (1) zu sehen (Abb. 22). Der 2. Peak entspricht laut MS der aufgereinigten RBD(96-131)/K(Lävulinsäure)L. Im MS treten die Peaks bei 2398,5, 1599,5 und 1200 m/z auf. Diese Peaks liefern eine relative Masse von 4796 g/mol, was sehr gut mit der berechneten Masse übereinstimmt. Es wurden 30 mg aufgereinigtes Peptid erhalten. Dies bedeutet eine Ausbeute von 6,3% bezogen auf die, für die Lävulinsäurekopplung eingesetzte, Peptid-Harz Menge von 0,1 mmol.

4.2.7. Chemische Ligation der RBD-Peptide

Die Synthese der vollständigen RBD-Proteine mit den verschiedenen Modifikationen erfolgte durch chemische Ligation jeweils eines N- und eines C-terminalen Segmentes der RBD. Dabei führt die Thiolgruppe des N-terminalen Cys des C-terminalen Segments einen nukleophilen Angriff auf den C-terminalen Thioester des N-terminalen Peptids aus. Dadurch werden die beiden Peptide in eine Position zueinander gebracht, die eine leichte intramolekulare Umesterung unter Angriff der α -Aminogruppe des Cys auf den neuen Thioester erlaubt. Dadurch bildet sich die gewünschte Amidbindung und dieser Reaktionsschritt ist, im Gegensatz zum Angriff der Thiolgruppe, irreversibel (siehe Abb. 1, S. 3).

Die Ligation wurde für alle synthetisierten RBD-Proteine unter gleichen Bedingungen durchgeführt und wird deshalb an dieser Stelle nur exemplarisch für die Ligation von

RBD(51-95)/L91NBD-Dap und RBD(96-131)/K(Lävulinsäure)L beschrieben. Alle anderen Ligationen von RBD-Proteinen wurden ebenfalls unter diesen Bedingungen durchgeführt. Die N- und C-terminalen Peptide wurden jeweils in einer Konzentration von 2-4 mM in einem Ligationpuffer, bestehend aus 6 M Guanidinium und 100 mM NaPi bei pH 7,0 in Wasser, gelöst. Dabei wurde ein geringer Überschuss an C-terminalem Segment eingesetzt. Das Guanidinium dient als chaotropes Reagenz zur vollständigen Entfaltung der Peptidketten, was die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen erhöht. Durch Zugabe von 1% Thiophenol wurde die Reaktion gestartet. Das Thiophenol reagiert in einer Umesterungsreaktion mit dem C-terminalen Thioester und dabei entsteht der Thiophenolester. Dieser Thiophenolester weist eine höhere Aktivität als Abgangsgruppe, in Bezug auf den nukleophilen Angriff des C-terminalen Peptids, auf. Die Reaktionsmischung wird für 12 bis 16 h bei RT langsam gerührt. Der Reaktionsverlauf wird mit Hilfe der HPLC verfolgt.

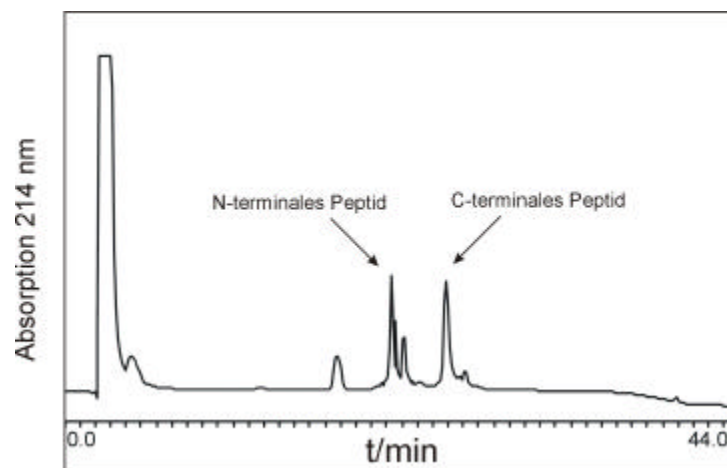


Abb. 23: HPLC-Chromatogramm der Ligation von RBD(51-95)/L91NBD-Dap und RBD(96-131)/K(Lävulinsäure)L vor der Zugabe von Thiophenol. HPLC-System 1, mit analytischer C4-Säule (2);

Im Chromatogramm sind die zwei Peaks für das N-terminale und C-terminale Peptid zu sehen, die durch Massenspektren eindeutig identifiziert wurden (Abb. 23). Nach der Zugabe von Thiophenol und einigen Stunden Reaktionszeit entstand ein homogenes Ligationsprodukt, das im Chromatogramm eine ähnliche Retentionszeit, wie das C-terminale Peptid aufwies (Abb. 24).

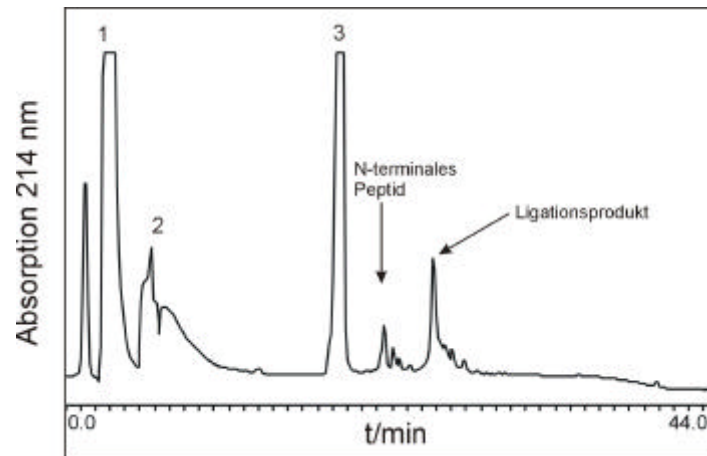


Abb. 24: HPLC-Chromatogramm der Ligation von RBD(51-95)/L91NBD-Dap und RBD(96-131)/K(Lävulinsäure)L nach einigen Stunden mit Thiophenol. Der 1. Peak entsteht durch eluierendes Guanidinium und der 2. Peak ist ein Säulenartefakt. HPLC-System 1, mit analytischer C4-Säule (1);

Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnte dieser Peak eindeutig als die vollständig entschützte RBD(51-131)/L91NBD-DapK(Lävulinsäure)L identifiziert werden. Des Weiteren ist noch etwas nicht ligiertes N-terminales Peptid vorhanden. Der 3. Peak wird durch das zugegebene Thiophenol verursacht.

Um die Reaktion aufzuarbeiten wurden 1,5 Volumenäquivalente einer wässrigen Lösung von 6 M Guanidinium, 100 mM NaPi, pH 8,6 und 0,5 Volumenäquivalente β -Mercaptoethanol zugegeben. Dieses Gemisch wurde 30 min gerührt, um eine vollständige Abspaltung der DNP-Schutzgruppen von den His-Resten zu erreichen, falls dies nicht schon durch das Thiophenol während der Ligation geschehen war. Für die präparative Aufreinigung über eine C4-Säule wurde die Reaktionslösung auf pH 4,0 eingestellt.

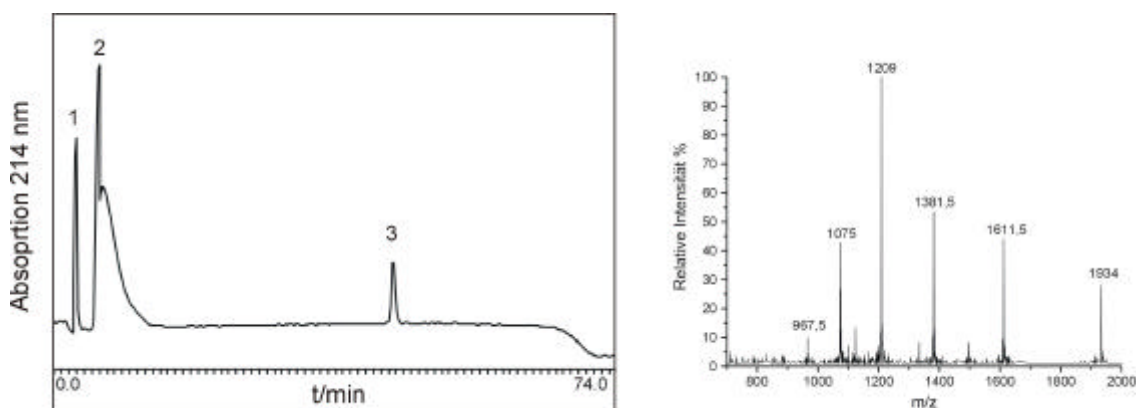


Abb. 25: HPLC-Chromatogramm und MS der aufgereinigten RBD(51-131)/L91NBD-DapK(Lävulinsäure)L. Der 1. Peak wird wieder durch Guanidinium verursacht. Gradient von 5% Puffer B in Puffer A auf 65% Puffer B in Puffer in 60 min mit analytischer C4-Säule (1).

Der 2. Peak im Chromatogramm ist das beschriebene Säulenartefakt und Peak 3 entspricht laut MS der RBD(51-131)/L91NBD-DapK_(Lävulinsäure)L (Abb. 25). Im MS treten die Ladungszustände von 5 bis 10 positiven Ladungen pro Molekül bei 1943, 1611,5, 1381,5, 1209, 1075, und 967,5 m/z auf. Dies entspricht einer relativen Masse von 9664 g/mol, was sehr gut mit der berechneten Masse übereinstimmt. Die erhaltene Menge an aufgereinigter RBD(51-131)/L91NBD-DapK_(Lävulinsäure)L betrug 7 mg, was bezogen auf die eingesetzte Menge von 15 mg RBD(51-95)/L91NBD-Dap und 13 mg RBD(96-131)/K_(Lävulinsäure)L einer Ausbeute von 27% entspricht. Die geringe Ausbeute lässt sich durch die Verluste bei der HPLC-Aufreinigung erklären.

In Abb. 26 sind die HPLC- und Massenspektren aller synthetisierter und aufgereinigter RBD-Proteine gezeigt deren Ligation nicht im Einzelnen beschrieben wurde. Alle erhaltenen relativen Massen stimmen sehr gut mit den berechneten Massen überein. Der 1. Peak in den HPLC-Chromatogrammen entsteht durch Guanidinium, das in dem Puffer enthalten ist, der zum Lösen der Proteine verwendet wurde. Die aufgereinigten Proteine verursachen das 2. Signal in den HPLC-Chromatogrammen. Alle gezeigten RBD-Proteine weisen ähnliche Retentionszeiten auf.

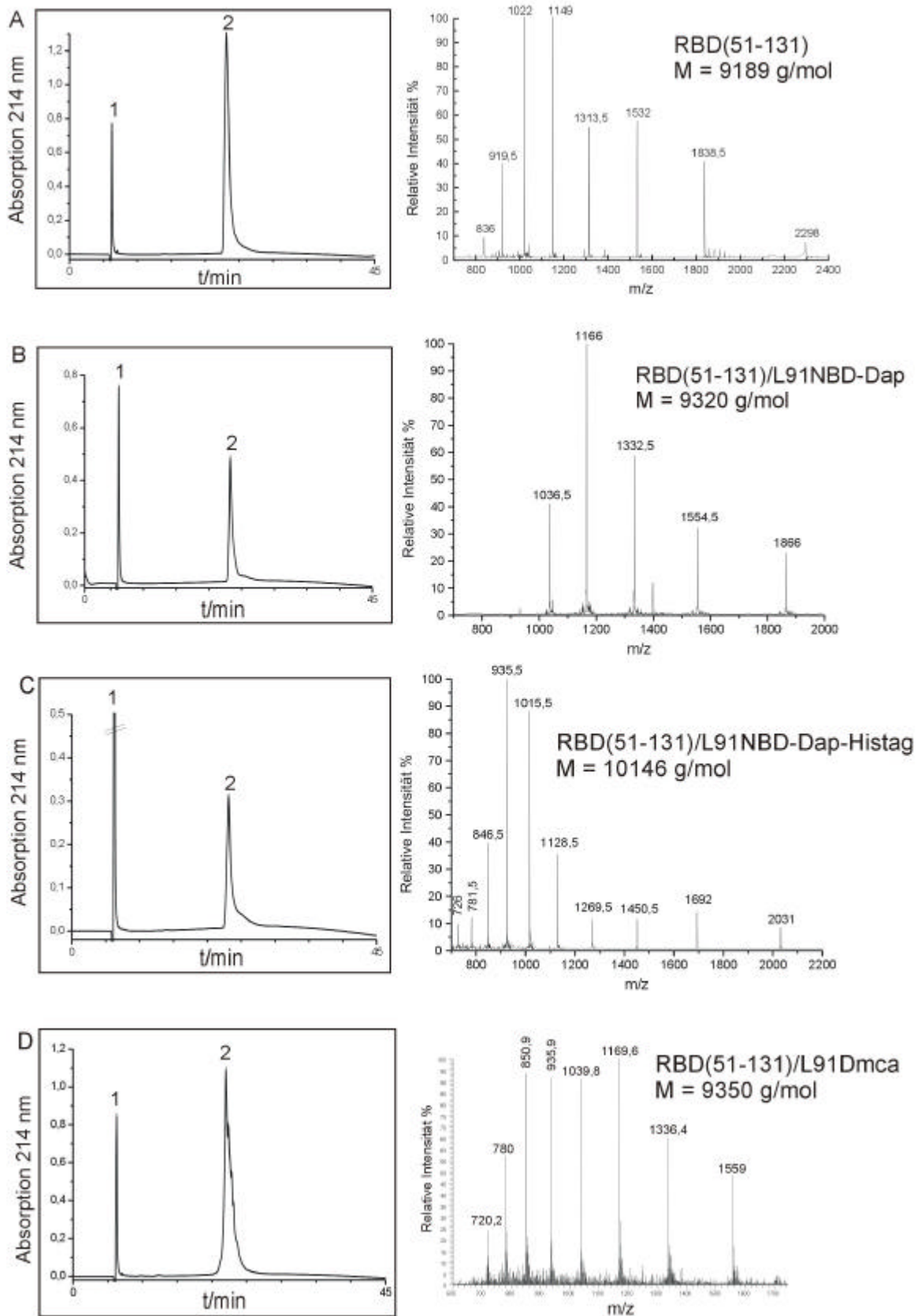


Abb. 26: HPLC- und Massenspektren der aufgereinigten RBD-Proteine. Die gezeigten Massen stimmen mit den kalkulierten Massen überein. HPLC-System 1, semipräparative C4-Säule;

4.3. Faltung und kinetische Charakterisierung der RBD-Proteine

4.3.1. Faltung der RBD-Proteine

Die Faltung der RBD-Proteine wurde, wie unter 3.5.17. beschrieben, durchgeführt. Dabei lösten sich die Proteine spontan im verwendeten Puffer auf. Zur Kontrolle, ob sie Sekundärstrukturelemente aufweisen, wie die rekombinant hergestellte RBD, wurden CD-Spektren aufgenommen und mit Daten für die rekombinante RBD verglichen. In Abb. 27 sind exemplarisch die CD-Spektren der RBD(rek), RBD(ch), der RBD/L91NBD-Dap und der RBD/L91Dmca gezeigt.

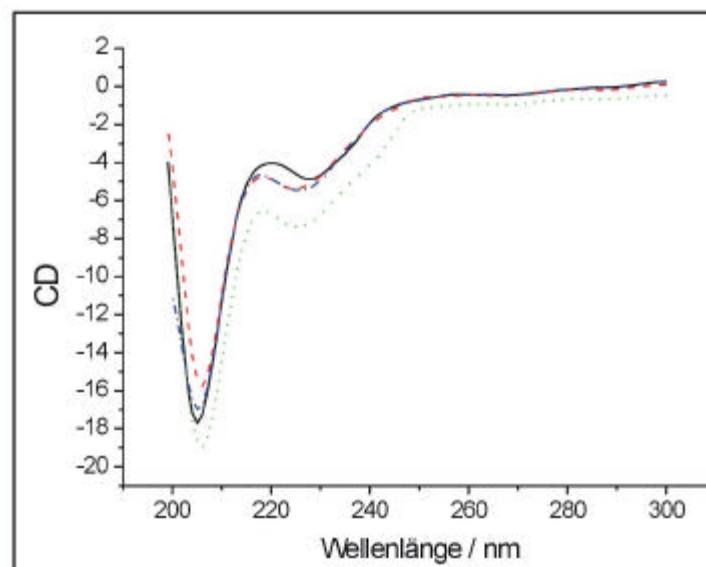


Abb. 27: Vergleich der CD-Spektren von RBD-Proteinen. RBD(ch) in schwarz, RBD(rek) in blau (Strich-Punkt), RBD/L91NBD-Dap in rot (gestrichelt) und RBD/L91Dmca in grün (gepunktet);

Die Circular dichroismen der RBD-Proteine zeigen eine schwache Absorption bei ca. 225 nm, was typisch für $n\pi^*$ -Übergänge der Peptidbindung ist und eine starke Absorption bei 205 nm. Diese Absorption entsteht durch α -helikale Sekundärstrukturen im Protein. Die Spektren stimmen sehr gut mit den bekannten Daten für die rekombinante RBD und für die synthetische RBD mit eingebautem Mat überein (Scheffler et al., 1994 und Sydor et al., 1999).

4.3.2. Kinetische Charakterisierung der Wechselwirkung von chemisch synthetisierten RBD-Proteinen und H-Ras

Um die volle biologische Funktionsfähigkeit der chemisch synthetisierten RBD-Proteine nachzuweisen, wurden Untersuchungen zur Wechselwirkung mit dem Effektorprotein H-Ras durchgeführt. Die Wechselwirkung der rekombinanten Form dieser Proteine und die Wechselwirkung der chemisch synthetisierten RBD mit Mat an Position 91 und H-Ras wurde bereits durch Sydor et al. (1998 & 1999) eingehend beschrieben. An dieser Stelle soll gezeigt werden, dass die Fluoreszenzsignale der AS NBD-Dap und Dmca für die Untersuchung dieser Wechselwirkung sehr gut geeignet sind, ohne den Bindungsprozess zu stören.

Diese Untersuchungen wurden mit einem Stopped Flow Gerät der Fa. HiTech Scientific durchgeführt und die Proteine wurden in einem Puffer aus 100 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂ und 5 mM DTT bei pH 7,4 eingesetzt. Das DTT wurde zugegeben um Oxidationsreaktionen, wie Disulfidbildung, zu verhindern. Für alle Versuche wurde C-terminal verkürztes, rekombinant hergestelltes H-Ras eingesetzt (Scherer et al., 1989).

Wechselwirkung von RBD(51-131) mit Ras·mGppNHp:

Für stopped flow Messungen wurde Ras·mGppNHp eingesetzt, wobei es sich bei mGppNHp um ein fluoreszenzmarkiertes GTP-Analogon handelt, das von Ras nicht hydrolysiert wird. Der Nukleotidaustausch zur Einführung des mGppNHp wurde wie unter 3.3.4. beschrieben durchgeführt. Dieses Nukleotid erlaubte es, die Bindung von RBD an Ras anhand der Fluoreszenzänderung der mant-Gruppe zu verfolgen (Abb. 28). Die fluoreszierende Spezies (Ras·mGppNHp) wurde jeweils in einer Konzentration von 0,25 µM eingesetzt, um die Reaktion mit der RBD(51-131) in Konzentrationen von 0,5, 1, 2 und 4 µM zu beobachten. Dabei handelte es sich um Reaktionsbedingungen pseudo 1. Ordnung, die eine Bestimmung des k_{ass} -Wertes durch lineare Regression erlaubten.

Aus der Steigung der erhaltenen Geraden ergab sich ein k_{ass} -Wert von $3,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Abb. 28). Die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion (k_{diss}) wurde durch ein Verdrängungsexperiment bestimmt. Dabei wurde der Komplex aus Ras·mGppNHp-RBD(51-131) in einer Konzentration von 0,5 µM vorgelegt und die fluoreszierende Komponente durch einen 8fachen Überschuss von Ras·GppNHp verdrängt.

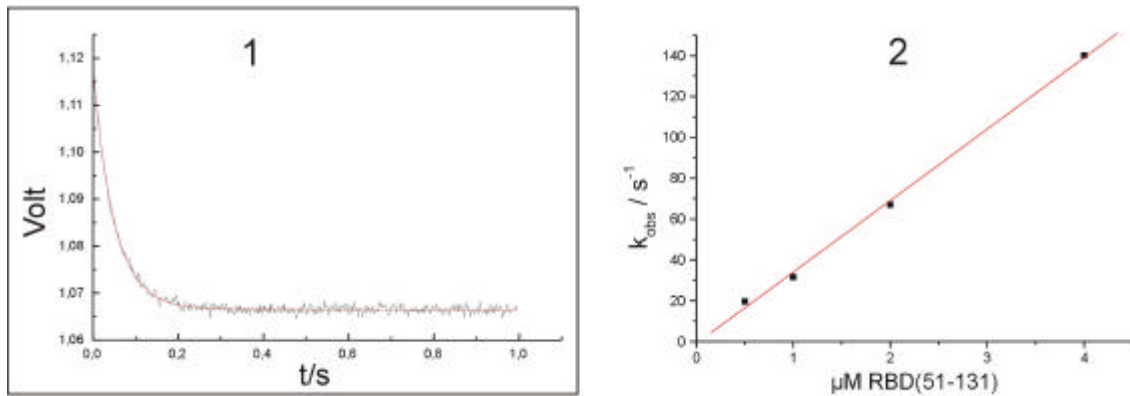


Abb. 28: 1) Änderung der mant-Fluoreszenz bei Bindung von Ras-mGppNHp an RBD(51-131).

c_0 (Ras-mGppNHp) = 0,25 μM , c (RBD(51-131)) = 0,5 μM ; λ_{ex} : 365 nm, $\lambda_{\text{em}} > 389$ nm, $k_{\text{obs}} = 20 \text{ s}^{-1}$.

2) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) von der RBD(51-131)-Konzentration.

Dieses Verdrängungsexperiment lieferte einen k_{diss} -Wert von $5,9 \text{ s}^{-1}$. Beide erhaltenen Werte stimmen gut mit denen für die rekombinante RBD bestimmten überein (Tab. 2). Der aus diesen Zahlen berechnete K_{D} -Wert für die Wechselwirkung der beiden Proteine ist 170 nM.

Wechselwirkung von RBD/L91NBD-Dap mit Ras-GppNHp:

Die Wechselwirkung der NBD-markierten RBD mit Ras-GppNHp wurde mit Hilfe der Veränderung der NBD-Fluoreszenz beobachtet (Abb. 29). Genau wie oben beschrieben wurde die Konzentration der fluoreszierenden Spezies, der RBD/L91NBD-Dap, konstant gehalten. Im Unterschied zu den bisher gezeigten Daten ist der Verlauf der Kurve, die die Assoziation von Ras/L91NBD-Dap an Ras-GppNHp beschreibt, nicht einfach exponentiell. In Abb. 29 (1) ist der Verlauf einer solchen Kurve und der zugehörige zweifach exponentielle Fit gezeigt. Die Zeitkonstante der zweiten Phase (6 s^{-1}) lag dabei in der Größenordnung der Dissoziationskonstante des Komplexes (11 s^{-1}) und eine Konzentrationsabhängigkeit dieser zweiten Phase wurde nicht beobachtet.

Aus den Experimenten wurde ein Wert von $1,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für k_{ass} erhalten, wobei nur die Zeitkonstanten für die erste Phase in die Berechnung eingingen. Das Verdrängungsexperiment, in dem die fluoreszierende RBD/L91NBD-Dap aus dem Komplex mit Ras-GppNHp durch wtRBD verdrängt wurde, lieferte einen k_{diss} -Wert von 11 s^{-1} (Abb. 30). Daraus ergibt sich eine K_{D} -Wert von 610 nM für die Wechselwirkung der Proteine. Dieser K_{D} -Wert ist, im Vergleich mit dem für die RBD(ch) bestimmte, erhöht, was nur auf den Einfluss der inkorporierten nicht-codierten, fluoreszierenden Aminosäure zurückgeführt werden kann.

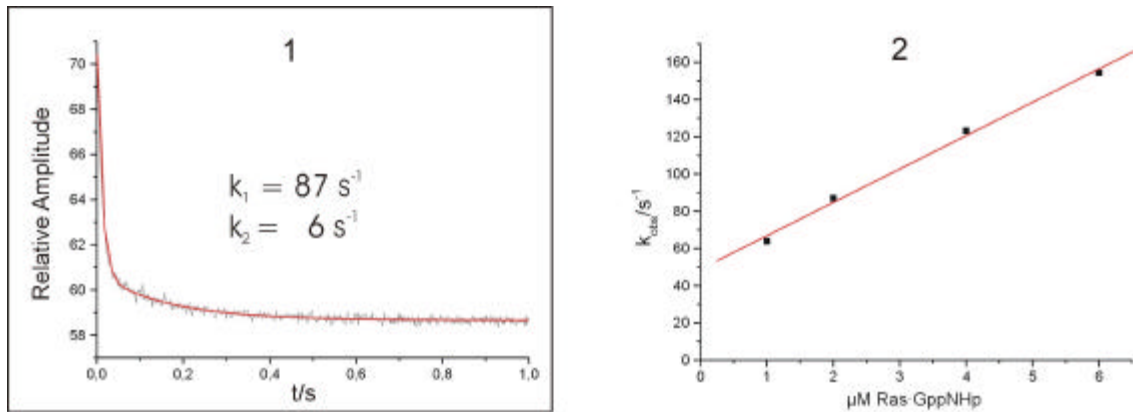


Abb. 29: **1)** Änderung der NBD-Fluoreszenz bei Bindung von Ras-GppNHp an RBD/L91NBD-Dap. $c_0(\text{RBD/L91NBD-Dap}) = 0,5 \mu\text{M}$, $c(\text{Ras-GppNHp}) = 2 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{ex}}: 436 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 530 \text{ nm}$, zweifach exponentieller Fit: $k_{\text{obs}1} = 87 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{obs}2} = 6 \text{ s}^{-1}$; **2)** Konzentrationsabhängigkeit der ersten beobachteten Geschwindigkeitskonstanten.

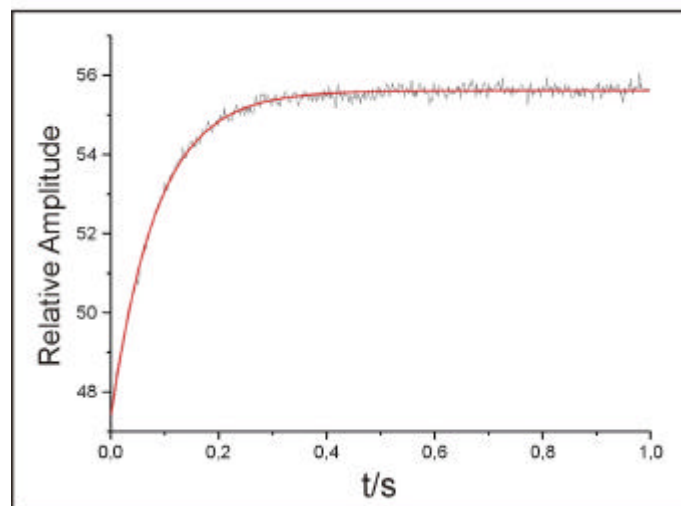


Abb. 30: Änderung der NBD-Fluoreszenz bei Verdrängung von RBD/L91NBD-Dap aus dem Ras-GppNHp-RBD/L91NBD-Dap-Komplex ($c = 0,5 \mu\text{M}$) durch $4 \mu\text{M}$ wtRBD. Der durch einfach exponentiellen Fit erhaltene Wert für k_{diss} beträgt 11 s^{-1} .

Wechselwirkung von RBD/L91NBD/His mit Ras-GppNHp:

Die Bestimmung der kinetischen Parameter k_{ass} , k_{diss} und K_D wurde, wie für RBD/L91NBD-Dap beschrieben, durchgeführt. Auch in diesem Fall wurden biphasische Kurven erhalten. Die Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation beträgt $2,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und die für die Dissoziation 14 s^{-1} (Abb. 31). Daraus ergibt sich eine K_D -Wert von 540 nM . Dieser Wert ist vergleichbar mit dem für die RBD/L91NBD-Dap erhaltenen. Dies

zeigt, dass trotz zweier Modifikationen am Protein (NBD-Dap und Histag) die Bindung an das Ras-GppNHp nur sehr wenig beeinflusst wird.

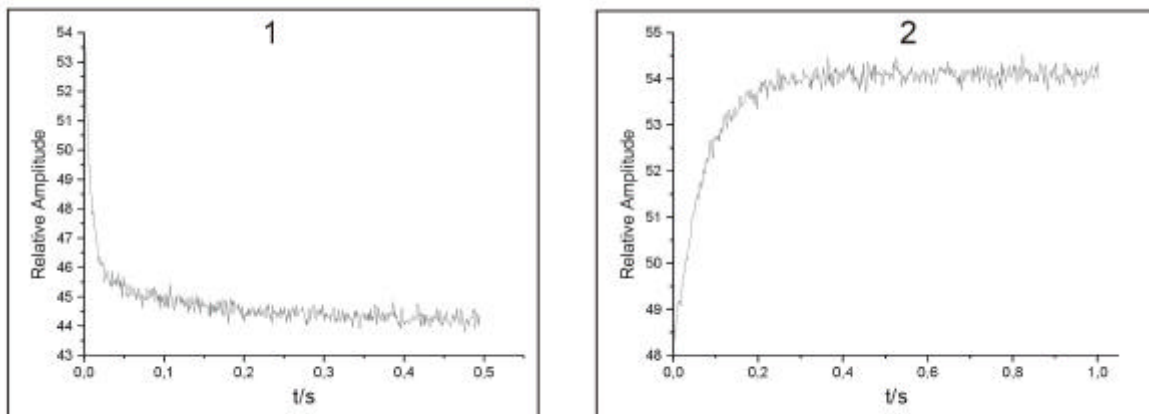


Abb. 31: **1)** Änderung der NBD-Fluoreszenz bei Bindung von RBD/L91NBD/His an Ras-GppNHp. c_0 (RBD/L91NBD/His) = 0,5 μ M, c (Ras-GppNHp) = 4 μ M, $k_{\text{obs1}} = 129 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{obs2}} = 8 \text{ s}^{-1}$; **2)** Verdrängung von RBD/L91NBD/His aus dem RBD/L91NBD/His-Ras-GppNHp-Komplex mit einem 8fachen Überschuss an wtRBD/His. $k_{\text{diss}} = 14 \text{ s}^{-1}$;

Des Weiteren wurden ähnliche Versuche durchgeführt, um die Wechselwirkung zwischen der RBD/L91NBD/His und Ras-mGppNHp zu untersuchen. Dabei wurde ausgenutzt, dass eine Energieübertragung zwischen der mant-Gruppe am Nukleotid und der NBD-Gruppe in der RBD möglich ist. Für diese Experimente wurde die mant-Gruppe bei 365 nm im Stopped flow Apparat angeregt und die Emission der NBD-Gruppe bei einer Wellenlänge größer als 530 nm gemessen. Die dabei erhaltenen Daten zeigen deutlich, dass die Energieübertragung ein auswertbares Signal liefert (Abb. 32). Allerdings sind die erhaltenen Signale monophasisch, was im Gegensatz zu den gerade beschriebenen Messungen unter Ausnutzung des NBD-Signals steht. Dies lässt darauf schließen, dass das FRET-Signal nur die Beobachtung der ersten, schnelleren Phase zulässt. Außerdem kann dadurch ausgeschlossen werden, dass die zwei Phasen, die unter Ausnutzung des NBD-Signals beobachtet wurden, durch zwei verschiedene Populationen, wie z.B. natives und fehlgefaltetes Protein, entstehen.

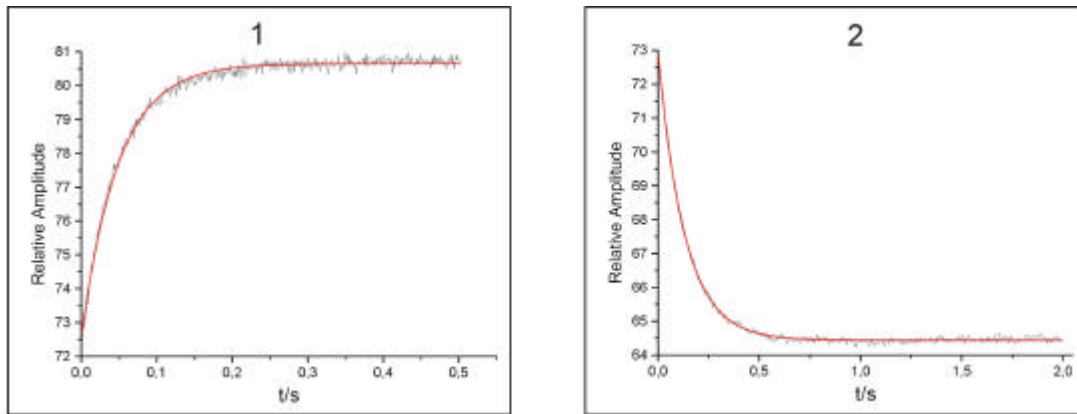


Abb. 32: Stopped flow Kurven, die durch FRET-Experimente mit Ras-mGppNHp und RBD/L91NBD/His erhalten wurden. Die Kurven wurden einfachexponentiell gefittet. **1)** Assoziation von $1 \mu\text{M}$ Ras-mGppNHp und $4 \mu\text{M}$ RBD/L91NBD/His; $k_{\text{obs}} = 20 \text{ s}^{-1}$ **2)** Verdrängung des RBD/L91NBD/His aus dem RBD/L91NBD/His-Ras-mGppNHp-Komplex durch einen 8fachen Überschuss Ras-GppNHp. $k_{\text{diss}} = 7,6 \text{ s}^{-1}$

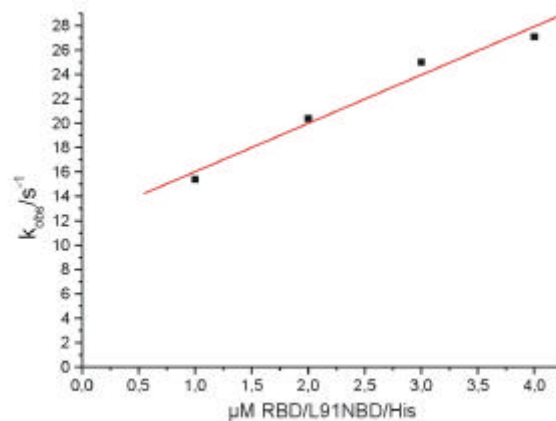


Abb. 33: Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante für die FRET-Messungen.

Die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation, ermittelt durch die FRET-Versuche, beträgt $4,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und ist damit wesentlich kleiner als der Wert, der durch die direkte Beobachtung der NBD-Fluoreszenz erhalten wurde (Abb. 33). Der k_{diss} -Wert ist mit $7,6 \text{ s}^{-1}$ nur wenig kleiner, als der durch direkte Beobachtung erhaltene. Aus diesen Werten ergibt sich ein K_D -Wert von $1,8 \mu\text{M}$ für die Wechselwirkung der beiden Proteine. Dieser Wert ist wesentlich höher, als alle anderen K_D -Werte, die für die Wechselwirkung der RBD mit Ras bestimmt wurden. Insgesamt muss festgestellt werden, dass es eine Diskrepanz zwischen den Messungen gibt, die zeigt, dass bei der Beobachtung verschiedener Fluoreszenzsignale teilweise unterschiedliche Prozesse detektiert werden.

Dies deutet eventuell auf einen komplexen Mechanismus der Bildung des Ras·RBD-Komplexes hin.

Wechselwirkung der RBD/L91Dmca mit Ras·GppNHp:

In diesem Fall sollte die Stärke der Wechselwirkung zwischen der RBD/L91Dmca und Ras·GppNHp durch direkte Beobachtung der Dmca-Fluoreszenz gemessen werden. Dies war nicht möglich, da das Signal, das im Stopped Flow Gerät erhalten wurde nicht ausreichte, um die Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation von RBD/L91Dmca und Ras·GppNHp zu bestimmen (Abb. 34). Aus diesem Grund wurden Versuche mit Energieübertragung vom Tryptophan zum Dmca-Fluorophor durchgeführt. Es war notwendig eine Tryptophan-Mutante von Ras zu benutzen, da in natürlichem Ras kein Trp vorkommt. Mit dem Ras/Y32W·GppNHp konnte gezeigt werden, dass eine Energieübertragung vom Trp zum Dmca möglich ist und auch hier wurden monophasische Kurven beobachtet (Abb. 34). Dies ermöglichte die Bestimmung von k_{ass} , k_{diss} - und K_D -Wert für die Wechselwirkung von Ras/Y32W·GppNHp mit RBD/L91Dmca. Die erhaltenen Werte sind, wie alle anderen, in Tabelle 2 zusammengefasst.

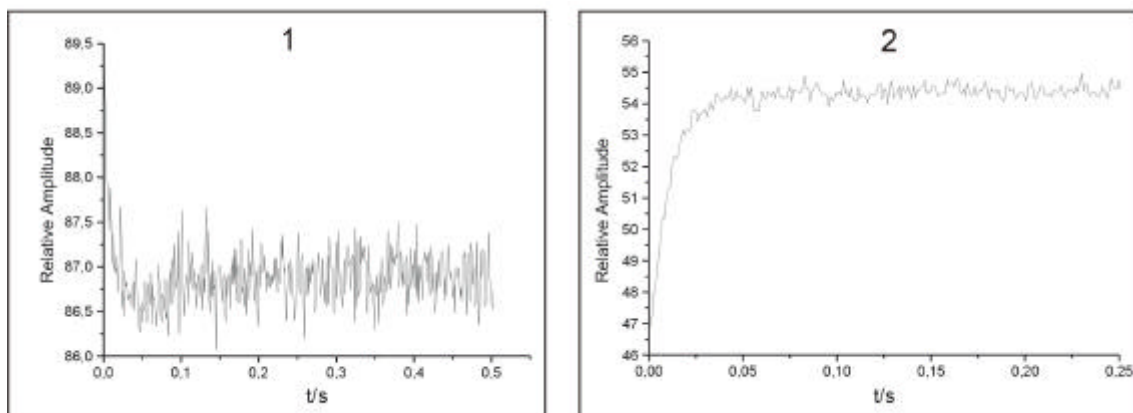


Abb. 34: **1:** Änderung der Dmca-Fluoreszenz bei Bindung von RBD/L91Dmca an Ras·GppNHp, c_0 (RBD/L91Dmca) = 0,5 μM , c (Ras·GppNHp) = 2 μM , λ_{ex} : 334 nm, λ_{em} > 398 nm; **2:** Änderung der Dmca-Fluoreszenz bei Bindung von RBD/L91Dmca an Ras/Y32W·GppNHp beobachtet durch Energieübertragung vom Trp zum Dmca.

	Reaktion	$k_{\text{diss}}/\text{s}^{-1}$	$k_{\text{ass}}/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	K_{D}/nM
1.	wtRBD + Ras·mGppNHp*	7,4	$4,5 \times 10^7$	160
2.	RBD(ch) + Ras·mGppNHp	5,9	$3,5 \times 10^7$	170
3.	RBD/L91NBD-Dap + Ras·GppNHp	11	$1,8 \times 10^7$	610
4.	RBD/L91NBD/His + Ras·GppNHp	14	$2,6 \times 10^7$	540
5.	RBD/L91NBD/His + Ras·mGppNHp	7,6	$4,2 \times 10^6$	1800
6.	RBD/L91Dmca + Ras/Y32W·GppNHp	10	$2,1 \times 10^7$	480

Tab. 2: Zusammenstellung der kinetischen Daten für die Wechselwirkung von RBD-Proteinen mit H-Ras bei 25°C. *Entnommen aus Sydor et al. (1998);

4.4. Fluoreszenzeigenschaften der RBD/L91NBD-Dap und RBD/L91Dmca

4.4.1. RBD/L91NBD-Dap und RBD/L91NBD/His

Die spektroskopischen Eigenschaften der ortsspezifisch NBD-markierten RBD(51-131) wurden mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Es wurden keine Unterschiede zwischen dem Protein mit und ohne Histag beobachtet. Die Emissionsspektren wurden unter den selben Bedingungen, wie die für die Stopped flow Versuche verwendeten, aufgenommen. In dem Messpuffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT bei pH7,4) zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität der RBD/L91NBD-Dap ($c = 2 \mu\text{M}$) im Komplex mit Ras·GppNHp wesentlich geringer ist, als die der freien RBD/L91NBD-Dap. Es wurde keine Verschiebung des Emissionsmaximums beobachtet (Abb. 35). Der Unterschied der Fluoreszenzintensität betrug etwa 20% der Gesamtintensität. Dies lässt sich durch ein Auslöschen („*Quenching*“) der Fluoreszenz bei Bindung des Ras·GppNHp erklären. Bei Zugabe von Ras·GDP zu einer RBD/L91NBD-Dap-Lösung wurde kein Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften beobachtet.

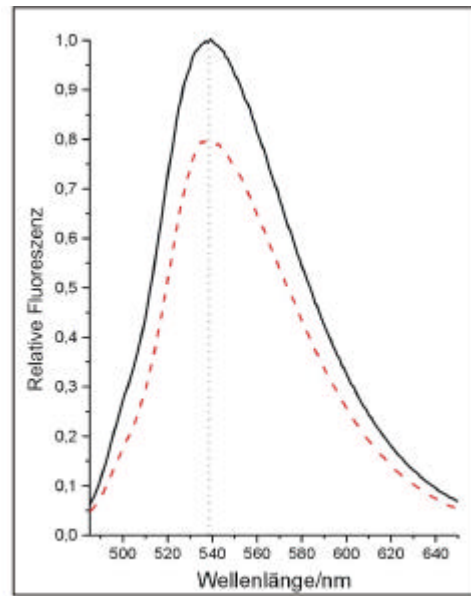


Abb. 35: Emissionsspektrum von RBD/L91NBD-Dap im Komplex mit Ras-GppNHp (rot, gestrichelt) und ohne Ras-GppNHp (schwarz). Die gepunktete Linie deutet die Lage des Emissionsmaximums bei 538 nm an. Gemessen bei 25°C und einer Anregungswellenlänge von 465 nm. $c = 2 \mu\text{M}$;

Dieser Unterschied lies sich durch Zugabe von verschiedenen Additiven, wie DMF, DMSO und Hexafluorisopropanol (HFIPA) zum Puffer beeinflussen (Abb. 36). Dabei hatten die polaren, aprotischen Lösungsmittel DMF und DMSO in Konzentrationen bis zu 5% (v/v) den Einfluss, dass der Unterschied zwischen der Fluoreszenz der freien RBD/L91NBD-Dap und der im Komplex mit Ras-GppNHp geringer wird. Die Zugabe von 5% (v/v) HFIPA zu dem Messpuffer bewirkte eine völlige Veränderung des Fluoreszenzverhaltens. Die Fluoreszenzintensität der freien RBD/L91NBD-Dap nahm insgesamt um ca. 40% ab im Vergleich zur Messung in Puffer ohne HFIPA und das Emissionsmaximum zeigte eine hypsochrome Verschiebung von 538 zu 528 nm. Bei Bildung des Komplexes mit Ras-GppNHp verdoppelte sich die Intensität dann allerdings.

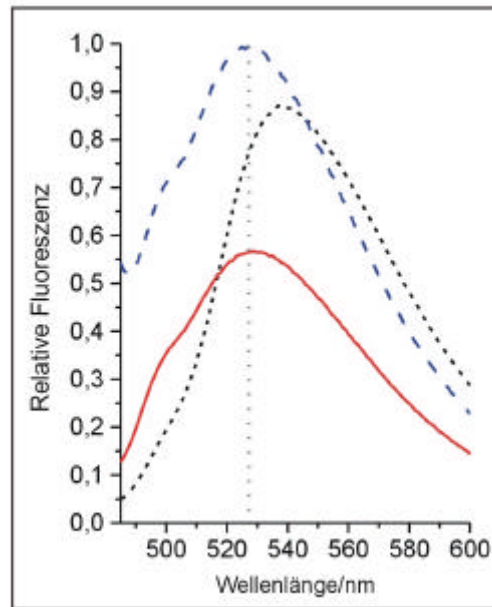


Abb. 36: Emissionspektren der RBD/L91NBD-Dap mit Ras-GppNHp (blau, gestrichelt) und ohne (rot, durchgehend) mit 5% HFIPA im Puffer. Die gepunktete schwarze Linie zeigt zum Vergleich die Emission in Puffer ohne HFIPA. Die gepunktete, senkrechte Linie deutet die Lage des Maximums in Puffer mit 5% HFIPA bei 528 nm an. Gemessen wurde bei 25°C und einer Anregungswellenlänge von 465 nm. $c = 2 \mu\text{M}$;

Diese Inversion des Fluoreszenzverhaltens lässt sich dadurch erklären, dass das HFIPA die Fluoreszenz der NBD-Gruppe quencht und die Bildung des Komplexes aus RBD/L91NBD-Dap und Ras-GppNHp dazu führt, dass die NBD-Gruppe von dem Quencher abgeschirmt wird. Die Zugabe von Acrylamid als Fluoreszenzquencher zeigte diesen Effekt nicht. Eine Titration der RBD/L91NBD-Dap/His mit verschiedenen Konzentrationen an HFIPA, in Gegenwart und Abwesenheit von Ras-GppNHp, zeigte, dass die größte Änderung der Fluoreszenzintensität im Bereich von 5 bis 7,5% HFIPA auftritt (Abb. 37). Im Bereich über 10% HFIPA wird die Veränderung der Fluoreszenzintensität wieder geringer und die Intensität in Gegenwart von Ras-GppNHp und ohne Ras-GppNHp scheint sich dem gleichen Wert anzunähern, was zu erwarten ist, wenn beide Proteine vollständig entfaltet vorliegen.

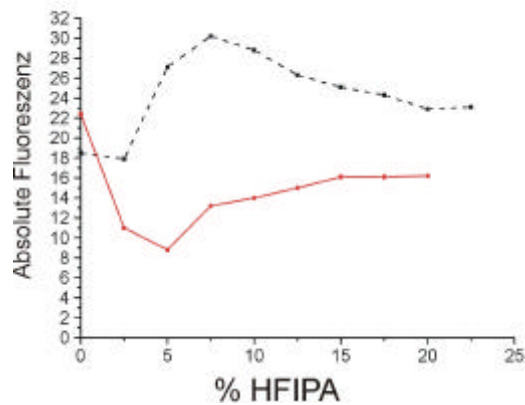


Abb. 37: Titration von RBD/L91NBD-Dap/His mit verschiedenen Konzentrationen von HFIPA in Gegenwart von Ras-GppNHp (schwarz, gestrichelt) und ohne Ras-GppNHp (rot, durchgehend).

Die Fluoreszenzlebensdauer von RBD/L91NBD-Dap wurde ebenfalls im Komplex mit Ras-GppNHp und ohne Ras-GppNHp bestimmt. Dazu wurde ein ISS K2 Multifrequency Phase Fluorometer benutzt und die Fluoreszenzlebenszeiten nach der Frequenzdomänenmethode bestimmt. Dieses Messprinzip beruht darauf, dass das zur Anregung des Fluorophors eingestrahlte Licht eine Sinus-modulierte Intensität einer bestimmten Frequenz besitzt und dass das emittierte Licht im Vergleich dazu eine Phasenverschiebung und Demodulation aufweist, die darauf zurückzuführen ist, dass der Fluorophor für einen gewissen Zeitraum im angeregten Zustand verweilt (Lakowicz, 1999). Die verwendete Frequenz sollte dabei vergleichbar mit der reziproken Lebensdauer sein. Mit Hilfe dieser Verschiebung bzw. Demodulation, gemessen bei verschiedenen Frequenzen zwischen 10-220 MHz und dem Vergleich mit den Daten eines Referenzfluorophors mit bekannter Lebensdauer, kann die Lebensdauer bestimmt werden. Als Referenz wurde der Fluorophor Popop benutzt, der in einer gesättigten Lösung in Ethanol im Wellenlängenbereich von 350-530 nm eine Lebensdauer von 1,350 ns besitzt. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software CFS_LS vom „Center of Fluorescence Spectroscopy“ gefittet. Für die RBD/L91NBD-Dap war der verwendete Referenzfluorophor Popop nicht ideal, da er nur eine sehr geringe Emissionsintensität bei Anregungswellenlängen zwischen 405 und 470 nm aufweist. Die Fluoreszenzlebensdauer der freien RBD/L91NBD-Dap ($c = 2 \mu\text{M}$) in einem Puffer aus 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl_2 und 2,5 mM DTT bei pH 7,4 betrug $4,2 \pm 0,8$ ns. Der relativ große Fehler ist auf die, für den benötigten Wellenlängenbereich, unpassende Referenzprobe zurückzuführen. Für den Ras-GppNHp-RBD/L91NBD-Dap-Komplex ($c = 2 \mu\text{M}$) wurde eine Lebensdauer von $2,8 \pm 0,4$ ns bestimmt, was deutlich zeigt, dass sich

der angeregte Zustand des Fluorophors im Komplex wesentlich schneller abbaut, als in der freien RBD/L91NBD-Dap. Diese deutliche Änderung der Fluoreszenzlebensdauer stellt eine weitere Möglichkeit der selektiven Detektion des Ras·GppNHp·RBD/L91NBD-Dap-Komplexes dar.

4.4.2. RBD/L91Dmca

Die mit Dmca ortsspezifisch markierte RBD(51-131) zeigte ein Maximum der Fluoreszenzemission von 424 nm bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm (Abb. 38). Die Messungen fanden unter den oben genannten Bedingungen statt. Die Konzentration der RBD/L91Dmca betrug ebenfalls 2 μ M.

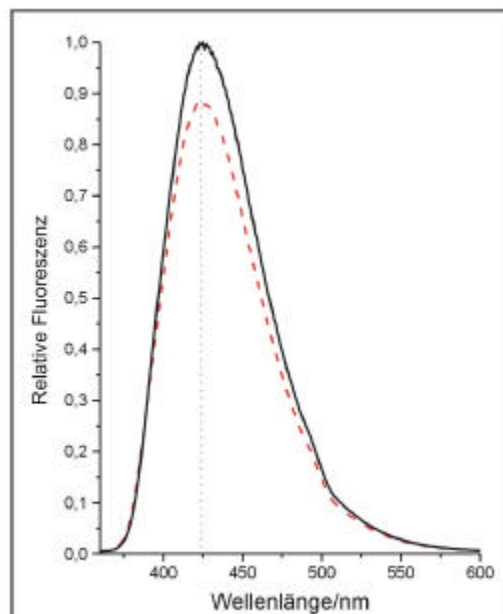


Abb. 38: Emissionsspektrum von RBD/L91Dmca in Komplex mit Ras·GppNHp (rot, gestrichelt) und ohne Ras·GppNHp (schwarz). Die gepunktete Linie deutet das Emissionsmaximum bei 424 nm an. $c = 2 \mu$ M;

Die Fluoreszenzintensität war im Komplex mit Ras·GppNHp nur um 12% geringer, als die der freien RBD/L91Dmca, was auf die geringere Umgebungssensitivität des Fluorophors im Vergleich mit dem NBD-Dap zurückzuführen ist.

Die Fluoreszenzlebensdauermessungen wurden auch mit der RBD/L91Dmca frei in Lösung und im Komplex mit Ras·GppNHp durchgeführt. In diesem Fall war der Fluorophor Popop als Referenz wesentlich besser geeignet und die erhaltenen Werte ließen sich mit einer wesentlich höheren Genauigkeit bestimmen. Die Messungen wurden, wie

oben beschrieben, durchgeführt, nur wurde das Dmca bei 350 nm angeregt. Die erhaltene Lebensdauer für die freie RBD/L91Dmca betrug $5,9 \pm 0,3$ ns (Abb. 39). Dieser Wert veränderte sich allerdings im Komplex mit Ras-GppNHp nicht, was zeigt, dass die Umgebungsveränderung durch die Komplexbildung keinen Einfluss auf den Zerfall des angeregten Zustandes hat.

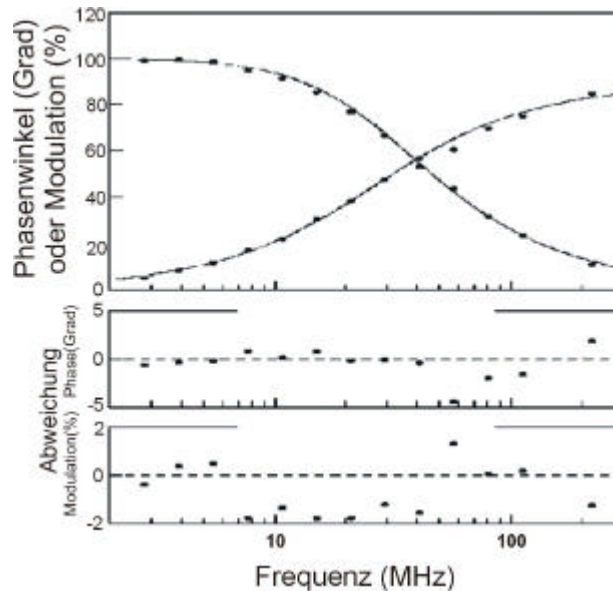


Abb. 39: Fluoreszenzlebensdauermessung mit RBD/L91Dmca ($c = 2 \mu\text{M}$) bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und Popop als Referenzsubstanz (gesättigte Lösung in Ethanol). Die Daten wurden mit einem SIMPLEX-Algorithmus nach der Monte-Carlo-Methode gefittet.

4.5. Immobilisierung der RBD/L91NBD/His auf Ni-NTA modifizierten Oberflächen

Die Entwicklung eines Detektionssystems, das spezifisch Ras in der Triphosphat gebundenen Form erkennt, wäre ein wichtiger Schritt zur Diagnose von Krebserkrankungen, denn wie in der Einleitung beschrieben, treten Ras-Mutationen, die zu einer erhöhten Konzentration von Ras-GTP führen bei ca. 30% aller menschlichen Krebserkrankungen auf. Ein möglicher Weg ein solches Detektionssystem zu entwickeln, ist es, ein natürliches Effektorprotein von Ras zu nutzen, das mit hoher Spezifität an Ras-GTP, aber nur sehr schwach an Ras-GDP bindet. Die RBD ist ein solches Protein und um eine Detektion von Ras-GTP zu ermöglichen, wurde die nicht-codierte AS NBD-Dap als Fluoreszenzmarker in das Protein eingeführt, der durch eine Veränderung der Fluoreszenzintensität die Bindung von Ras-GTP an die RBD/L91NBD-Dap anzeigt. Um dieses System generell anwendbar zu machen und nicht nur auf Stopped flow Versuche

zu beschränken, wurden Modifikationen zur Immobilisierung auf Oberflächen in die RBD eingeführt. Eine Modifikation zur kovalenten Immobilisierung ist die Lävulinsäure, gekoppelt an ein C-terminales Lys der RBD. Allerdings stand noch keine Oberfläche zur Verfügung, die eine kovalente Immobilisierung über die Carbonylfunktion der Lävulinsäure erlaubt hätte. Aus diesem Grund wurde der His-Tag am C-Terminus der RBD genutzt um das Protein auf eine Ni-NTA modifizierte Oberfläche zu binden (Abb. 40). Der K_D -Wert für die Wechselwirkung zwischen Proteinen mit einem His-Tag und dem Ni^{2+} -NTA liegt bei 100 fM (Schmitt et al., 1993) und sollte damit ausreichen um die RBD so an die Oberfläche zu binden, dass die Beladungsdichte für einige Zeit konstant bleibt. Außerdem bietet diese Immobilisierungsmethode den Vorteil, dass die RBD durch Verdrängung mit Imidazol wieder freigesetzt werden kann. Als Oberfläche wurden Ni-NTA beschichtete, opaleszierende Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen der Fa. Pierce oder Qiagen genutzt, die mit verschiedenen Konzentrationen an, mit NBD-Dap und C-terminalen His-Tag versehener, RBD inkubiert wurden.

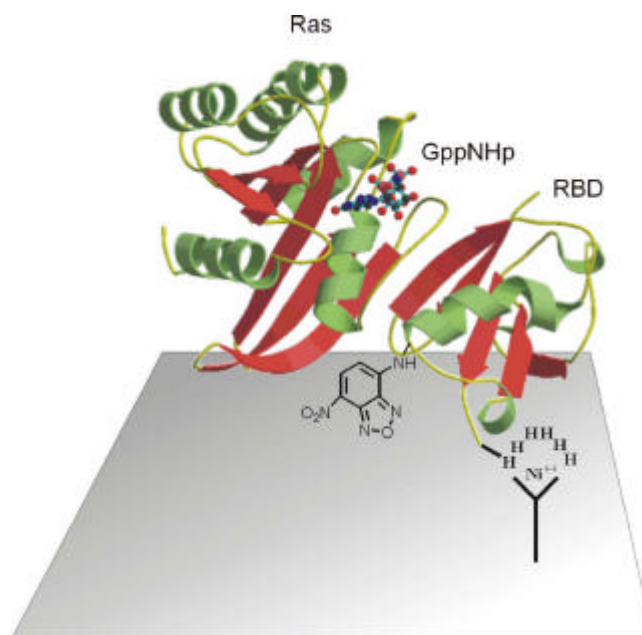


Abb. 40: Schematische Darstellung der Oberflächenimmobilisierung über den C-terminalen His-Tag. Der Fluoreszenzmarker NBD-Dap ist an Position 91 in der RBD gezeigt. Die Struktur des Ras-GppNHp-RBD/L91NBD/His-Komplexes basiert auf der Struktur des Rap1A-GppNHp-RBD-Komplexes, wobei Rap1A ein Ras-homologes Protein ist (Nassar et al., 1995).

Die Bindungskapazität der Mikrotiterplatten beträgt ungefähr 10 pmol/Vertiefung für globuläre 25 kD Proteine (Herstellerangaben). Die Fluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenzscanner von Fluoroskan in jeder Vertiefung gemessen. Dabei wurde eine Anregungswellenlänge von 485 nm und eine Emissionswellenlänge von 538 nm benutzt. Die Messzeit betrug 20 ms pro Vertiefung.

Bei ersten Versuchen traten Probleme mit unspezifischer Bindung der Proteine an die Oberfläche auf, trotz Präinkubation mit BSA-haltigen (0,2%) PBS Puffer (150 mM NaCl, 50 mM KPi, pH 7,4). Dies war besonders auffällig, wenn Kontrollexperimente durchgeführt wurden, bei denen die Oberfläche mit RBD/L91NBD-Dap, also einem Protein ohne His-Tag, inkubiert wurde, denn auch dann trat eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz auf (Abb. 41). Die Proteine wurden alle in einem Puffer aus 100 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT bei pH 7,4 und in einem Volumen von 200 µl/Vertiefung eingesetzt. Die Inkubation mit RBD/L91NBD mit und ohne His-Tag in jeweils mehreren Vertiefungen der Mikrotiterplatte erfolgte über Nacht bei 4°C auf einer Schüttelplatte, oder für 1 h bei RT. Es wurde auch mit RBD/His inkubiert, um einen Einfluss des gebundenen, nicht markierten Proteins auf die Fluoreszenz auszuschließen.

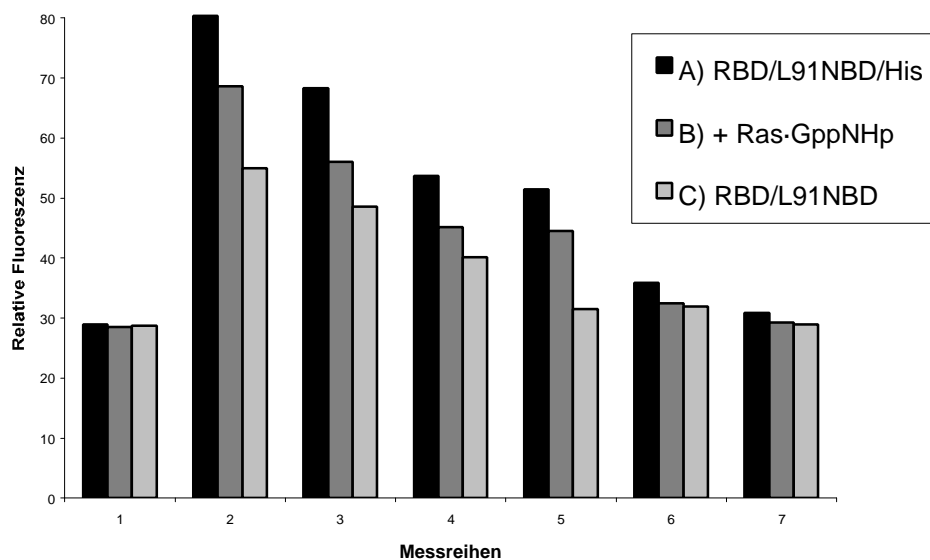


Abb. 41: Darstellung der gemessenen Fluoreszenz auf der Mikrotiterplatte bei $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$. Alle Datenpunkte wurden aus 4 Messungen gemittelt. Beschreibung der Messreihen:

1. Proteinfreier Puffer (200 µl) in der Vertiefung und C) mit 15 µM Ras-GppNHp;
2. 15 µM RBD/L91NBD/His (A) + 15 µM Ras-GppNHp (B) und nur 15 µM RBD/L91NBD (C);
3. 5 µM RBD/L91NBD/His (A) + 5 µM Ras-GppNHp (B) und nur 5 µM RBD/L91NBD (C);
4. 1 µM RBD/L91NBD/His (A) + 1 µM Ras-GppNHp (B) und nur 1 µM RBD/L91NBD (C);
5. 500 nM RBD/L91NBD/His (A) + 500 nM Ras-GppNHp (B) und nur 500 nM RBD/L91NBD (C);

6. 100 nM RBD/L91NBD/His (A) + 100 nM Ras-GppNHp (B) und nur 100 nM RBD/L91NBD (C);
7. 10 nM RBD/L91NBD/His (A) + 10 nM Ras-GppNHp (B) und nur 10 nM RBD/L91NBD (C);

Nach der Inkubation mit den RBD-Proteinen wurde jeweils mit Puffer gewaschen und dann die Fluoreszenz gemessen. Für alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden Volumina von 200 μ l/Vertiefung eingesetzt. Bei diesen Messungen lagen die Werte für die Hintergrundfluoreszenz in den Vertiefungen ohne fluoreszenzmarkiertes Protein, aber mit Puffer, bei Werten zwischen 28 und 30 relativen Einheiten (Abb. 41, Messreihe 1). Die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der RBD/L91NBD/His zeigte eine Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz nach dem Spülen, die nur im Bereich zwischen 0,5 und 2 μ M konstant war und bei Konzentrationen $<$ 250 nM kaum noch über der Hintergrundfluoreszenz lag (Abb. 41, Messreihen 2-7, A). Die Zugabe von Ras-GppNHp in Konzentrationen, die denen der RBD/L91NBD/His entsprachen, führte immer zu einer Abnahme der Fluoreszenz, wobei diese Abnahme allerdings bei RBD/L91NBD/His-Konzentrationen, die bei der Inkubation weit unter 0,5 μ M lagen, nicht mehr signifikant war (Abb. 41, Messreihen 2-7, B). Die Zugabe von Ras-GDP führte zu keinen signifikanten Änderungen in der Fluoreszenzintensität.

Probleme traten durch die starke unspezifische Bindung der RBD/L91NBD an die Oberfläche der Mikrotiterplatte auf. Dieses Protein sollte durch das Waschen mit Puffer wieder völlig entfernt werden, was aber nicht gelang. Es wurde eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration der RBD/L91NBD mit der inkubiert wurde beobachtet, die im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 15 μ M RBD-Protein immer wesentlich schwächer war, als die Fluoreszenzintensität in den Vertiefungen, die mit RBD/L91NBD/His inkubiert wurden, aber immer noch deutlich über der Hintergrundfluoreszenz lag (Abb. 41, Messreihen 2-7, C). Der Grund für die hohe unspezifische Bindung der RBD/L91NBD hätte darin bestehen können, dass in der Aminosäuresequenz des Proteins drei Histidinreste vorkommen, wobei zwei nur durch eine AS getrennt sind (siehe Abb. 11). Diese Histidinreste hätten ähnlich wie ein Histag mit der Ni-NTA-Oberfläche wechselwirken können, wobei die Wechselwirkung aber wesentlich schwächer sein sollte. Falls die hohen Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit RBD/L91NBD auf diese semispezifische Wechselwirkung zurückzuführen waren, hätte die schwach gebundene RBD/L91NBD durch waschen mit Imidazol-haltigem Puffer entfernt werden können. Verschiedene Versuche die gebundene RBD/L91NBD

durch Waschen mit Imidazolkonzentrationen von 25 bis 100 mM zu entfernen, gelangen aber nicht.

Die fast vollständige Unterdrückung der unspezifischen Bindung der RBD/L91NBD wurde durch Präinkubation der Mikrotiterplatten mit einem Puffer aus 150 mM NaCl, 50 mM KPi bei pH 7,4 und 5% Magermilchpulver für 2 h bei RT erreicht (Abb. 42). Danach wurde zweimal mit Puffer ohne Magermilchpulver gewaschen. Nach dem Aufbringen der RBD-Proteine auf die Oberfläche wurde mit dem selben Puffer ohne Magermilchpulver, aber mit 0,05% Tween 20 gewaschen.

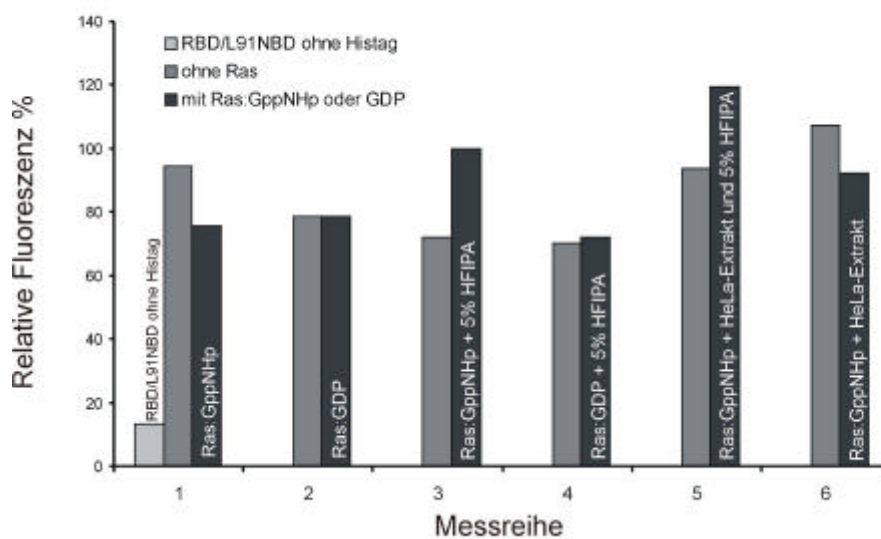


Abb. 42: Erhaltene Daten aus den Fluoreszenzmessungen auf der Oberfläche mit Ras-GppNHp (Reihen 1 und 3 in grau) und mit Ras-GDP (Reihen 2 und 4 in grau), sowie ohne diese Proteine (in schwarz). Der hellgraue Balken in Messreihe 1 zeigt die Hintergrundfluoreszenz, die vom unspezifisch gebundener RBD/L91NBD verursacht wird. Die Messreihe 3 wurde mit 5% HFIPA im Puffer durchgeführt. Die Messreihen 5 und 6 zeigen Messungen in Gegenwart von HeLa-Zellextrakt.

Die Messung der Fluoreszenz in Gegenwart von Ras-GppNHp zeigte deutlich, dass der Komplex mit der gebundenen RBD/L91NBD/His entsteht. Der Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten war vergleichbar mit dem in Lösung (Abb. 42). Die Fluoreszenzintensität ging im RBD/L91NBD/His-Ras-GppNHp-Komplex um ca. 20% zurück (Abb. 42, Messreihe 1). Die Zugabe von Ras-GDP rief keine Veränderung der Fluoreszenzintensität hervor (Abb. 42, Messreihen 2 und 4). Damit konnte gezeigt werden, dass Ras-GppNHp selektiv nachgewiesen werden kann und das Ras-GDP, als inaktive Form des Ras, mit Hilfe der immobilisierten RBD/L91NBD/His nicht nachgewiesen wird. Die Messungen mit 5% HFIPA im Puffer zeigten, dass der Einfluss

dieses Additivs auf den immobilisierten Proteinkomplex ähnlich dem Einfluss in Lösung ist (Abb. 42, Messreihe 3). Der Unterschied in der Fluoreszenzintensität beträgt ca. 30%.

Die selben Messungen wurden auch in HeLa-Zellextrakt durchgeführt. HeLa-Zellen sind eine menschliche Zelllinie und der Extrakt aus diesen Zellen wurde benutzt, um Messungen von aktiviertem Ras in Gewebeextrakten zu simulieren. Dies erlaubt eine Abschätzung darüber, wie störend sich andere Zellbestandteile bei dem Nachweis von Ras·GTP in Gewebe verhalten. Die Messungen wurden so durchgeführt, dass die Zellextrakte mit verschiedenen Konzentrationen an Ras·GppNHp versetzt wurden und dann wurde die Veränderung der Fluoreszenzintensität gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Zellextrakte eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz auftritt, die die Gesamtintensität erhöht. Allerdings sind die Änderungen der Fluoreszenzintensität vergleichbar mit denen bei Messungen ohne Zellextrakt (Abb. 42, Messreihen 5 und 6). Die Nachweisgrenzen für das Ras·GppNHp bei Messungen in Zellextrakten sinkt allerdings im Vergleich zu Messungen im sonst verwendeten Puffer von 300 auf 500 nM ohne HFIPA und von 500 auf 800 nM mit 5% HFIPA.

Um zu prüfen, ob dieser Nachweis auch für Ras-Mutanten mit verlangsamter Hydrolyse von GTP funktioniert, wurde die onkogene Ras/Q61L-Mutante in der GTP-Form anstelle des Ras·GppNHp in den oben beschriebenen Experimenten eingesetzt. Das Ras/Q61L wurde in der GDP gebundenen Form in *E. coli* exprimiert und nach der Aufreinigung wurde ein Nukleotidaustausch gegen GTP durchgeführt (siehe 3.3.4.). Die Hydrolysegeschwindigkeit dieser Ras-Mutante ist 65mal langsamer, als die des normalen Ras und somit bleibt ein Teil des Ras/Q61L wesentlich länger in der aktiven, GTP gebundenen Form (Ahmadian et al., 1999). Die durchgeführten Messungen auf der Oberfläche zeigen deutlich, dass die immobilisierte RBD/L91NBD/His auch Ras/Q61L·GTP selektiv bindet. Die Fluoreszenzänderung entspricht ebenfalls der, die bei Bindung von Ras·GppNHp auftritt (Abb. 43).

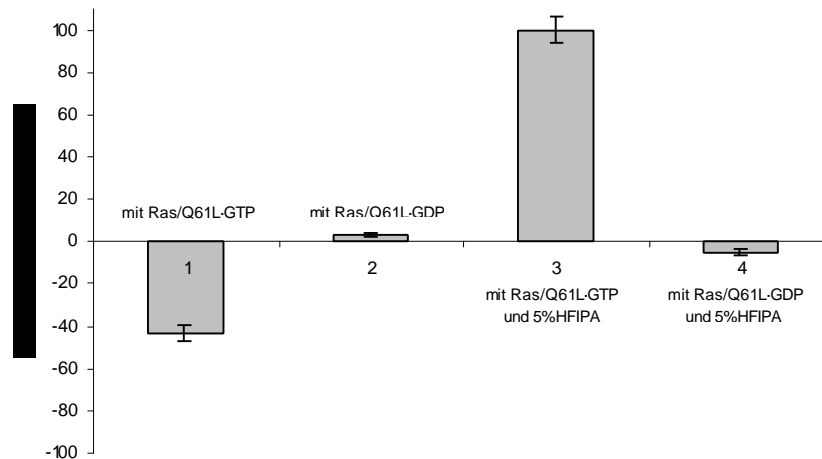


Abb. 43: Darstellung der Fluoreszenzänderung auf der Oberfläche bei Zugabe von Ras/Q61L-GTP bzw. Ras/Q61L-GDP zu immobilisierter RBD/L91NBD/His ohne und mit 5% HFIPA im Puffer.

Die Zugabe von Hexafluorisopropanol zeigte einen ähnlichen Effekt, wie in Lösung, d.h. das Fluoreszenzverhalten kehrte sich um. Bei Zugabe des Ras/Q61L-GTP zur immobilisierten RBD/L91NBD/His und Bildung des Komplexes in Gegenwart von 5% HFIPA im Puffer stieg die Fluoreszenz um 100% an. Diese Messungen wurden wieder bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 538 nm durchgeführt. Bei Betrachtung des Emissionsspektrums der RBD/L91NBD/His im Komplex und ohne Ras-GppNHp (Abb. 36) wird deutlich, dass die größte Veränderung in der Fluoreszenzemissionsintensität bei einer kleineren Wellenlänge von ca. 495 nm liegt. Bei dieser Wellenlänge beträgt die Fluoreszenzänderung ca. 250%, was die Detektion des Ras-GppNHp bzw. Ras/Q61L-GTP vereinfachen würde und die Empfindlichkeit des Nachweis steigern würde. Die vorhandenen Filterpaare für das Fluoroskangerät ließen keine Messungen bei dieser Wellenlänge zu.

Bei Verwendung von 5% HFIPA im Puffer ist die benötigte Konzentration an aktivem Ras, um einen eindeutigen Nachweis der Bindung an die immobilisierte RBD/L91NBD/His durch die Veränderung der Fluoreszenzintensität zu erhalten, etwas erhöht im Vergleich zu den Messungen ohne HFIPA. Die Grenzkonzentration an benötigtem aktiven Ras liegt bei Messungen ohne HFIPA bei ungefähr 300 nM, wobei auch dann schon ein Verlust an Signalstärke, d.h. in der Veränderung der Fluoreszenzintensität, auftritt. Bei Messungen mit 5% HFIPA im Puffer steigt die benötigte Konzentration auf ca. 500 nM aktives Ras an. Es war nicht möglich einen K_D -Wert in Gegenwart des HFIPA zu bestimmen, da kein adäquates Signal im Stopped Flow Gerät erhalten wurde.

4.6. Chemische Totalsynthese von C-terminal verkürztem H-Ras

Das C-terminal verkürzte H-Ras sollte vollständig chemisch synthetisiert werden, um zu zeigen, dass aus diesen chemisch hergestellten, miteinander wechselwirkenden Proteinen (Ras und RBD) ein funktionsfähiges biologisches System generiert werden kann. Beide Proteine dieses Systems können dann nahezu beliebig modifiziert werden, ohne die Beschränkungen, die normalerweise für die Expression von Proteinen in Organismen gelten, zu beachten. Dies schließt z.B. den ortsspezifischen Einbau von Fluoreszenzmarkern in die Proteine ein.

Die Synthese von C-terminal verkürztem Ras, das aus 166 Aminosäureresten besteht, kann nicht, wie die Synthese der RBD-Proteine, in zwei Segmenten erfolgen. Die dafür benötigten langen Peptidsegmente können nur mit sehr hohem Aufwand hergestellt werden. Aus diesem Grund wurden drei Peptidsegmente synthetisiert, die die vollständige Aminosäuresequenz des Ras umfassen. Das Ras wurde dann daraus in zwei Ligationsschritten synthetisiert. Dabei war es notwendig, dass die N-terminale AS des 2. und 3. Segments jeweils ein Cystein ist und dass die C-terminale AS von Peptid 1 und 2 einen Thioester aufweist.

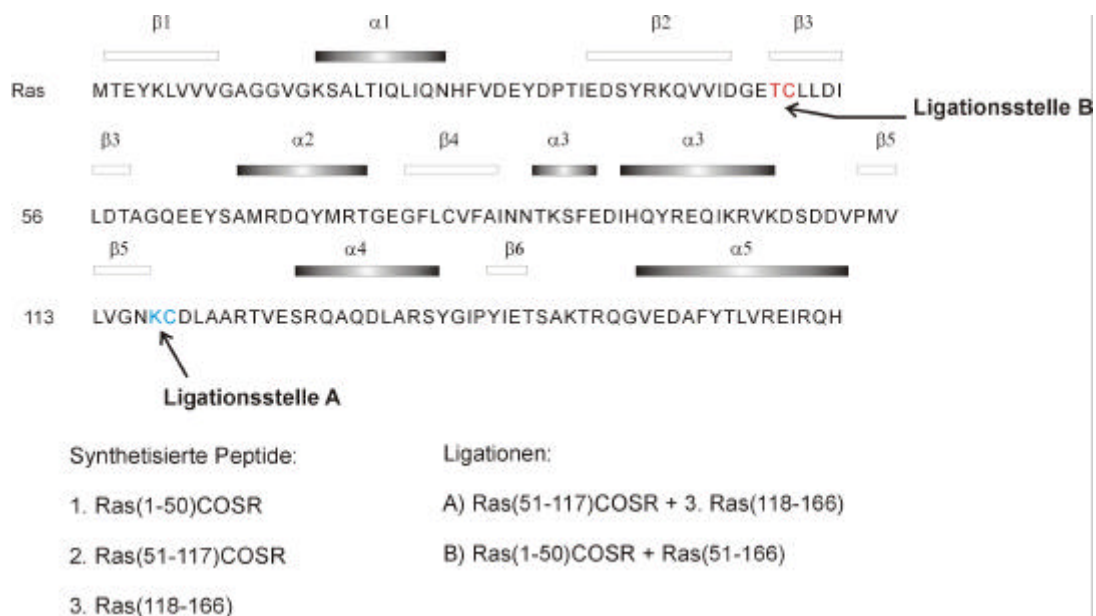


Abb. 44: Synthesestrategie für Ras. Über der Aminosäuresequenz sind die Sekundärstrukturelemente gekennzeichnet (α = α -Helix; β = β -Faltblatt). Die synthetisierten Ras-Segmente werden gezeigt und auch die durchgeführten Ligationen. COSR = C-terminaler Thioester;

In der C-terminal verkürzten Sequenz des Ras-Proteins treten an den Positionen 51, 80 und 118 Cysteinreste auf, die für Ligationsreaktionen zur Verfügung stehen (Abb. 44). Damit ist die Synthesestrategie für das N- und C-terminale Segment vorbestimmt. Es wurden die Segmente von AS 1-50 und 118-166 synthetisiert, wobei eine Ligation mit Threonin, als sterisch gehinderter AS am C-Terminus, wie es beim 1. Ras-Segment auftritt, erstmals durchgeführt wurde. Diese Ligationsreaktion wurde vor der Synthese der Peptide mit zwei verkürzten Testpeptiden gleicher Sequenz durchgeführt und es zeigte sich, dass die Ligation zwar langsamer verläuft, als bei nicht sterisch gehinderten AS, aber trotzdem nach 20 h Reaktionszeit vollständig war. Die Synthese von Peptiden mit einer Länge von 50 bzw. 49 AS ist problemlos möglich. Ein Problem stellte allerdings das mittlere Peptidsegment dar. Es umfasst 67 AS was, auch abhängig von der Sequenz, nahe am Syntheselimit für Peptide liegt. Aus diesem Grund wurde überlegt, ob eine Synthese in vier Segmenten sinnvoll wäre, d.h. dass das mittlere Peptidsegment an dem Cys 80 in zwei kleinere Segmente geteilt wird. Dies würde bedeuten, dass drei Ligationsschritte durchgeführt werden müssten, um Ras(1-166) zu erhalten. Der Nachteil, der durch jeden zusätzlichen Ligationsschritt entsteht, bezüglich der großen Verluste durch zusätzliche Aufreinigungsschritte, ist jedoch größer als der Syntheseaufwand für ein Peptid aus 67 AS. Aus diesem Grund wurde ein Peptidsegment von AS 51-117 synthetisiert und das Ras(1-166) in zwei Ligationsschritten hergestellt. Das 2. Segment von AS 51-117 musste an der Thiolgruppe des N-terminalen Cys-Restes eine Acm-Schutzgruppe aufweisen, um eine intramolekulare Zyklisierung des Peptids bzw. eine Dimerisierung zu vermeiden.

4.6.1. Synthese von Ras(1-50)

1 H₂N-MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVID
GET-COSR 50

M = 5881 g/mol [mit His(DNP) und Thioester]

Die Synthese des N-terminalen Ras-Segments erfolgte im 0,2 mmol-Maßstab an einem speziellen Thioesterharz durch manuelle Synthese. Die Kopplung der 1. AS und die Kettenverlängerung erfolgte wie bereits für die RBD-Peptide beschrieben. Das Peptid-Harz wurde nach abgeschlossener Synthese getrocknet und mit trockenem HF vom Harz

abgespalten. Das lyophilisierte Rohpeptid wurde dann über eine präparative C4-Säule gereinigt.

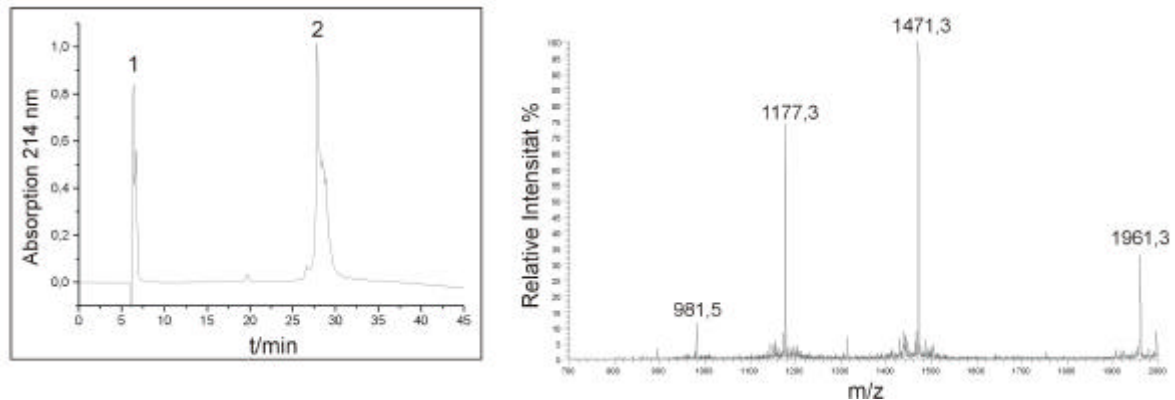


Abb. 45: HPLC-Chromatogramm und MS des aufgereinigten Ras(1-50). Der 1. Peak wird durch Guanidinium aus dem verwendeten Puffer verursacht. HPLC-System 1, mit analytischer C4-Säule (4);

Der 2. Peak im HPLC-Chromatogramm entspricht dem Ras(1-50), wobei die Verbreiterung des Peaks auf eine teilweise Abspaltung der DNP-Gruppe vom His27 zurückzuführen ist (Abb. 45). Das MS des aufgereinigten Ras(1-50) zeigt die Peaks der Ladungszustände des Peptids mit 3 bis 6 positiven Ladungen pro Molekül bei 1961,3, 1471,3, 117,3 und 981,5 m/z, was einer relativen Masse von 5881 g/mol entspricht. Diese Masse stimmt sehr gut mit der berechneten überein. Die erhaltene Menge beträgt 59 mg, was einer Ausbeute von 5% bezogen auf den Synthesemaßstab entspricht.

4.6.2. Synthese von Ras(51-117)

51 H₂N–CLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHQYR
EQIKRVKDSDDVPMVLVGNK–COSR 117

M = 8171 g/mol [mit Cys51(ACM), His(DNP) und Thioester]

Die Synthese des 2. Ras-Segments von AS 51-117 wurde im 0,21 mmol Maßstab auf einem Peptidsynthesizer durchgeführt. Die Synthese erfolgte an einem speziellen Thioesterharz, der wie für die N-terminalen RBD-Segmente beschrieben mit der 1. AS beladen wurde. Die Kettenverlängerung erfolgte wie bereits beschrieben. Das Peptid wurde nach dem Trocknen des Peptid-Harzes mit HF vom Harz abgespalten und lyophilisiert. Im HPLC-Chromatogramm entspricht der 3. Peak laut MS dem nicht

aufgereinigten Ras(51-117) (Abb. 46). Die extreme Verbreiterung des Peaks ist auf die vielen ähnlichen Nebenprodukte zurückzuführen, die während der Festphasensynthese z.B. durch unvollständige Kopplungsreaktionen entstanden sind. Der Anteil an Nebenprodukten wächst bei der Peptidsynthese mit der Anzahl der Kopplungsschritte. Bei einer Länge von 67 AS und einer theoretischen Ausbeute von 99% pro Syntheseschritt beträgt der Anteil an Zielpeptid nur noch 51%. Die vielen Nebenprodukte erschweren die Aufreinigung und dadurch wird die Ausbeute weiter reduziert.

Im MS treten als Hauptsignale die Peaks bei 2042, 1636, 1363, 1168, 1023 und 910 m/z auf, die den Ladungszuständen von 4 bis 9 positiven Ladungen pro Molekül entsprechen. Die relative Masse von 8170 g/mol, die sich daraus ergibt, stimmt gut mit der berechneten Masse überein. Im MS ist aber auch deutlich zu sehen, dass noch einige andere Peptide vorhanden waren, die während der Aufreinigung entfernt werden mussten.

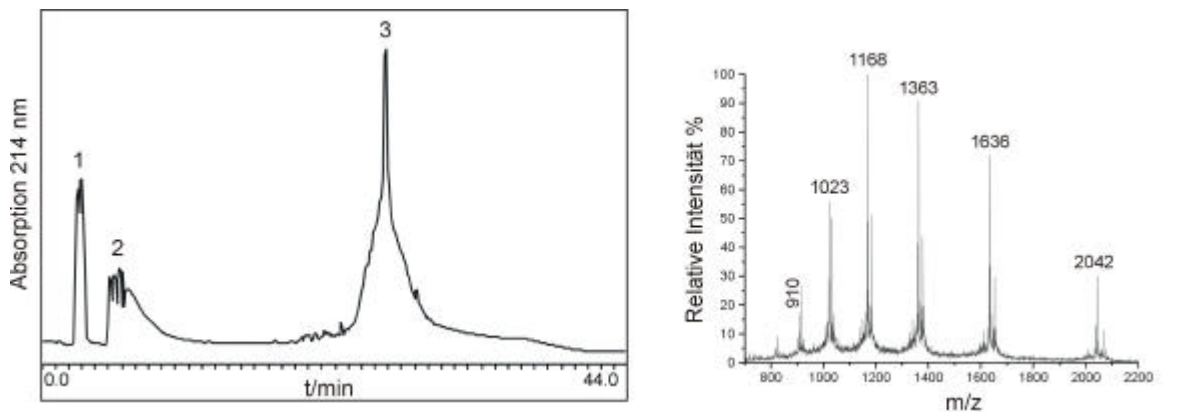


Abb. 46: HPLC-Chromatogramm und MS des nicht aufgereinigten Ras(51-117). Guanidinium verursacht den 1. Peak. Das 2. Signal ist ein Säulenartefakt, das bei HPLC-Läufen mit der analytischen C4-Säule (1) immer aufgetreten ist. HPLC-System 1, mit analytischer Säule (1);

Die Aufreinigung erfolgte, wie schon beschrieben, durch präparative HPLC an einer C4-Säule, wobei das Rohpeptid in einem Puffer aus 6 M Guanidinium, 100 mM NaOAc bei pH 4,0 gelöst wurde. Die Zugabe von Trifluorethanol (TFA) senkte die Löslichkeit des Peptids deutlich ab und deshalb wurde in diesem Fall darauf verzichtet.

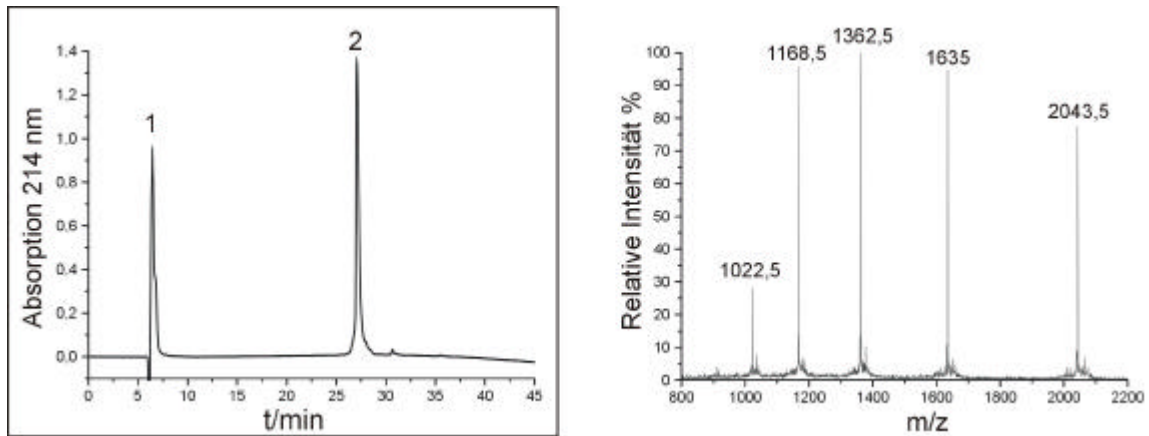


Abb. 47: HPLC-Chromatogramm und MS des aufgereinigten Ras(51-117). HPLC-System 1, mit analytischer Säule (4);

Das Chromatogramm des aufgereinigten Ras(51-117) zeigt nur das Guanidinium-Signal (1) und einen Peak für das Peptid (2). Im MS treten die Massenpeaks von 2043,5, 1635, 1362,5, 1168,5 und 1022,5 m/z auf, die einer relativen Masse von 8170 g/mol entsprechen (Abb. 47). Die Reinheit des Peptids beträgt ca. 98%, ohne Berücksichtigung des Guanidinium-Peaks. Die erhaltene Menge betrug 36 mg, was einer Ausbeute von 2,1%, bezogen auf den Synthesemaßstab, entspricht.

4.6.3. Synthese von Ras(118-166)

118 H₂N-CDLAARTVESRQAQDLARSYGIPYIETSAKTRQGVEDAFYTLVRE
IRQH-COSR 166

M = 6038 g/mol [mit Cys(ACM), His(DNP) und C-terminalem Thioester]

Die Synthese des 3. Ras-Segments umfasst die AS 117-166 und sie wurde an einem speziellem Thioesterharz im 0,2 mmol Maßstab durchgeführt, da kein Boc-His-PAM-Harz zur Verfügung stand. Die 1. AS, das His166(DNP) wurde, wie bereits beschrieben, an das Thioesterharz gekoppelt und die Kettenverlängerung erfolgte mit einem Peptidsynthesizer. Das N-terminale Cys wurde als ACM geschütztes Derivat eingesetzt, um einen Angriff auf den C-terminalen Thioester zu verhindern. Das getrocknete Peptid wurde mit HF vom Harz abgespalten. Dann wurde direkt die DNP-Gruppe abgespalten und der Thioester hydrolysiert, in dem eine 20%ige β -Mercaptoethanol-Lösung

zugegeben wurde. Die ACM-Gruppe wurde, wie unter 3.5.12. beschrieben, mit 1,5 Moläquivalenten Quecksilber(II)-acetat bezogen auf die vorhandenen Thiolgruppen abgespalten. Danach wurde das Peptid über eine präparative C4-Säule aufgereinigt.

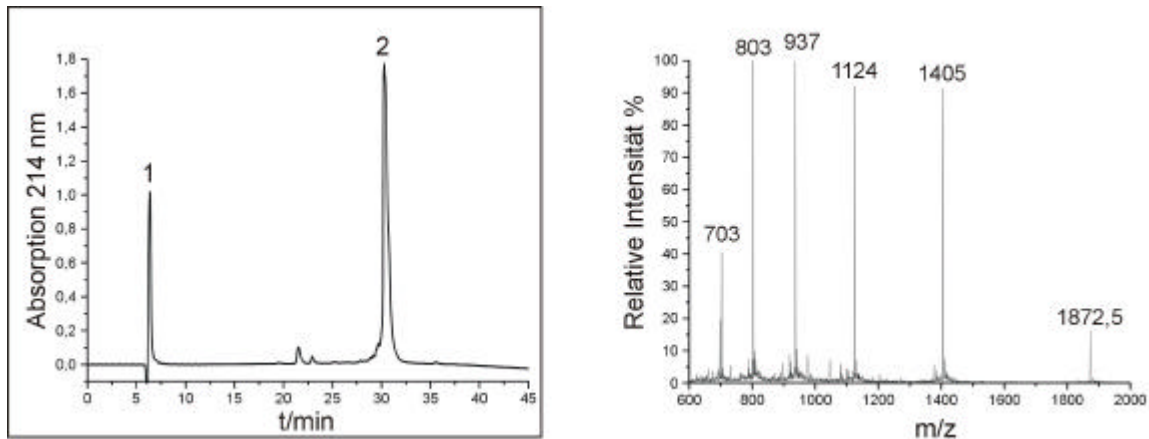


Abb. 48: HPLC-Chromatogramm und MS des aufgereinigten Ras(118-166). Das 1. Signal wird durch Guanidinium verursacht. HPLC-System 1, analytische C4-Säule (4);

Im HPLC-Chromatogramm ist der Peak für das Ras(118-166) (2) zu sehen, das mit einer Reinheit von mehr als 95% erhalten wurde (Abb. 48). Im MS treten die Peaks bei 1872,5, 1405, 1124, 937, 803 und 703 m/z auf, die zu den Ladungszuständen von 3 bis 8 positiven Ladungen pro Molekül gehören und einer relativen Masse von 5615 g/mol entsprechen (Abb. 48). Dies stimmt mit der berechneten Masse überein. Es wurden 57 mg gereinigtes Peptid erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 5,1 % bezogen auf den Synthesemaßstab.

4.6.4. Chemische Ligation der Ras-Peptide

Die Synthese des C-terminal verkürztem Ras(1-166) erfolgte durch chemische Ligation des 2. Ras-Segments (AS 51-117) mit dem 3. Ras-Segment (AS 118-166) und anschließender Ligation mit dem 1. Ras-Segment (1-50). Die 1. Ligation erfolgte wie bereits für die RBD-Proteine beschrieben, in einem Puffer mit 6 M Guanidinium, 100 mM NaPi bei pH 7,0. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt und die Reaktion wurde durch Zugabe von 1% Thiophenol gestartet.

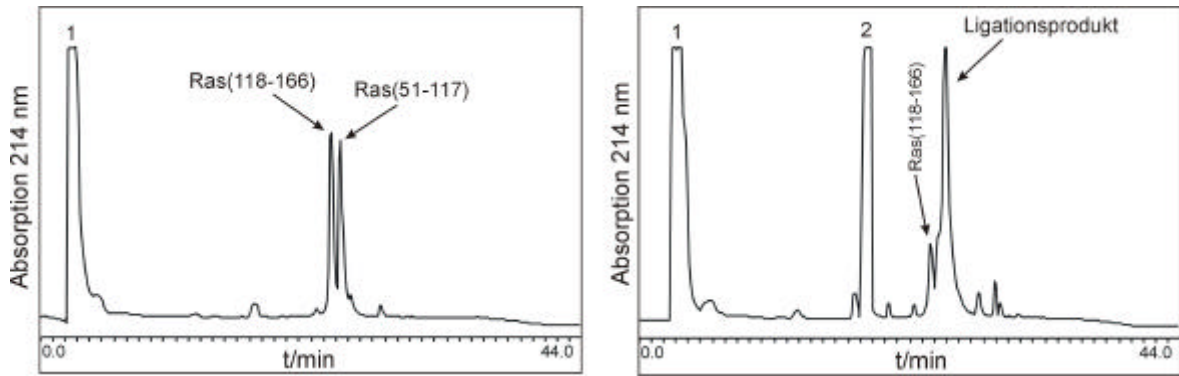


Abb. 49: HPLC-Chromatogramme der Ligation von Ras(51-117) und Ras(118-166). HPLC-System 1, analytische C4-Säule (1);

Der 1. Peak wird jeweils durch das Guanidinium verursacht und der 2. Peak im rechten Chromatogramm durch das Thiophenol, das zum Starten der Reaktion zugegeben wird. Im linken Chromatogramm sind die Peaks der Ras-Segmente vor Zugabe des Thiophenols zu sehen. Rechts ist ein Chromatogramm des Reaktionsgemisches nach 20 h Reaktion in Gegenwart von 1% Thiophenol zu sehen. Nach den 20 h ist ein nahezu vollständiger Umsatz zum Ligationsprodukt zu beobachten und nur wenig Ras(118-166) ist noch vorhanden (Abb. 49). Der als Ligationsprodukt bezeichnete Peak konnte durch Massenspektrometrie eindeutig als Ras(51-166) mit einer ACM-Gruppe am N-terminalen Cys identifiziert werden. Die DNP-Gruppe des His94 wurde durch das Thiophenol während der Ligation abgespalten.

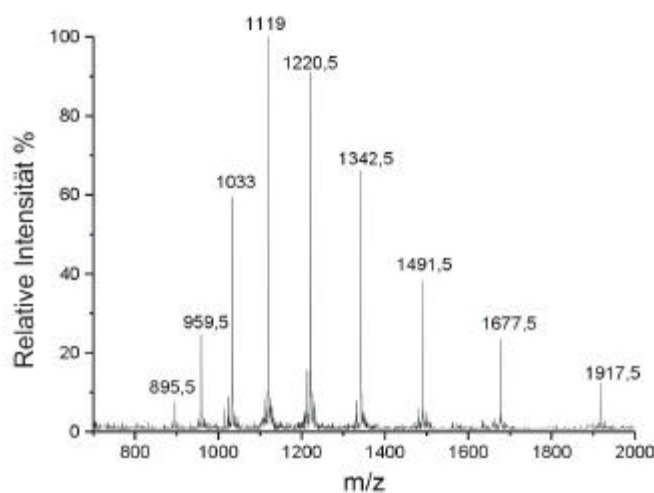


Abb. 50: MS des Ras(51-166) mit ACM-Schutzgruppe am N-terminalen Cys nach der Aufreinigung.

Das MS zeigt Massenpeaks bei 1917,5, 1677,5, 1491,5, 1342,5, 1220,5, 1119, 1033, 959,5 und 895,5 m/z, die Ladungszuständen von 7 bis 15 positiven Ladungen pro Molekül entsprechen (Abb. 50). Die relative Masse von 13416 g/mol, die sich daraus ergibt, stimmt mit der berechneten Masse von 13415 g/mol überein. Die Aufreinigung des Ras(51-166) erfolgte per HPLC über eine präparative C4-Säule. Nach der Aufreinigung wurde die ACM-Gruppe vom N-terminalen Cys abgespalten, um die 2. Ligation durchführen zu können. Die Abspaltung wurde, wie in 3.5.12. beschrieben, durchgeführt, in dem 1,5 Moläquivalente Quecksilber(II)-acetat pro Thiolgruppe im Peptid bei einem pH von 3,5 eingesetzt wurden. Danach wurde das Ras(51-166) wieder über eine präparative C4-Säule aufgereinigt und erst dann für die 2. Ligation eingesetzt (Abb. 51, Peak 3). Die Ausbeute betrug 40% bezogen auf die eingesetzte Menge an Ras(51-117).

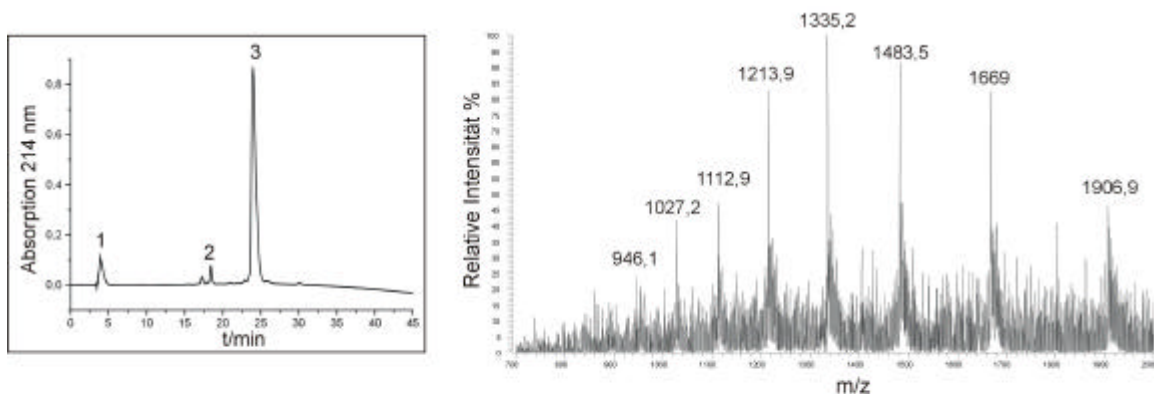


Abb. 51: HPLC-Chromatogramm und MS des aufgereinigten Ras(51-166) ohne ACM-Schutzgruppe. Peak 1 entsteht durch die Injektion und Peak 2 konnte durch MS nicht identifiziert werden. HPLC-System 1, analytische C4-Säule (4);

Die 2. Ligation wurde ebenfalls in 6 M Guanidinium, 100 mM NaPi, pH 7,0 und bei einer Proteinkonzentration von 1,5 mM für das Ras(51-166) und 1,7 mM für das Ras(1-50) durchgeführt. Um die Reaktion zu starten, wurde 1% Thiophenol zugegeben. Bei ersten Ligationversuchen unter diesen Bedingungen bzw. mit höheren Proteinkonzentrationen konnte kein Ligationsprodukt identifiziert werden. Die eingesetzten Peptidmengen an Ras(1-50) und Ras(51-166) wurden laut HPLC-Kontrolle in der Reaktionslösung immer weniger, aber es trat kein neuer Peak auf. Dies veränderte sich nach Zugabe von 1% Dodecyl- β -maltosid zum Ligationsansatz. Die Ligation verlief danach immer noch sehr langsam und wurde nach 48 h und ca. 70% Umsatz des Ras(51-166) abgebrochen, da kein weiterer Reaktionsfortschritt beobachtet werden konnte.

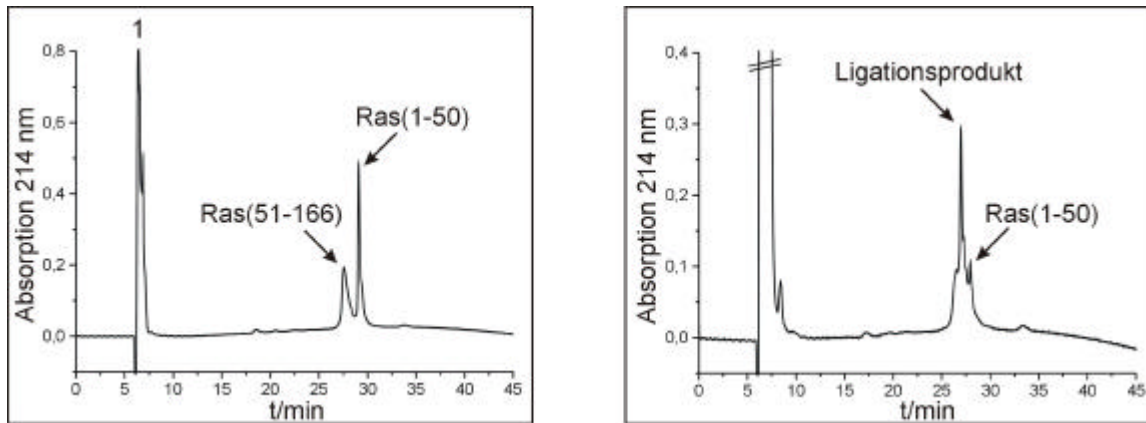


Abb. 52: HPLC-Chromatogramme der Ligation von Ras(1-166) vor Zugabe des Thiophenols (links) und nach 48 h Reaktionszeit.

Im Chromatogramm, vor der Zugabe des Thiophenols zu der Reaktionsmischung, sind die Peaks für die beiden Peptide Ras(51-166) und Ras(1-50) zu sehen. Nach 48 h Reaktionszeit tritt ein dominanter Peak auf, der durch Massenspektrometrie Ras(1-166) zugeordnet werden konnte (Abb. 52). Das im Überschuss eingesetzte Ras(1-50) konnte ebenfalls identifiziert werden (Abb. 52).

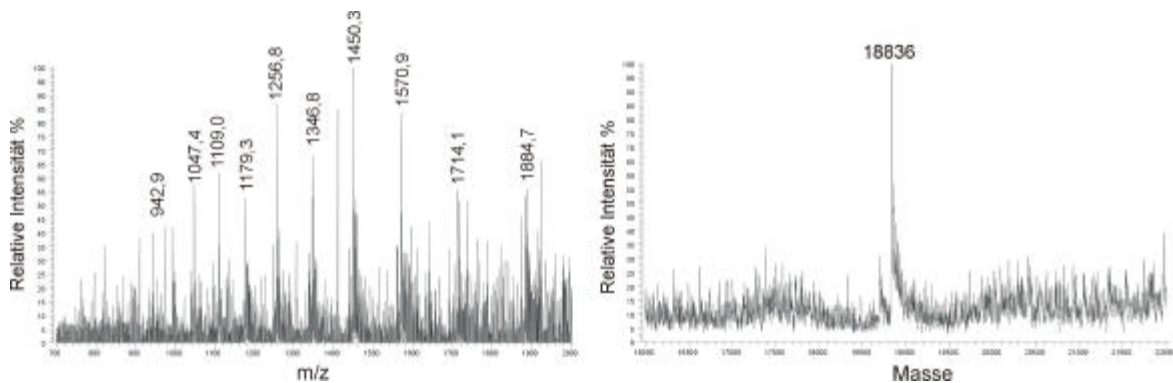


Abb. 53: Massenspektrum von Ras(1-166) (links) und das dekonvolutierte Spektrum (rechts).

Das MS des Ras(1-166) zeigt Signale für die Ladungszustände von 10 bis 20 positiven Ladungen pro Molekül und im dekonvolutierte Spektrum ist die relative Masse des Ras(1-166) mit 18836 g/mol gezeigt (Abb. 53). Dies entspricht nicht der für Ras(1-166) berechneten Masse von 18854 g/mol, sondern liegt 18 Masseneinheiten darunter. Diese 18 Masseneinheiten entsprechen der Masse eines H_2O -Moleküls, was darauf hindeutet, dass das Ras(1-166) während der 2. Ligrationsreaktion, oder bei der Aufreinigung über die HPLC unter sauren Bedingungen ein Wassermolekül verloren hat. Dies wäre z.B. durch die Eliminierung von Wasser aus einer Threonin-Seitenkette möglich (D. Low,

persönliche Mitteilungen). Die Ligationsreaktion und die Reinheit des ligierten Ras(1-166) wurde auch durch SDS-Gelelektrophorese kontrolliert. In der 1. Bahn ist das aufgereinigte Ras(1-166) zu sehen, in der 2. Bahn der gesamte Ligationsansatz nach 24 h und in der 3. Bahn der Molekulargewichtsmarker (Abb. 54). In Bahn 2 sind die Banden für die noch nicht ligierten Ras-Segmente zu erkennen, wobei eines eine Größe von ca. 13 kD hat und das andere von 5 kD.

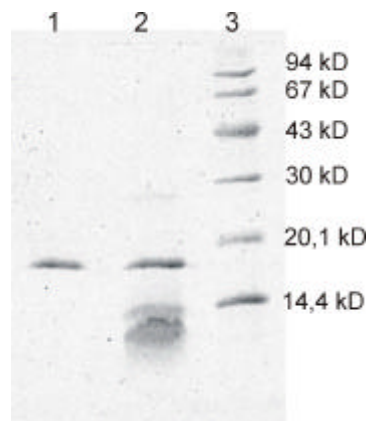


Abb. 54: SDS-Gel des aufgereinigten Ras(1-166) *Bahn 1* und des Ligationsansatzes *Bahn 2*.

Die Aufreinigung des Ras(1-166) erfolgte durch HPLC an einer semipräparativen C4-Säule und es wurden ca. 3 mg Ras(1-166) erhalten, was bezogen auf das Ras(51-166) eine Ausbeute von 10% bedeutet.

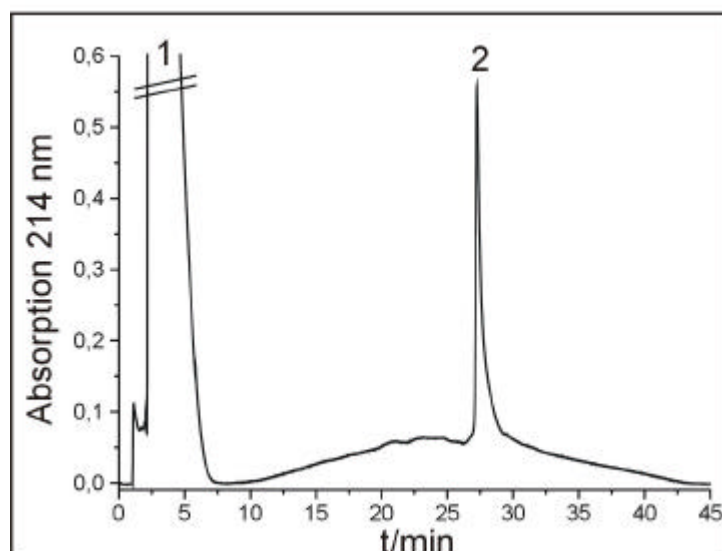


Abb. 55: HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten Ras(1-166). HPLC-System 1, analytische C4-Säule (4);

Im HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten Ras(1-166) waren nur die Peaks für das Guanidinium (1) aus dem Puffer und für das aufgereinigte Ras(1-166) (2) zu sehen (Abb. 55). Die erreichte Reinheit lag bei ca 98%.

4.7. Faltung des Ras(1-166) und kinetische Charakterisierung des synthetischen Proteinsystems aus RBD/L91NBD-Dap und Ras(1-166)

Für die Faltung wurde das Ras(1-166) in einem Puffer aus 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂ bei pH 7,4 suspendiert und ein 50facher Überschuss an GppNHp zugegeben. Es wurde über Nacht bei 4°C langsam gerührt und anschließend wurde das nicht lösliche Protein abzentrifugiert. Der Überstand wurde gegen den oben genannten Puffer über Nacht dialysiert, um überschüssiges GppNHp abzutrennen. Der nicht lösliche Rückstand wurde in einem Puffer mit 5 M Guanidinium aufgenommen, mit einem 50fachen Überschuss an GppNHp versetzt und schnell um das 100fache verdünnt (Netzer und Hartl, 1997). Das restliche Guanidinium und überschüssiges GppNHp wurde durch Dialyse entfernt. Das GppNHp wurde zugegeben, um ein Gerüst für die Faltung vorzugeben und um das Protein zu stabilisieren, da nukleotidfreies Ras nicht stabil ist (Zhang und Matthews, 1998). Aus diesem Grund war auch die Gegenwart von Mg²⁺-Ionen notwendig, da diese zur korrekten Bindung des Nukleotids benötigt werden. Um die korrekte Faltung des chemisch synthetisierten Ras·GppNHp zu kontrollieren wurde ein CD-Spektrum aufgenommen (Abb. 56).

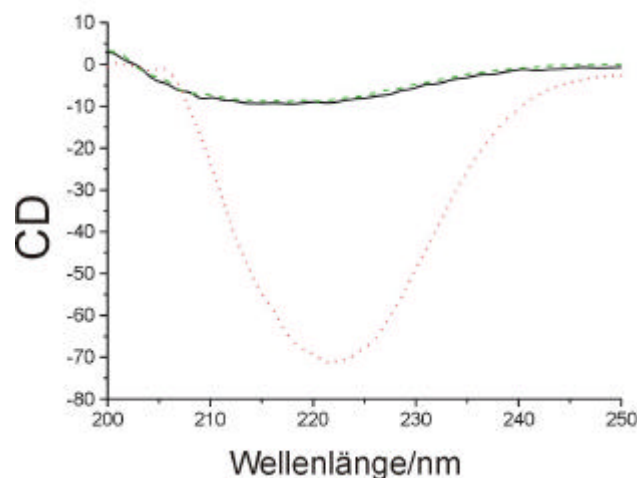


Abb. 56: CD-Spektrum des Ras·GppNHp (rot, gepunktet), des Ras aus einem Faltungsversuch ohne Nukleotid (grün, gestrichelt) und nur der Puffer (schwarz).

Das CD-Spektrum des in Anwesenheit von Nukleotid gefalteten Ras(1-166) zeigte die, für Proteine mit α/β -Faltblatt, typische Absorption bei 223 nm. Das CD-Spektrum der Faltungsversuche ohne Nukleotid zeigte keine Unterschiede zum Spektrum des Puffers, was darauf schließen lässt, dass ohne Nukleotid kein Protein in Lösung geht.

Die weitere Charakterisierung des chemisch synthetisierten Ras·GppNHp erfolgte durch die Untersuchung der Bindung an die RBD. Dies gelang durch Stopped flow Messungen. Diese Experimente wurden mit der synthetischen RBD/L91NBD-Dap durchgeführt, um festzustellen, ob aus diesem vollsynthetische System die von den biosynthetischen Proteinen bekannte biologische Funktion beider Proteine, zumindest *in vitro*, wieder generiert werden kann. Die Stopped flow Experimente wurden wie unter 4.3.2. beschrieben durchgeführt.

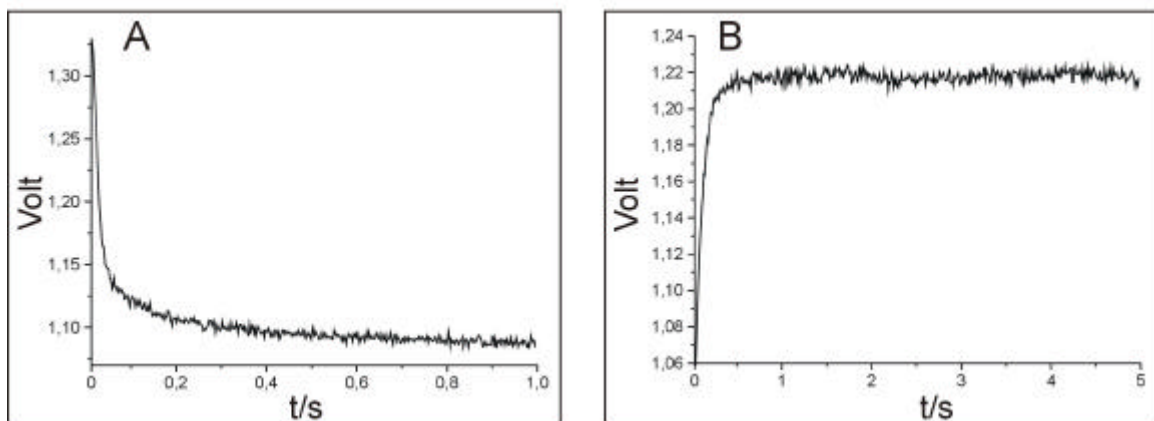


Abb. 57: **A** Änderung der NBD-Fluoreszenz bei Bindung des Ras·GppNHp an die RBD/L91NBD-Dap. c_0 (RBD/L91NBD-Dap) = 0,5 μM , c (Ras·GppNHp) = 4 μM , $k_{\text{obs}} = 112 \text{ s}^{-1}$; **B** Änderung der NBD-Fluoreszenz bei Verdrängung der RBD/L91NBD-Dap aus dem Komplex mit einem 8fachen Überschuss an RBD(ch). c_0 (Ras·GppNHp-RBD/L91NBD-Dap) = 1 μM , $k_{\text{diss}} = 11 \text{ s}^{-1}$;

In der Abb. 57 werden die Stopped flow Signale für die Messung der Assoziation (A) bzw. Dissoziation (B) des synthetischen Ras·GppNHp und der synthetischen RBD/L91NBD-Dap gezeigt. Die erhaltenen Daten sind sehr gut vergleichbar mit denen für die Messungen mit rekombinant hergestelltem Ras. Für die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation ergibt sich ein Wert von $2,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und für die der Dissoziation ein Wert von 11 s^{-1} . Der daraus erhaltene K_D -Wert beträgt 480 nM (Abb. 57 und 58). Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem für rekombinant hergestelltem Ras bestimmten K_D -Werten und zeigt, dass die chemisch synthetisierten Proteine die selbe Funktion erfüllen können, wie biosynthetische Proteine (siehe Tab. 2).

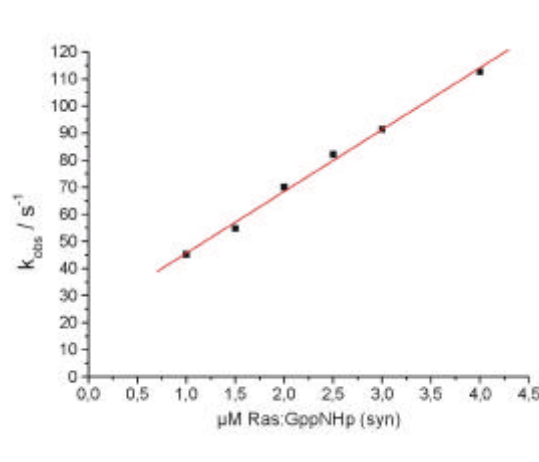


Abb. 58: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) von der Konzentration an synthetischem Ras-GppNHp. Der erhaltene k_{ass} -Wert beträgt $2,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Da die Bindung des Ras-Proteins an die RBD nicht die alleinige Funktion dieses Proteins ist, wurde auch untersucht, ob sich die Nukleotidbindungsdomäne des synthetischen Ras, wie die des rekombinant hergestellten Ras verhält. Dies ist besonders für Ras als „Schalterprotein“ wichtig, da durch die Bindung von GTP oder GDP zwischen dem „An- und Aus-Zustand“ unterschieden wird. Nur im GTP-gebundenen Zustand werden Signale von Ras in das Zellinnere weitergeleitet. Die Untersuchung erfolgte durch ein Verdrängungsexperiment, in dem das nach der Faltung gebundene GppNHp gegen mGDP ausgetauscht wurde. Das mGDP ist ein fluoreszierendes GDP-Derivat, das bei Bindung an Ras eine Fluoreszenzzunahme zeigt. Diese Verdrängung wurde im Stopped Flow Apparat beobachtet (Abb. 59). Es wurden $0,75 \mu\text{M}$ Ras-GppNHp vorgelegt und die Verdrängung erfolgte mit $1,5 \mu\text{M}$ mGDP in Gegenwart von $2,5 \text{ mM}$ EDTA. Das EDTA diente zur Komplexierung der Mg^{2+} -Ionen, wodurch die Dissoziationsgeschwindigkeit des jeweils an Ras gebundenen Nukleotids erhöht wurde, da das Mg^{2+} essentiell für die Nukleotidbindung ist. Der zweifache Überschuss an mGDP reichte nicht aus um eine vollständige Verdrängung des GppNHp zu erreichen, aber ein noch höherer Überschuss hätte die Gesamtfluoreszenz soweit erhöht, dass die Fluoreszenzänderung durch die Bindung an Ras nur schwer zu detektieren gewesen wäre. Zur Kontrolle wurde das gleiche Experiment auch mit rekombinant hergestelltem Ras-GppNHp durchgeführt. Wie aus Abb. 59 zu entnehmen ist, verhalten sich beide Proteine in diesem Versuch gleich. Die Konzentration der Proteine für diesen Versuch wurde mittels HPLC bestimmt. Dies gelang über einen Vergleich der Nukleotidmenge, wobei vorausgesetzt wurde, dass ein 1:1-Komplex aus Ras und Nukleotid vorlag. Die Nukleotidkonzentration wurde durch

Integration der Peakflächen von HPLC-Chromatogrammen bei einer Wellenlänge von 259 nm bestimmt (HPLC-System, wie unter 4.8.3. beschrieben).

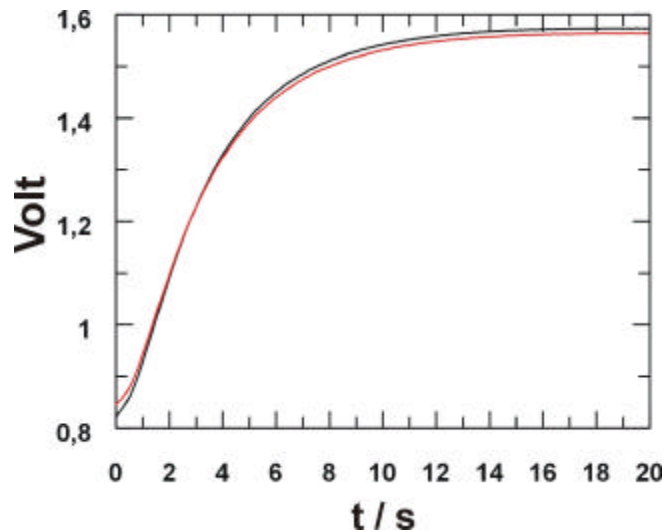


Abb. 59: Verdrängung von GppNHp mit mGDP aus chemisch synthetisiertem (rot) und aus rekombinant hergestelltem Ras (schwarz).

4.8. Semisynthese der C-terminal fluoreszenzmarkierten Proteine Ras und RBD

Das Ras-Protein und die RBD sollten C-terminal mit Farbstoffen markiert werden, die eine Detektion der Wechselwirkung beider Proteine miteinander durch Energieübertragung (FRET) ermöglichen. Der Abstand der C-terminalen Ca-Atome von Ras und RBD beträgt in einem Model des Komplexes aus beiden Proteinen, basierend auf der Kristallstruktur des Rap1A·RBD-Komplexes, ca. 41 Å, was für FRET-Messungen gut geeignet ist (Abb. 60). Die Bildung des Komplexes aus aktiviertem Ras und der RBD sollte durch die Einführung von kurzen Peptiden am C-Terminus nicht beeinflusst werden. Es wurden die Fluorophore Cy5 und Alexa 488 benutzt, die sehr hohe Extinktionskoeffizienten und eine große Photostabilität aufweisen (Mujumdar et al., 1993; Panchuk-Voloshina et al., 1999). Dies sind ebenfalls wichtige Voraussetzung, um Einzelmolekülmessungen mit den markierten Proteinen durchführen zu können, die z.B. für die Suche nach Inhibitoren der Protein-Protein-Wechselwirkung genutzt werden könnten.

Die Markierung der Proteine erfolgte durch Kopplung eines kurzen Peptids, das den Fluorophor trägt, an den flexiblen C-Terminus der Proteine mit Hilfe der nativen

chemischen Ligation. Ras und RBD mit C-terminalem Thioester wurden durch Abspaltung aus einem Intein-Fusionsprotein gewonnen (Abb. 3, S. 6). Die verwendeten Peptide wurden durch Festphasensynthese unter Ausnutzung der Fmoc-Schutzgruppenstrategie hergestellt und die Fluoreszenzmarker wurden, noch vor der Abspaltung von der festen Phase, ortsspezifisch an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes bzw. an die Thiolgruppe eines Cysteinrestes gekoppelt. Die Synthese der markierten Peptide konnte nur in kleinem Maßstab durchgeführt werden, da die verwendeten Fluorophore zwar kommerziell erhältlich, aber sehr teuer sind. Dieser Weg stellt eine Ergänzung zur chemischen Totalsynthese von Ras und RBD dar.

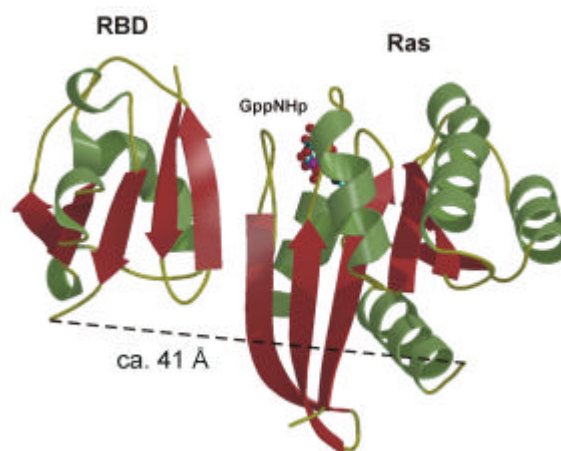


Abb. 60: Model des RBD-Ras-GppNHp-Komplexes basierend auf der Rap1A-RBD-GppNHp-Struktur (Nassar et al., 1995). Der Abstand der C-terminalen Ca-Atome wird durch die gestrichelte Linie angezeigt.

4.8.1. Synthese des Ras/C191_(Alexa 488)/His

Die für das Ras-Protein kodierende DNA-Sequenz wurde über eine *NdeI*- und eine *SapI*-Schnittstelle in den pTXB1-Vektor von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) kloniert, so dass Ras als Fusionsprotein mit einem Intein aus *Mycobacterium Xenopis* und einer Chitin-Bindungsdomäne (CBD) in *E. coli* überexprimiert werden konnte. Das für das Fusionsprotein kodierende Gen steht unter der Kontrolle eines T7-Promoters und in dem verwendeten Plasmid befindet sich ein Gen für Ampicillin-Resistenz. Bei dem verwendeten Intein handelt es sich um ein sogenanntes Mini-Intein, das keine *Homing*-Endonuklease-Aktivität aufweist (siehe Einleitung; Evans et al., 1998).

Nach der Überexpression des Fusionsproteins und dem mechanischen Aufschluss der Zellen in einem Fluidizer wird der lösliche Überstand auf eine Chitin-Matrix aufgetragen,

an die das Fusionsprotein über die CBD bindet (Abb. 61, Bahnen 3 & 4). Damit wird eine Aufreinigung des Fusionsproteins erreicht. Durch Behandlung der Chitin-Matrix mit SDS-haltigem Puffer wird die Chitin-Bindungsdomäne denaturiert, so dass das Fusionsprotein freigesetzt wird. Auf dem SDS-Gel ist nur eine Bande für das Fusionsprotein zu sehen (Abb. 61, Bahn 2). Die Abspaltung des Ras vom Intein zur Generierung eines Proteins mit C-terminalem Thioester, das zur Ligation mit dem Peptid eingesetzt werden konnte, gelang mit Ethanthiol und/oder dem Natriumsalz der 2-Mercaptoethansulfonsäure (MESNA). Nach Behandlung des gebundenen Fusionsproteins mit diesen Thiolen wurde mit SDS-haltigem Puffer die CBD denaturiert, um die Abspaltungseffizienz zu bestimmen. Das SDS-Gel zeigt, dass nach 12 h ca. 50% des Fusionsproteins gespalten wurden. Im Gel treten die Banden des Fusionsproteins, des Inteins und des Ras-COSR auf (Abb. 3 und Abb. 61, Bahn 6).

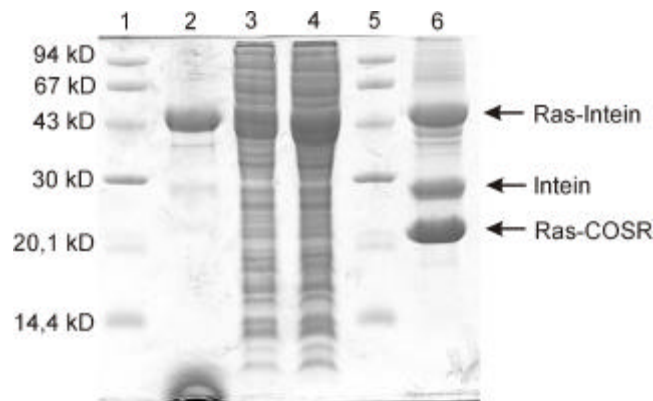


Abb. 61: SDS-Gel der Abspaltung von Ras-COSR vom Intein; *Bahn 1 & 5*: Molekulargewichtsmarker, *Bahn 2*: Überstand der mit Ras-Intein beladenen Chitin-Matrix nach Behandlung mit SDS-haltigem Puffer, *Bahn 3*: Cytoplasmatische Fraktion nach Auftragen des Fusionsproteins auf die Chitin-Matrix, *Bahn 4*: Cytoplasmatische Fraktion nach Aufschluss der Zellen, *Bahn 6*: Überstand der beladenen Chitin-Matrix nach Behandlung mit 4% MESNA (12 h) und anschließend mit SDS-haltigem Puffer.

Bei der Abspaltung mit Ethanthiol wurde der entsprechende C-terminale Thioester des Ras freigesetzt und konnte durch ESI-MS nachgewiesen werden (Abb. 62). Im erhaltenen Massenspektrum treten Peaks auf, die den Ladungszuständen von +11 bis +27 positiven Ladungen pro Molekül entsprechen. Die erhaltene relative Masse von 20385,0 Da stimmt gut mit dem berechneten Wert von 20386,9 Da überein. Der Peak bei 20445,0 Da entspricht einem Protein, das durch die Bildung eines gemischten Disulfids aus Protein und überschüssigem Ethanthiol entstanden ist (Abb. 62).

Das für den folgenden Ligationsschritt verwendete Alexa 488-Peptid wurde von der Fa. Interactiva (Ulm) bezogen und wies einen N- und einen C-terminalen Cysteinrest auf. Die

Thiolgruppe des C-terminalen Cys wurde für die Kopplung des Fluorophors Alexa 488 in der Maleinimid-Form benutzt und das N-terminale Cys wurde für die Ligation benötigt.

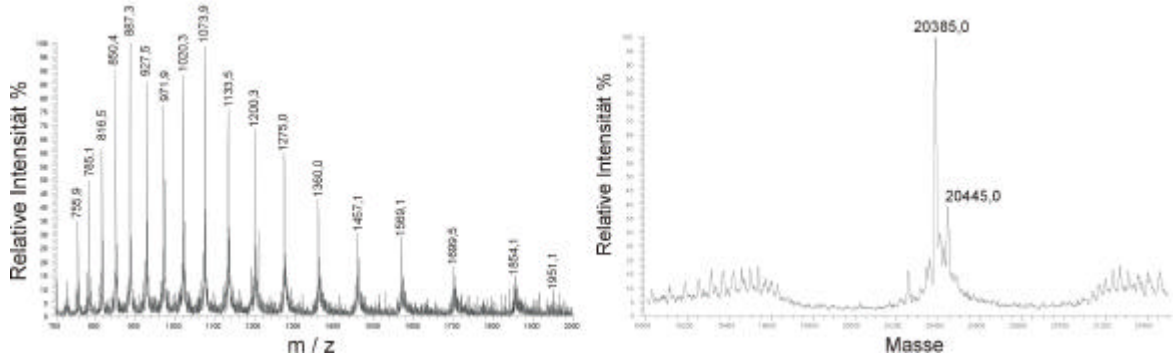


Abb. 62: ESI-MS des abgespaltenen Ras-Thioesters.

Für die Ligrationsreaktionen erwies sich eine Kombination aus 4% Ethanthiol und 3% MESNA in einem Puffer mit 400 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂ und 500 µM GDP bei pH 8,0 als die Bedingungen mit der höchsten Ausbeute bei der Abspaltung und den besten Ligationsergebnissen. Für die Ligrationsreaktionen wurde der Ras-Thioester nach der Abspaltung mit Hilfe einer 10 kD Dialysemembran bis auf ca. 1,5 mg/ml ankonzentriert. Dann wurde das Peptid im 5fachen Überschuss zugegeben und das Ligationsgemisch über Nacht und unter Lichtausschluss bei 4°C geschüttelt (Abb. 63).

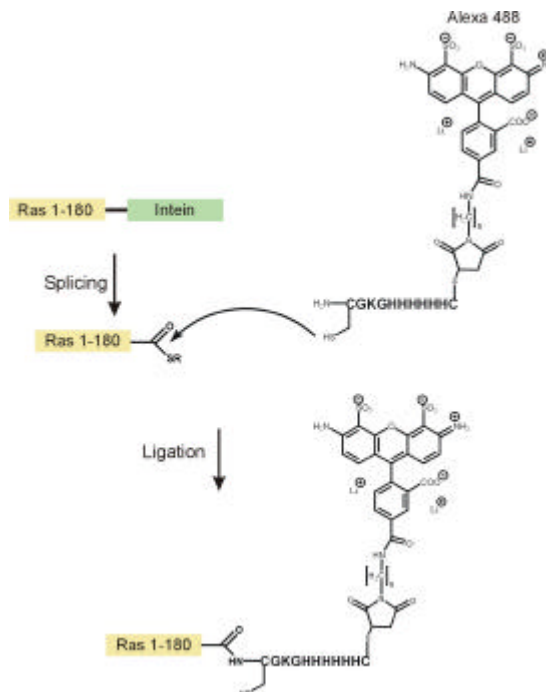


Abb. 63: Schema der C-terminalen Markierung des Ras mit dem Alexa 488-Peptid.

Nach 16 h wurde die Reaktion durch ein SDS-Gel kontrolliert und eine Umsetzung von ca. 50% des Ras-Thioesters zum Ras/C191_(Alexa 488)/His beobachtet (Abb. 64, Bahnen 6 und

7). Ein Fluoreszenzscan des Gels mit einer Anregungswellenlänge von 473 nm und einer bei 520 nm gemessenen Emission zeigt deutlich eine fluoreszierende Bande für das Ras/C191_(Alexa 488)/His, sowie eine zweite, schwächere Bande, die auf Höhe des Ras-COSR läuft (Abb. 64 B). Diese zweite Bande entsteht vermutlich durch freien Fluoreszenzmarker, der bei der Aufreinigung des Alexa 488-Peptid nicht entfernt wurde und vermutlich nicht-kovalent, auf Grund seiner negativen Ladung, an das Ras-COSR bindet. Dies würde auch erklären, dass diese zweite fluoreszierende Bande nach der Dialyse nicht mehr auftritt. Die starke Hintergrundfluoreszenz wird durch das überschüssige Alexa 488 markierte Peptid verursacht.

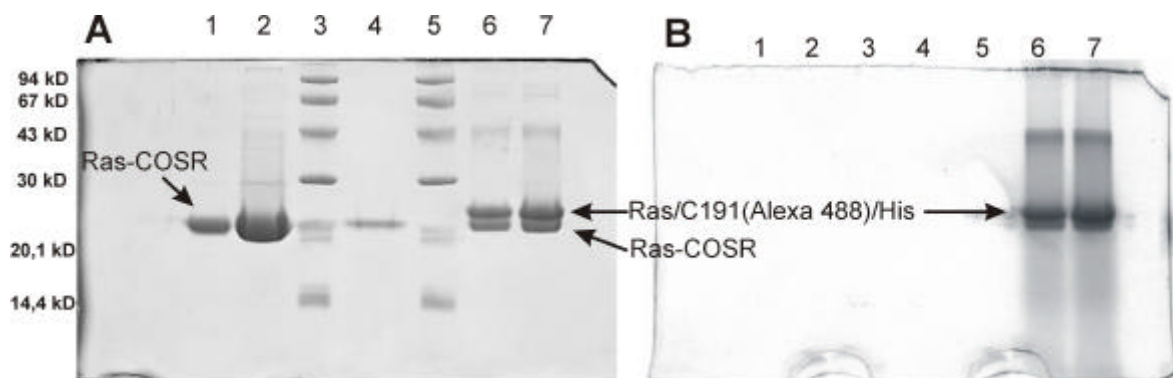


Abb. 64: Kontrolle der Ligationsreaktion von Ras und Alexa 488-Peptid. **A)** *Bahn 1:* 1µl aufkonzentrierter Ras-Thioester nach Abspaltung von der Chitin-Matrix mit Ethanthiol/MESNA; *Bahn 2:* wie 1 nur 5 µl; *Bahn 3 & 5:* Molekulargewichtsmarker; *Bahn 4:* Durchlauf vom Aufkonzentrieren des Ras-COSR; *Bahn 6:* 3 µl des Ligationsansatzes nach 16 h; *Bahn 7:* wie 6 nur 5 µl; **B)** Fluoreszenzscan mit Ex.: 473 nm und Em.: 520 nm; Bahnen wie unter A.

Zur Abtrennung dieses Überschusses wurde eine Dialyse durchgeführt, wobei eine Membran mit einem *cut off* von 12-14 kD eingesetzt wurde. Die Dialyse verlief sehr langsam und wurde durch Bestimmung der Alexa 488-Konzentration im Dialysereservoir kontrolliert. Bei diesem Schritt erfolgte auch ein Austausch gegen einen Puffer aus 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,4. Die Trennung des Ras/C191_(Alexa 488)/His von nicht ligiertem Ras wurde mit Hilfe des His-Tags, der in dem Alexa 488-Peptid enthalten war, durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Matrix erreicht (Abb. 65, Bahnen 4-6). Die Elution des an die Ni-NTA-Matrix gebundenen Proteins gelang mit 250 mM Imidazol. Im Anschluss an die Elution wurde das Imidazol direkt wieder durch eine, bereits oben beschriebenen, Dialyse abgetrennt.

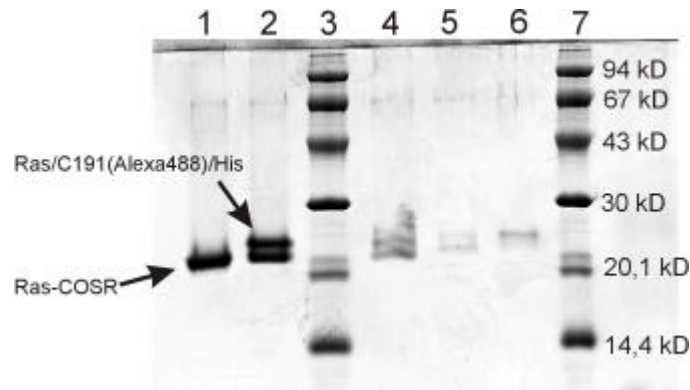


Abb. 65: SDS-Gel nach der Reinigung über die Ni-NTA-Matrix. *Bahn 1*: Ras-Thioester; *Bahn 2*: Ligationsreaktion nach 16 h; *Bahn 3 & 7*: Molekulargewichtsmarker; *Bahn 4*: Durchlauf beim Auftragen auf die Ni-NTA-Matrix; *Bahn 5*: Waschen der Ni-NTA-Matrix; *Bahn 6*: Eluat der Ni-NTA-Matrix nach Entfernen des Imidazol durch Dialyse.

4.8.2. Synthese der RBD/K137_(C₅)/His

Die RBD(51-134) wurde ähnlich wie das Ras als Fusionsprotein mit einem Mini-Intein und einer Chitin-Bindungsdomäne exprimiert. Allerdings erfolgte die Klonierung über eine *Nco*- und *SapI*-Schnittstelle in den pTXB3-Vektor von New England Biolabs (Frankfurt a.M.), da die für die RBD kodierende DNA-Sequenz eine *NdeI*-Schnittstelle enthält, so dass der pTXB1-Vektor nicht benutzt werden konnte. Die Expression und das Auftragen auf die Chitin-Matrix verlief im Wesentlichen wie für das Ras/C191_(Alexa 488)/His beschrieben. Allerdings wurde ein Puffer aus 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 benutzt. Die Abspaltung von der Chitin-Matrix unter Generierung eines C-terminalen Thioesters gelang auch in diesem Fall mit 4% Ethanthiol und 3% MESNA (Abb. 66).

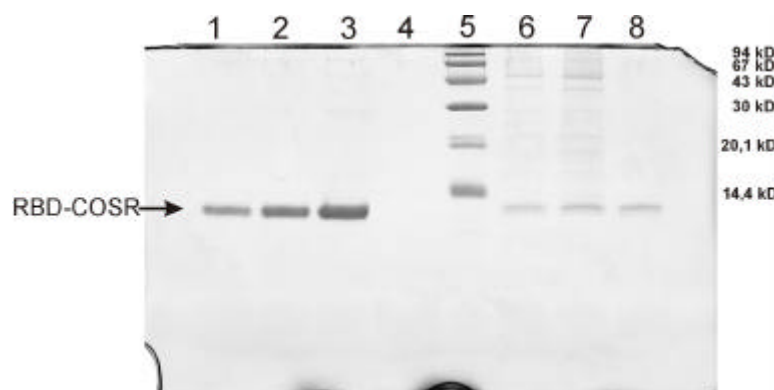


Abb. 66: SDS-Gel (16%ig) zur Kontrolle der Abspaltung der RBD von der Chitin-Matrix mit 4% Ethanthiol und 3% MESNA. *Bahn 1*: 2 µl RBD-COSR direkt nach der Abspaltung; *Bahn 2*: 2 µl RAS-COSR nach dem Aufkonzentrieren; *Bahn 3*: 4 µl Ras-COSR nach dem Aufkonzentrieren; *Bahn 4*: Durchlauf aus dem Konzentrationsschritt; *Bahn 5*: Molekulargewichtsmarker; *Bahnen 6-8*: Spülen der 10 kD *cut off* Membranen, die zum Aufkonzentrieren benutzt wurden, jeweils 10 µl;

Synthese des Cy5-markierten Peptids:

135 H₂N-CGK_(Cy5)GHHHHH-COOH 143

M = 1826 g/mol [mit Cy5 an Lys 137]

Die Synthese des nicht markierten Peptids erfolgte manuell im 0,2 mmol-Maßstab ausgehend von einem Fmoc-His(Trt)-Wang-Harz. Die Fmoc-Gruppe wurde durch Zugabe von 20% Piperidin in DMF entfernt. Die Aktivierung der α -Carboxylgruppen der Aminosäuren erfolgte mit HBTU, wie bereits unter 4.2.1. beschrieben. Die ϵ -Aminogruppe des Lys 137 war mit einer 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl- (Dde) Gruppe geschützt, die selektiv durch 2% Hydrazin in DMF abgespalten werden kann. Nach der Kopplung des N-terminalen Cys, das für die chemische Ligation mit der RBD-COSR benötigt wurde, erfolgte die Entschützung der ϵ -Aminogruppe des Lys 137. Der Fluoreszenzmarker Cy5 wurde dann in der Succinimidylester-Form an diese Aminofunktion gekoppelt, wobei 0,8 Äquivalente gelöst in DMSO, bezogen auf das Peptid-Harz, eingesetzt wurden. Der Fluorophor wurde aufgrund seines hohen Preises im Unterschuss eingesetzt. Das Peptid-Harz wurde getrocknet, um dann mit einem Gemisch aus TFA/Wasser 9:1 das Peptid und alle vorhandenen Schutzgruppen abzuspalten. Aus dieser Mischung wurde das Peptid, nach Abtrennung des Harzes, mit einem 10fachen Überschuss an Diethylether gefällt und anschließend abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Wasser gelöst und im Anschluß daran lyophilisiert. Die Aufreinigung erfolgte über die HPLC mit einer semipräparativen RP-C8-Säule.

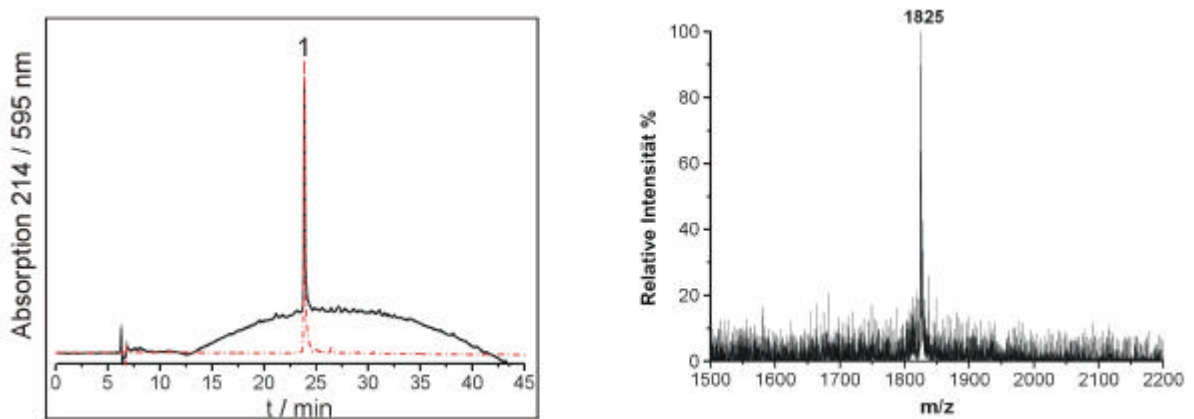


Abb. 67: HPLC-Chromatogramm und MALDI-MS des aufgereinigten Cy5-Peptids. HPLC-System 1, mit semipräparativer C8-Säule;

Die Ausbeute an Cy5-markierten Peptid betrug, bezogen auf die Gesamtmenge an eingesetztem Peptid, 40% in einer Reinheit von > 96% (Abb. 67, Peak 1). Die erhaltene

Masse von 1825 g/mol stimmt sehr gut mit der berechneten Masse von 1826 g/mol überein.

Die Ligation mit der RBD-COSR wurde so durchgeführt, wie bereits für Ras/C191_(Alexa 488)/His beschrieben. Das Cy5-Peptid wurde ebenfalls im 5fachen Überschuss eingesetzt (Abb. 68). Nach 16 h Reaktionszeit war ein Umsatz von ca. 75% zur RBD/K137_(Cy5)/His erreicht, der nicht weiter gesteigert werden konnte. Die starke Hintergrundfluoreszenz, sowie die untere Bande im Fluoreszenzscan des SDS-Gels wird durch das überschüssige Cy5-Peptid verursacht (Ab. 69 A & B).

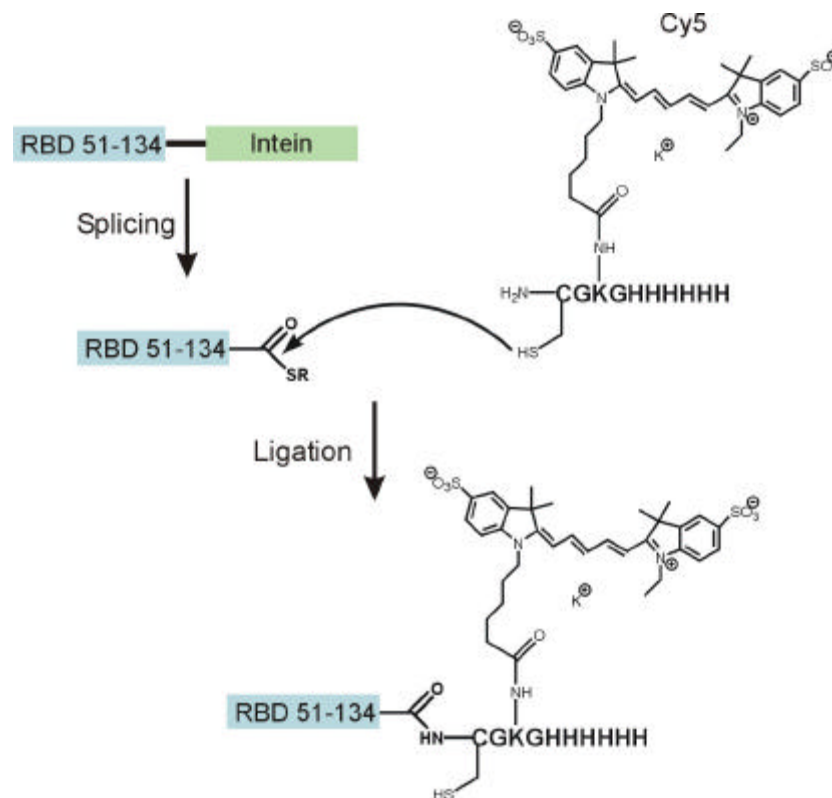


Abb. 68: Schema der C-terminalen Markierung der RBD mit dem Cy5-Peptid.

Die Entfernung des überschüssigen Cy5-Peptids erfolgte durch Dialyse gegen einen Puffer mit 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 und einer 6-8 kD *cut off* Membran. In diesem Fall dauerte die Dialyse 84 h, da die Durchlässigkeit der Membran für das Peptid, im Vergleich zur Dialyse mit dem Alexa 488-Peptid, wesentlich geringer war.

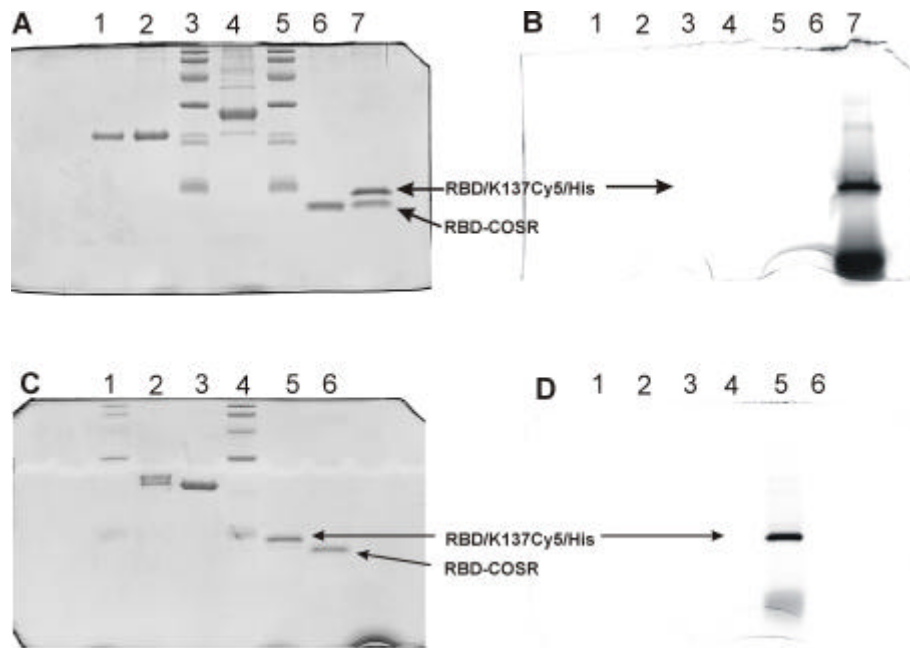


Abb. 69: 16%ige SDS-Gele der RBD-Ligation und Aufreinigung; **A)** *Bahnen 1 & 2:* Ras-COSR; *Bahnen 3 & 5:* Molekulargewichtsmarker; *Bahn 4:* Chitin-Matrix nach Abspaltung der RBD-COSR und anschließender Behandlung mit SDS-haltigem Puffer; *Bahn 6:* RBD-COSR nach Abspaltung von der Chitin-Matrix; *Bahn 7:* Ligationsansatz nach 16 h; **B)** *Bahn 7:* Fluoreszenzscan von A (Ex.: 633 nm, Em.: 675 nm); **C)** *Bahnen 1 & 4:* Molekulargewichtsmarker; *Bahnen 2 & 3:* Kontrolle einer Ras/C191_(Alexa 488)/His-Ligation; *Bahn 5:* aufgereinigte RBD/K137_(Cy5)/His; *Bahn 6:* RBD-COSR Kontrolle; **D)** *Bahn 6:* Fluoreszenzscan von C (Ex.: 633 nm, Em.: 675 nm);

Im Anschluss an diese Dialyse wurde die RBD/K137_(Cy5)/His durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Matrix von nicht markierter RBD getrennt. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol im oben genannten Puffer. Die folgende Dialyse wurde wieder durch eine 6-8 kD *cut off* Membran durchgeführt und es zeigte sich beim Fluoreszenzscan des SDS-Gels mit der aufgereinigten RBD/K137_(Cy5)/His, dass die resultierende Proteinlösung immer noch kleine Reste an Cy5-Peptid enthielt, die nicht vollständig abgetrennt werden konnten (Abb. 69 C & D, Bahn 5).

4.8.3. Fluoreszenzeigenschaften von RBD/K137_(Cy5)/His und Ras/C191_(Alexa 488)/His

Die beiden semisynthetisch hergestellten Proteine wurden auf ihre fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften untersucht, um zu zeigen, dass sie für FRET- und für Einzelmolekülmessungen genutzt werden können. Auf Grund der hohen Extinktionskoeffizienten von $203000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für Alexa 488 und $250000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für Cy5, sowie der großen Photostabilität dieser Farbstoffe sind sie besonders geeignet für

Einzelmolekülmessungen wie z.B. bei Verwendung der Zwei-Farben-Fluoreszenz-Kreuzkorrelation für die Untersuchung der Bindung von aktiviertem Ras/C191_(Alexa 488)/His an die RBD/K137_(Cy5)/His. Dabei werden zwei Laser eingesetzt, die jeweils einen der Fluorophore anregen und es wird die Fluoreszenzemission in einem sehr kleinem Lösungsvolumen beobachtet. Die Detektion der Fluoreszenzemission beider Fluorophore zur gleichen Zeit zeigt an, dass sich ein Komplex aus beiden markierten Proteinen gebildet hat. Dies ermöglicht z. B. die Echtzeitbeobachtung von Reaktionen oder die Nutzung für Screening-Verfahren mit hohem Durchsatz (Kettling et al., 1998; Koltermann et al., 1998).

Die Emissionsspektren der fluoreszenzmarkierten Proteine zeigen ein Maximum bei 519 nm für das Ras/C191_(Alexa 488)/His und bei 667 nm für die RBD/K137_(Cy5)/His, bei Anregungswellenlängen von 494 bzw. 649 nm (Abb. 70).

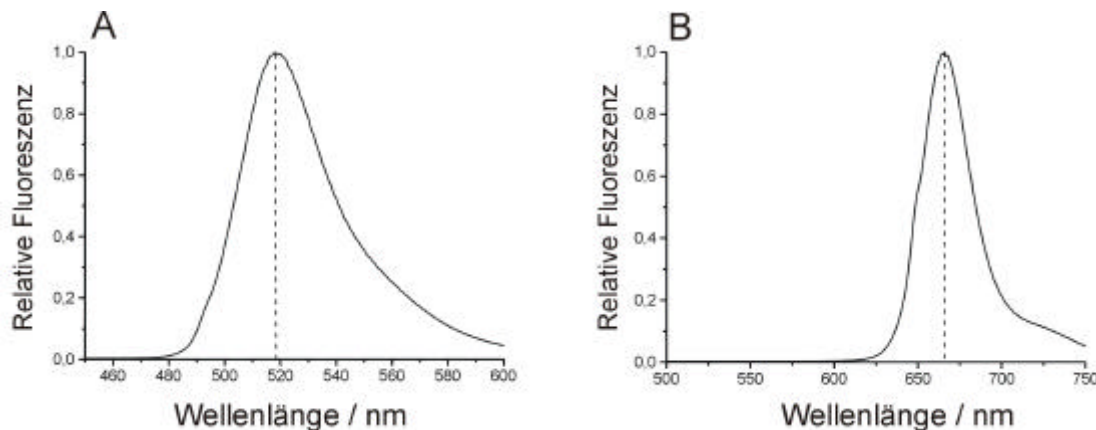


Abb. 70: Emissionsspektren von Ras/C191_(Alexa 488)/His (A) und RBD/K137_(Cy5)/His (B), jeweils 500 nM.

Das Ras/C191_(Alexa 488)/His muss in der aktivierten Form vorliegen, um die beschriebenen Versuche durchführen zu können, da sich nur dann der Ras-RBD-Komplex bilden kann. Nach der Expression und der Kopplung des Alexa488-Peptids lag das Protein in der GDP-gebundenen, nicht aktivierten Form vor und es wurde ein Nukleotidaustausch gegen GppNHp durchgeführt. Dazu wurde ein Überschuss an EDTA über Mg^{2+} zugegeben und ein 50facher Überschuss an GppNHp über Proteinkonzentration. Der Austausch fand über Nacht bei 4°C statt und anschließend wurden EDTA und nicht gebundene Nukleotide durch Dialyse entfernt. Es wurde eine Membran mit 12-14 kD *cut off* benutzt. Die HPLC-Kontrolle des Nukleotidsgehalts bei einer Absorption von 259 nm zeigte, dass nur noch GppNHp an das Protein gebunden war (HPLC: analytische RP C-18-Säule; PufferA: 100 mM KPi, 10 mM TBAB, pH 6,5; B: 100 mM KPi, 10 mM TBAB, pH 6,5, 50% MeCN; isokratisch mit 15% Puffer B in A).

Mit diesem aktiviertem Ras/C191_(Alexa 488)/His und RBD/K137_(Cy5)/His wurden erste Versuche durchgeführt, die zeigten, dass eine Energieübertragung vom angeregten Alexa 488 zum Cy5 stattfindet (Abb. 71). Voraussetzung dafür ist die Bildung eines Komplexes aus Ras/C191_(Alexa 488)/His und RBD/K137_(Cy5)/His, denn nur dann sind die beiden Fluorophore einander so nahe, dass ein Energietransfer auftreten kann. Das Maximum der Cy5-Fluoreszenzemission lag in diesem Fall bei 665 nm. Entscheidend für die Effizienz des Energietransfers ist die Entfernung zwischen den Farbstoffen, die sich aus dem Model der Komplexstruktur abschätzen lässt (Abb. 60).

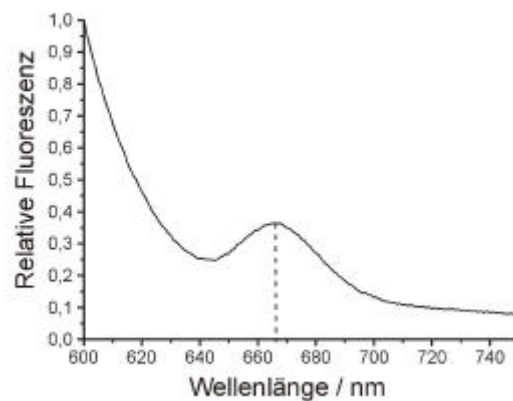


Abb. 71: FRET-Messung mit Ras/C191_(Alexa 488)/His-GppNHp-RBD/K137_(Cy5)/His; Ex.: 494 nm;

Außerdem können *Quenching*-Prozesse den Energietransfer beeinflussen, die z.B. durch Wechselwirkungen der Farbstoffe mit den Proteinen entstehen.

4.9. Semisynthese der Thymidinmonophosphatkinase (TMPK)

Die Thymidinmonophosphatkinase (TMPK) ist ein Enzym, das die Phosphorylierung von Thymidinmonophosphat (TMP) zum Thymidindiphosphat (TDP) unter Verbrauch von ATP katalysiert. Diese Reaktion ist essentiell zur Herstellung von Thymidintriphosphat (TTP) über den „Salvage-“, oder „De Novo-Weg“ in verschiedenen Organismen (Abb. 72). Das TTP wird z.B. für die DNA-Replikation benötigt. Verschiedene kinetische Studien haben gezeigt, dass die TMPK, im Vergleich zu anderen Nukleotidphosphatkinasen, ein Enzym mit einer sehr geringen Umsatzzahl ist.

Die TMPK spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des gegen den HI-Virus wirksamen Medikaments 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin (AZT), da dieses Molekül mit Hilfe der selben Enzyme, wie Thymidin zum Triphosphat phosphoryliert wird.



Abb. 72: Biosynthese des TTP ausgehend von Thymidin (T) unter Verbrauch von ATP. NMPK: Nukleotid-Monophosphatkinase; NDPK: Nukleotid-Diphosphatkinase.

Die wirksame Form des AZT ist das AZTTP, da nur dieses während der Transkription in die Virus-DNA eingebaut wird und dort für einen Kettenabbruch sorgt. Während der Aktivierung des AZT ist die Phosphorylierung des AZTMP zum AZTDP, katalysiert durch die menschliche TMPK, der entscheidende Engpass, da der Virus kein eigenes Enzym für diesen Prozess besitzt. Die dreidimensionale Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit verschiedenen Substraten und der Mechanismus des Phosphorylgruppentransfers wurde von Ostermann et al. (2000) aufgeklärt. Mit diesen Ergebnissen ließ sich erklären, warum das Enzym so strikt zwischen dem natürlichen Substrat TMP und dem AZTMP diskriminiert. In den Arbeiten von Ostermann et al. (2000) wird die Struktur und der Mechanismus des Phosphorylgruppentransfers vom ATP zum TDP ausführlich diskutiert. Dabei spielt die AS Asp15 eine sehr wichtige Rolle, da die Seitenkette dieser AS eine Wechselwirkung mit der 3`-Hydroxylgruppe des TMP bzw. mit der 3`-Azidogruppe des AZTMP ausbildet, jeweils vermittelt durch Wassermoleküle und diese Seitenkette eine Bewegung beim Phosphorylgruppentransfer durchführt (Abb. 73). Es ist allerdings unklar, ob dieses Asp15 ein katalytischer Rest ist, wobei Mutationsstudien, in denen das Asp15 gegen alle anderen codierten AS ausgetauscht wurde, gezeigt haben, dass ohne das Asp15 keine enzymatische Aktivität mehr nachweisbar war.

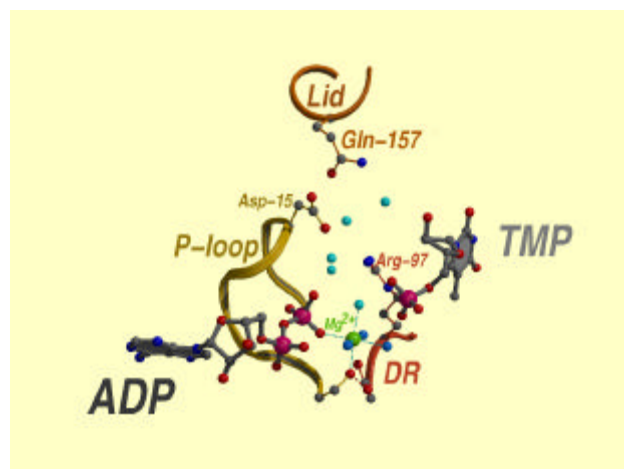


Abb. 73: Dreidimensionale Struktur des P-Loops der TMPK mit gebundenem ADP und TMP.

Eine Möglichkeit festzustellen, ob das Asp15 ein katalytischer Rest ist und ob die Seitenkettencarboxylgruppe protoniert sein muss, um die katalytische Aktivität vermitteln zu können, wäre der Einbau eines Asparaginsäureanalogons mit einem verändertem pK_a -Wert der Seitenkettencarboxylgruppe. Ein nahezu ideales Analogon wäre die L-3,3-Difluorasparaginsäure, da der starke $-I$ -Effekt der Fluoratome den pK_a -Wert der Seitenkettencarboxylgruppe absenken würde und damit unter physiologischen Bedingungen eine deprotonierte Carboxylgruppe vorläge.

Die vollständige Synthese eines Proteins aus 212 AS wäre sehr aufwendig und aus diesem Grund wurde eine Kombination aus Festphasensynthese von Peptiden und der rekombinanten Herstellung von Proteinen benutzt (siehe Einleitung). Für alle durchgeführten Versuche wurde eine Mutante der TMPK, in der das Arg200 gegen Ala ausgetauscht war, benutzt. Diese Mutante ist für die Kristallisation besser geeignet als der Wildtyp, weist aber identische biologische Funktionsfähigkeit auf (Ostermann, 2000).

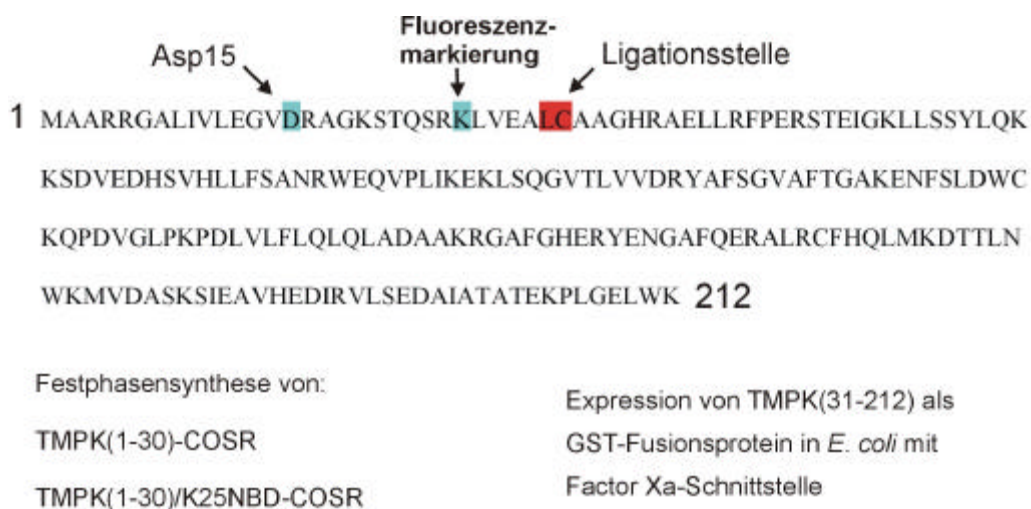


Abb. 74: Sequenz der TMPK/R200A und Synthesestrategie für den Einbau der nichtcodierten AS.

Der P-Loop, der das Asp15 enthält, wird von den ersten 25 AS gebildet. Aus diesem Grund bot sich das Cys31 als Ligationsstelle an, da ein Peptid dieser Länge gut synthetisierbar ist und das Asp an Position 15 ausgetauscht werden konnte (Abb. 74). Der N-Terminus kann mit beliebigen ortsspezifischen Modifikationen durch Festphasensynthese hergestellt werden, wobei er einen Thioester am C-Terminus aufweisen muss. Das restliche Protein von AS 31 bis 212 wurde, wie auch der Wildtyp, als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase in *E. coli* exprimiert (Abb. 75). Durch zielgerichtete Mutation wurde vor dem Cys31 die Aminosäureerkennungssequenz IEGR für die Protease Factor Xa eingeführt, die direkt nach dieser Sequenz schneidet.

Dadurch wird ein N-terminales Cys generiert, das für die Ligation essentiell ist. Die TMPK wurde über *Bam*HI- und *Nde*-Schnittstellen in einen modifizierten pGEX-Vektor kloniert. Zur Einführung der Factor Xa-Schnittstelle wurden folgende Primer benutzt: 5' GCAGAGCCGCCATATGATCGAAGGTCGTTGCG CCGCGGGCCAC 3' (HsTMPK_Xa_hin) und 5' GCTTGGATCCTCACTTCCATAGCT CCCCAGCGGCTTCTC 3'(HsTMPK_rev).

Die Basensequenz der für das GST-TMPK-Fusionsprotein mit Factor Xa-Erkennungssequenz kodierenden DNA wurde durch Sequenzierung überprüft.

4.9.1. Expression und Verdau des GST-TMPK Fusionsproteins

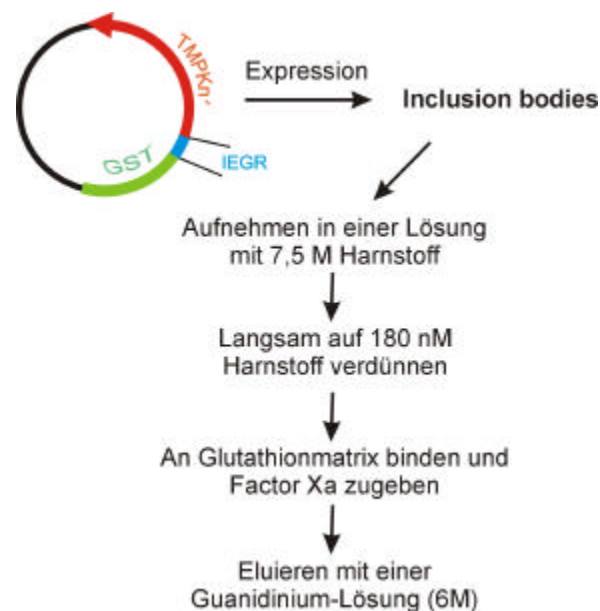


Abb. 75: Expression des TMPK-GST Fusionsproteins mit Factor Xa-Schnittstelle.

Das GST-TMPK Fusionsprotein wurde in *E. coli* stark überexprimiert und es formten sich *Inclusion bodies*, die das unlösliche Protein enthielten. Im SDS-Gel sind in den Bahnen 2 bis 4 die Banden für das überexprimierte GST-TMPK Fusionsprotein zu sehen, jeweils 2, 2,5 und 3 h nach Induktion (Abb. 76, A). Dieses unlösliche Protein wurde in einem Puffer aus 7,5 M Harnstoff und 50 mM Tris bei pH 7,4 gelöst und dann langsam auf 180 nM Harnstoff verdünnt, um Bedingungen einzustellen unter denen die Protease Factor Xa schneiden kann. Vor der Zugabe der Protease wurde das GST-TMPK Fusionsprotein an eine Glutathion-Matrix gebunden. Glutathion ist das natürliche Substrat der GST und mit Hilfe dieser Affinitätschromatographie konnte das Protein aufgereinigt werden. Durch die

Zugabe des Factor Xa zu dem gebundenen GST-TMPK Fusionsprotein wurde die N-terminal verkürzte TMPK (TMPKⁿ) freigesetzt. Diese verkürzte Form der TMPK war allerdings unlöslich und musste deshalb in einem Puffer aus 6 M Guanidinium und 100 mM NaP_i bei pH 7,0 aufgenommen werden. Bei diesem Prozess löste sich auch das noch gebundene GST-Protein und das ungeschnittene GST-TMPK Fusionsprotein von der Glutathion-Matrix (Abb. 76).

Im SDS-Gel des Factor Xa-Verdau, nach Aufnahme in dem Puffer mit 6 M Guanidinium, sind die Banden für das Fusionsprotein und die Banden für das GST und die N-terminal verkürzte TMPK zu sehen (Abb. 76, B). In Bahn 1 ist der Factor Xa-Verdau nach 3 h und in Bahn 2 nach 24 h zu sehen. Die 3. Bahn zeigt den Verdau von GST-TMPK Fusionsprotein, das nicht an eine Glutathion-Matrix gebunden war. Hier ist der Verdau weniger effektiv, als mit gebundenem Protein. Ein weiterer Verdau des Fusionsproteins wurde weder bei dem gebundenem, noch bei nicht an die Matrix gebundenem Fusionsprotein, erreicht. Die Zugabe von mehr Protease hatte keine Wirkung. Das erhaltene Gemisch aus Fusionsprotein, GST und TMPKⁿ wurde in dem Puffer mit 6 M Guanidinium für die Ligationsreaktionen mit den synthetisierten N-terminalen Peptiden eingesetzt.

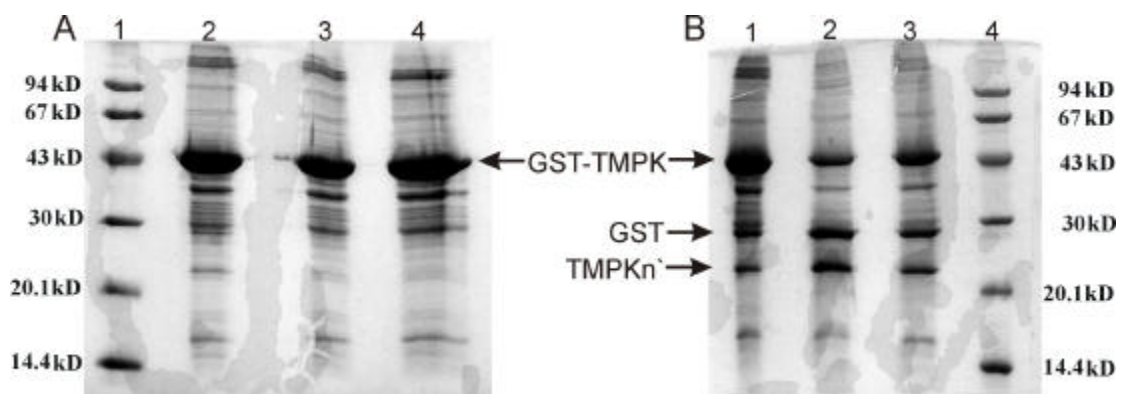


Abb. 76: SDS-Gele zur Kontrolle der Expression (A) und des Factor Xa-Verdau (B).

(A) *Bahn 1*: Molekulargewichtsmarker; *Bahn 2*: Überexprimiertes GST-TMPK 2 h nach Induktion; *Bahn 3*: 2,5 h nach Induktion; *Bahn 4*: 3 h nach Induktion; (B) *Bahn 1*: Factor Xa-Verdau der an die Glutathion-Matrix gebundenen GST-TMPK nach 2 h; *Bahn 2*: Verdau nach 24 h; *Bahn 3*: Verdau von ungebundener GST-TMPK nach 24 h. *Bahn 4*: Molekulargewichtsmarker;

4.9.2. Synthese der N-terminalen Peptide

TMPK(1-30):

1 H₂N-MAARRGALIVLEGVDRAGKSTQSRKLVEAL-COSR 30

M = 3384 g/mol [mit C-terminalen Thioester]

Die Synthese wurde wie für die RBD-Peptide manuell im 0,21 mmol Maßstab an einem speziellen Thioesterharz durchgeführt. Nach der letzten Kopplung wurde das Peptid-Harz getrocknet und das Peptid mit HF vom Harz gespalten. Das Peptid wurde nach dem Lyophilisieren über eine präparative C4-Säule gereinigt und durch Massenspektrometrie identifiziert.

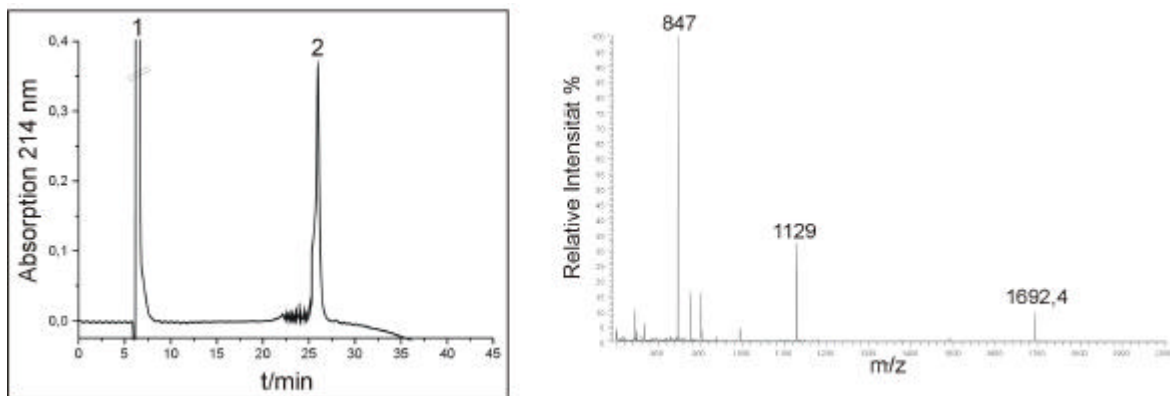


Abb. 77: HPLC-Chromatogramm und MS der aufgereinigten TMPK(1-30). Der 1. Peak entsteht durch eluierendes Guanidinium. HPLC-System 1, analytische C4-Säule (4).

Der 2. Peak im HPLC-Chromatogramm entspricht laut MS der TMPK(1-30) (Abb. 77). Im MS treten Peaks bei 1692,4, 1129 und 847 m/z auf, die den Ladungszuständen von 2 bis 4 positiven Ladungen pro Molekül entsprechen (Abb. 77). Es ergibt sich eine relative Masse von 3384 g/mol, was sehr gut mit der berechneten Masse übereinstimmt. Die erhaltene Menge von 22 mg entspricht einer Ausbeute von 5,9%, bezogen auf die Stoffmenge Peptid-Harz von 0,1 mmol, die zur HF-Spaltung eingesetzt wurde.

TMPK(1-30)/K25NBD:

1 H₂N-MAARRGALIVLEGVDRAGKSTQSRXLVEAL-COSR 30

M = 3505 g/mol [mit **X** = NBD-Dap und C-terminalen Thioester]

Die Synthese wurde genau wie oben beschrieben durchgeführt und die nicht-codierte AS NBD-Dap wurde ebenfalls mit HBTU aktiviert. Die Kopplungszeit betrug für diese AS 1 h. Die Aufarbeitung erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben.

Im Chromatogramm tritt ein Signal auf, das durch Guanidinium verursacht wird (1) und ein Signal für das aufgereinigte Peptid (2).

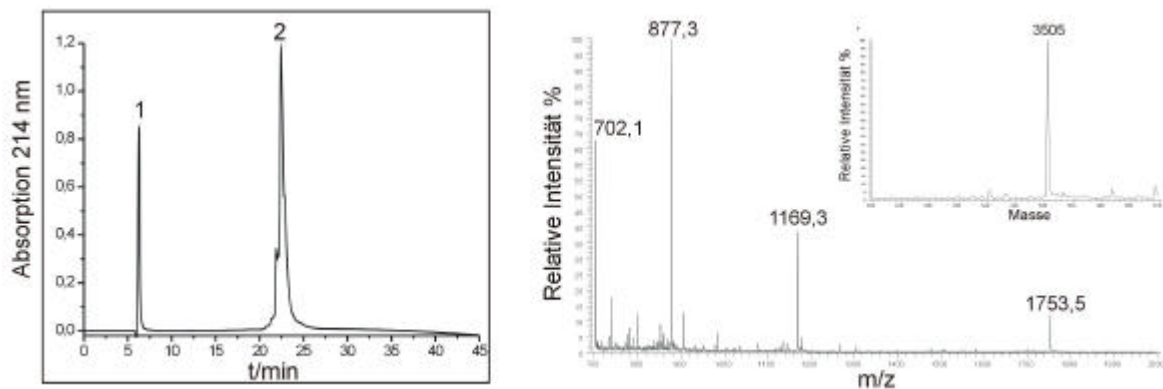


Abb. 78: HPLC-Chromatogramm und MS der aufgereinigten TMPK(1-30)/K25NBD-Dap. HPLC-System 1, semiprep C4-Säule.

Im MS treten die Peaks bei 702,1, 877,3, 1169,3 und 1753,5 m/z auf, die den Ladungszuständen von 2 bis 5 positiven Ladungen pro Molekül entsprechen. Daraus ergibt sich eine relative Masse von 3505 g/mol, was sehr gut mit dem berechneten Wert übereinstimmt (Abb. 78). Die Ausbeute beträgt ca. 17 mg aufgereinigtes Peptid, was bezogen auf die zur HF-Spaltung eingesetzte Menge Peptid-Harz von 0,1 mmol einer Ausbeute von 4,8% entspricht.

4.9.3. Ligation der chemisch synthetisierten Peptide und der biosynthetischen TMPK_n

Zur Ligation der N-terminal verkürzten TMPK mit dem synthetisierten Peptiden TMPK(1-30) und TMPK(1-30)/K25NBD wurde das Gemisch aus GST-TMPK Fusionsprotein, GST- und TMPK_n-Protein eingesetzt. Dies war möglich, da außer der verkürzten TMPK keines der anderen Proteine ein N-terminales Cys aufwies und somit

auch keines dieser Proteine eine Ligationsreaktion mit dem Thioester des Peptids eingehen konnte.

Die Ligationsreaktion wurde mit ca. 0,5 mg verkürzter TMPK und einem 5fachen Überschuss an N-terminalem Peptid in 1 ml 6 M Guanidinium-Lösung mit 100 mM NaP_i bei pH 7,0 durchgeführt. Dabei war keine Reaktionskontrolle mit der HPLC möglich, da das Proteingemisch nach dem Factor Xa-Verdau auf den verwendeten Reversed Phase-Säulen kein auswertbares Chromatogramm ergab. Aus diesem Grund wurde die Ligationsreaktion durch SDS-Gele kontrolliert. Zum Start der Reaktion wurde 1% Thiophenol zum Ligationsgemisch gegeben.

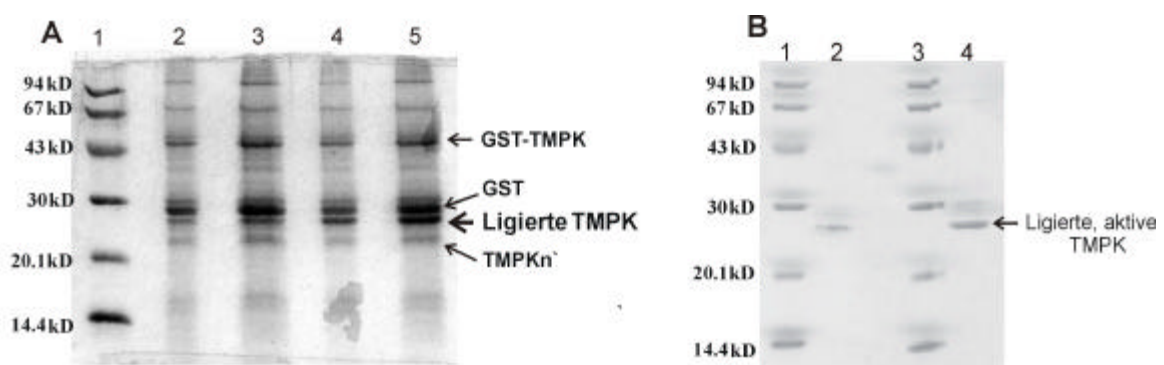


Abb. 79: (A) SDS-Gele der Ligation; *Bahn 1*: Molekulargewichtsmarker; *Bahn 2 & 3*: Niederschlag aus dem Ligationsansatz aufgenommen in SDS-haltigem Probenpuffer 5 bzw. 10 μ l; *Bahn 4 & 5*: Überstand des Ligationsansatzes 5 bzw. 10 μ l; (B) Kontrolle der Reinheit nach der Ligation und Rückfaltung; *Bahn 1 & 3*: Molekulargewichtsmarker; *Bahn 2 & 4*: Löslicher Überstand nach Rückfaltung der semisynthetischen TMPK 3 bzw. 8 μ l;

Die Ligationsreaktion wurde nach 14 h abgebrochen und der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und in den Bahnen 2 und 3 des Gel A aufgetragen (Abb. 79). Man erkennt deutlich, dass ein Teil des Niederschlags GST Protein ist und eine neue, sehr schwache Bande entstanden ist, die aufgrund ihrer Größe der ligierten TMPK entsprechen könnte. In den Bahnen 4 und 5 des Gels A kann eine deutlich sichtbare neue Bande beobachtet werden, die der ligierten TMPK entspricht. Das heißt der größte Teil der ligierten TMPK ist in dem Puffer mit 6 M Guanidinium in Lösung geblieben. Die Abtrennung und Faltung der ligierten TMPK erfolgte durch Dialyse gegen eine Puffer ohne Guanidinium und Thiophenol, aber in Gegenwart von jeweils 5 mM ATP und TMP, den natürlichen Substraten der TMPK, die als Gerüst den Faltungsprozess unterstützen sollten. Während der Dialyse fiel weiterer Niederschlag aus, der nach 36 h abzentrifugiert wurde. Das Gel B in Abb. 79 zeigt in den Bahnen 2 und 4 den Überstand nach dieser

Zentrifugation. Es ist nur noch eine Hauptbande zu erkennen, die der ligierten TMPK entspricht.

Dieselbe Ligation wurde durchgeführt, um die N-terminal verkürzte TMPK mit dem NBD-markierten TMPK-Peptid zu ligieren.

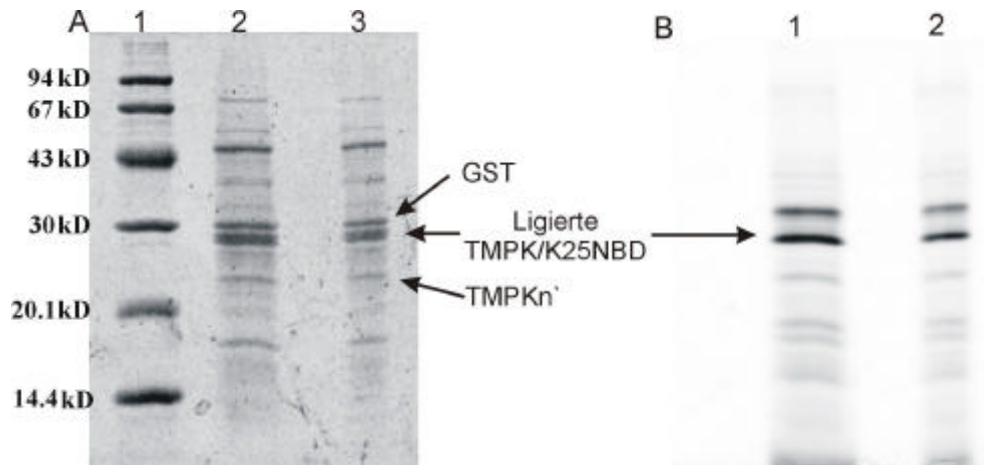


Abb. 80: SDS-Gel der Ligation von TMPKn' und TMPK(1-30)/K25NBD. (A) Coomassie-Färbung; *Bahn 1*: Molekulargewichtsmarker; *Bahn 2*: Ligationsreaktion von TMPKn' und TMPK/K25NBD-Dap TCA-Fällung; *Bahn 3*: Ligationsreaktion von TMPKn' und TMPK/K25NBD-Dap Acetonfällung; (B) Fluoreszenzscan des Gels A mit einer Anregungswellenlänge von 473 nm.

Auf dem SDS-Gel, das zur Kontrolle der Ligationsreaktion gemacht wurde, sieht man deutlich in *Bahn 2* und *3* die Bande, die aufgrund des Molekulargewichtes der ligierten TMPK/K25NBD zugeordnet werden kann (Abb. 80, Gel A). Die beiden Proben aus *Bahn 2* und *3* unterscheiden sich nur darin, dass die Proteine im einen Fall mit einer 10%igen TCA-Lösung und im anderen mit Aceton gefällt wurden. Außerdem kann noch verkürzte TMPKn', das GST und etwas GST-TMPK Fusionsprotein auf dem Gel zugeordnet werden. Das Bild B in Abb. 80 zeigt dasselbe Gel, wobei hier ein Fluoreszenzscan durchgeführt wurde, der deutlich eine fluoreszierende Bande für die ligierte TMPK/K25NBD zeigt. Die zweite fluoreszierende Bande, die bei einer höheren Masse auftritt, kann nicht zugeordnet werden.

Die Aufarbeitung dieses Ligationsansatzes erfolgte genau wie für die TMPK ohne Fluoreszenzmarkierung beschrieben. Die Reinheit der erhaltenen semisynthetischen TMPK/K25NBD betrug lediglich 75-80% nach Abschätzungen der Verunreinigungen auf den SDS-Gelen (Abb. 81, A *Bahn 2*). Der Fluoreszenzscan dieses Gels zeigte, dass die TMPK/K25NBD das einzige vorhandene fluoreszierende Protein war (Abb. 81, A *Bahn 3*).

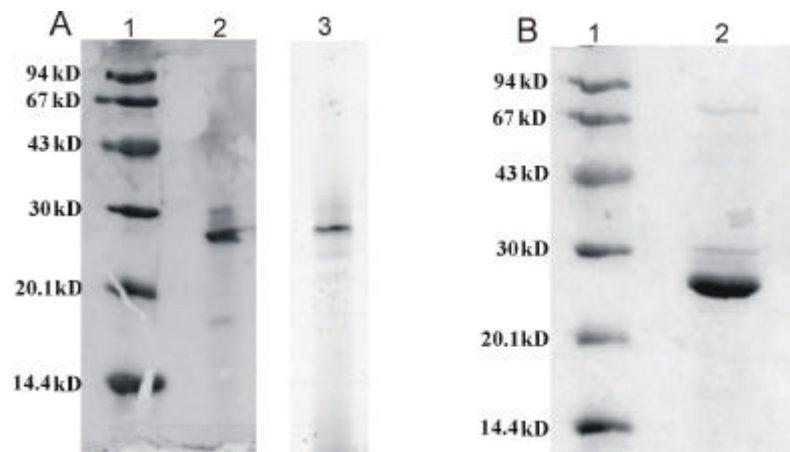


Abb. 81: SDS-Gele der aufgearbeiteten TMPK-Proteine. Unter (A) ist die semisynthetische TMPK/K25NBD und unter (B) die semisynthetische TMPK gezeigt. (A) *Bahn 1*: Molekulargewichtsmarker; *Bahn 2*: gefaltete TMPK/K25NBD-Dap; *Bahn 3*: Fluoreszenzscan von Bahn 2; (B) *Bahn 1*: Molekulargewichtsmarker; *Bahn 2*: semisynthetische TMPK;

Die semisynthetische TMPK konnte laut SDS-Gel in höherer Reinheit erhalten werden (Abb. 81, B Bahn 2).

Die Funktionsfähigkeit beider semisynthetischer Proteine wurde durch einen Standardtest für die TMPK-Aktivität überprüft (siehe 3.6.5.). In diesem Test ist die Phosphorylierung von TMP zu TDP, unter Verbrauch von ATP an den Abbau von NADH gekoppelt. Dabei wurde ausgenutzt, dass die Absorption des Nicotinamid-adenin-dinukleotids im oxidierten und reduzierten Zustand bei 340 nm sehr unterschiedlich ist. Genau diese Absorption wurde in dem *Assay* beobachtet, um die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} der semisynthetischen Proteine unter *steady-state* Bedingungen zu bestimmen. Dieser Test wurde von Reinstein et al. (1988) für die Adenylatkinase optimiert und beruht auf einem von Berghäuser (1975) beschriebenen gekoppelten Enzymtest (Abb. 82).

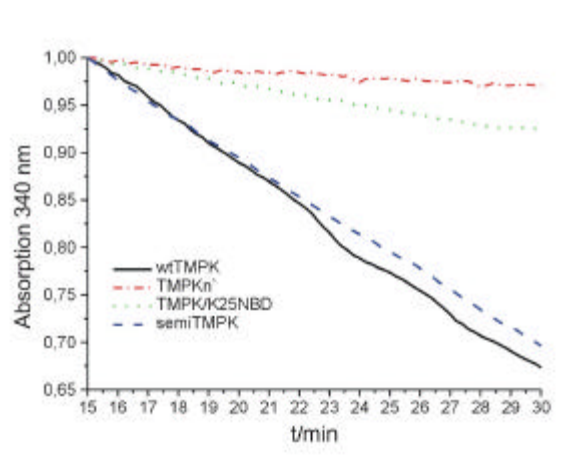


Abb. 82: Aktivitätstest mit verschiedenen TMPK-Proteinen.

Die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} erhält man nach der folgenden Gleichung:

$$k_{\text{cat}} = \frac{\Delta \text{Absorption}_{340\text{nm}} \text{ min}^{-1}}{60 \text{ s/min} \cdot 6,22 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot c \cdot 1 \text{ cm}}$$

wobei $\Delta \text{Absorption}_{340\text{nm}} \text{ min}^{-1}$, die Steigung der beobachteten UV-Absorptionsabnahme, 60 s/min der Umrechnungsfaktor von min auf s, $6,22 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ der Extinktionskoeffizient, c die Proteinkonzentration in μM und 1 cm die Schichtdicke der Lösung ist. Die, für Messungen mit einer Proteinkonzentration von 0,15 μM , erhaltenen Werte sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Protein	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$
wtTMPK (rekombinant)	0,39
semiTMPK (semisynthetisch)	0,32
TMPK/K25NBD (semisynthetisch)	0,10
TMPKn` (N-terminal verkürzt)	0,04

Tab. 3: Geschwindigkeitskonstanten der TMPK-Proteine.

Der k_{cat} -Wert, der für die semisynthetische TMPK gemessen wurde, ist nahezu identisch mit dem für die rekombinant gewonnene TMPK. Es wird allerdings deutlich, dass der Einbau der fluoreszierenden AS die Aktivität des Enzyms stark erniedrigt. Das zeigt, dass die ausgewählte Position 25 am Ende des P-Loops nicht geeignet ist für den Einbau von Fluoreszenzmarkern, wenn ein vollständig aktives Enzym erhalten werden soll. Dieser Fluoreszenzmarker sollte dazu benutzt werden, um die Nukleotidbindungseigenschaften des Enzyms zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden bisher mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden durchgeführt (Veit, 2000).

Voraussetzung für diese Untersuchungen war, dass die TMPK/K25NBD nukleotidfrei vorlag. Dies wurde dadurch erreicht, dass alkalische Phosphatase (AP) eingesetzt wurde, um die an die TMPK gebundenen Nukleotide vollständig abzubauen. Die Kontrolle dieser Abbaureaktion erfolgte durch die HPLC (siehe 4.8.3) und nach 14 h bei RT war die TMPK/K25NBD vollständig nukleotidbefreit. Erste Versuche zur Beobachtung der Nukleotidbindung wurden mit TP₅A durchgeführt. Dieses Nukleotid ist ein Bisubstratinhibitor der TMPK und kann von der noch vorhandene AP nicht abgebaut werden, im Gegensatz zu TMP oder ATP. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich jedoch, dass keine Änderung der NBD-Dap-Fluoreszenz bei Zugabe von TP₅A beobachtet

werden konnte. Bei Zugabe von 10 μM TP₅A zu der oben beschriebenen Aktivitätsmessung mit der TMPK/K25NBD trat aber eine Verringerung des k_{cat} -Wertes auf, was deutlich macht, dass die Phosphorylierung von TMP zu TDP inhibiert wird, in dem der Inhibitor AP₅T an das Enzym bindet.

Ein Proteingemisch aus N-terminal verkürzter TMPK_n, GST und GST-TMPK zeigte, nach Abtrennen des Guanidiniums durch Dialyse (10 kD-Membran) und Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile, eine sehr geringe Aktivität (Tab. 3).

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden durch Kombination von chemischer Synthese und molekularbiologischen Techniken verschiedene synthetische und semisynthetische Proteine hergestellt. Dabei wurde die Chemie als Werkzeug zur Veränderung oder Erweiterung der Eigenschaften dieser Proteine benutzt. Bei den eingebrachten Modifikationen handelt es sich um nicht-codierte Aminosäuren, nicht natürliche Aminosäuresequenzen oder Veränderungen der Seitenkettenfunktionalitäten. Die verwendeten Fluoreszenzmarker wurden in die Proteine inkorporiert, um eine Möglichkeit zu erhalten, Wechselwirkungen mit anderen Proteinen unabhängig von der intrinsischen Fluoreszenz natürlicher Proteine zu beobachten. Andere Modifikationen wurden oder sollten benutzt werden, um die Proteine entweder durch Affinitätschromatographie zu reinigen, oder auf Oberflächen zu immobilisieren.

Als Modellsystem mit hoher biologischer Relevanz für wechselwirkende Proteine wurde das Ras-RBD System genutzt. Dieses System ist biophysikalisch bereits gut charakterisiert und das Protoonkoprotein Ras spielt eine bedeutende Rolle bei sehr vielen Krebserkrankungen (siehe Einleitung).

Die RBD und Ras wurden beide durch native chemische Ligation von zwei bzw. drei Peptidsegmenten synthetisiert. Auf der Basis der immobilisierten, fluoreszenzmarkierten RBD wurde ein Biosensor zum Nachweis von aktiviertem Ras entwickelt. Außerdem wurden die RBD und Ras semisynthetisch dargestellt, wobei am C-Terminus Fluorophore eingeführt wurden, die für Einzelmolekül- und Energietransfermessungen geeignet sind.

Des Weiteren wurde eine Methode etabliert, um die menschliche Thymidinmonophosphatkinase (TMPK) auf semisynthetischem Weg herzustellen und in den wichtigen N-terminalen Teil dieses Enzyms, das für die *in vivo* Aktivierung von HIV-Medikamenten benötigt wird, nahezu beliebige Veränderung einbringen zu können.

5.1. Proteinsynthese

Die Gewinnung von Proteinen ist seit einigen Jahrzehnten mit molekularbiologischen Methoden möglich, wobei die Expressionsmaschinerie einzelliger Organismen, wie *E. coli* oder *S. cerevisiae*, ausgenutzt wird. Diese Methode ist nicht universell anwendbar, da die Expression sehr aufwendig bzw. unmöglich sein kann, z.B. bei cytotoxischen

Proteinen. Die ortsgerichtete Mutagenese erlaubt den gezielten Austausch von AS zur Veränderung der Eigenschaften von Proteinen. Allerdings kann nur zwischen den 20 genetisch codierten AS variiert werden. Erst seit den neunziger Jahre erlauben Ansätze, wie die Suppression von Stop-Codons oder die Anzucht von auxotrophen Zelllinien unter einem Selektionsdruck, den Einbau nicht-codierter AS in Proteine (Cornish und Schultz, 1994; Budisa et al., 1995). Diese Methoden unterliegen einigen Einschränkungen, was die Struktur der nicht-codierten AS betrifft, bzw. die Ausbeuten sind nicht ausreichend für weitergehende biophysikalische Untersuchungen.

Die chemische Synthese von Peptiden und deren anschließende Verknüpfung zu Proteinen oder Proteindomänen gewährt einen direkten Zugriff auf diese ohne die Einschränkungen, die durch die Nutzung des Proteinsyntheseapparates von Organismen auftreten. Der gezielte Einbau verschiedenster nicht-codierter AS und die Funktionalisierung der Proteine wird ebenfalls möglich. Damit erlaubt die chemische Synthese den Zugang zu Proteinen, die für spezifische Anwendungen maßgeschneidert sind (Abb. 83).

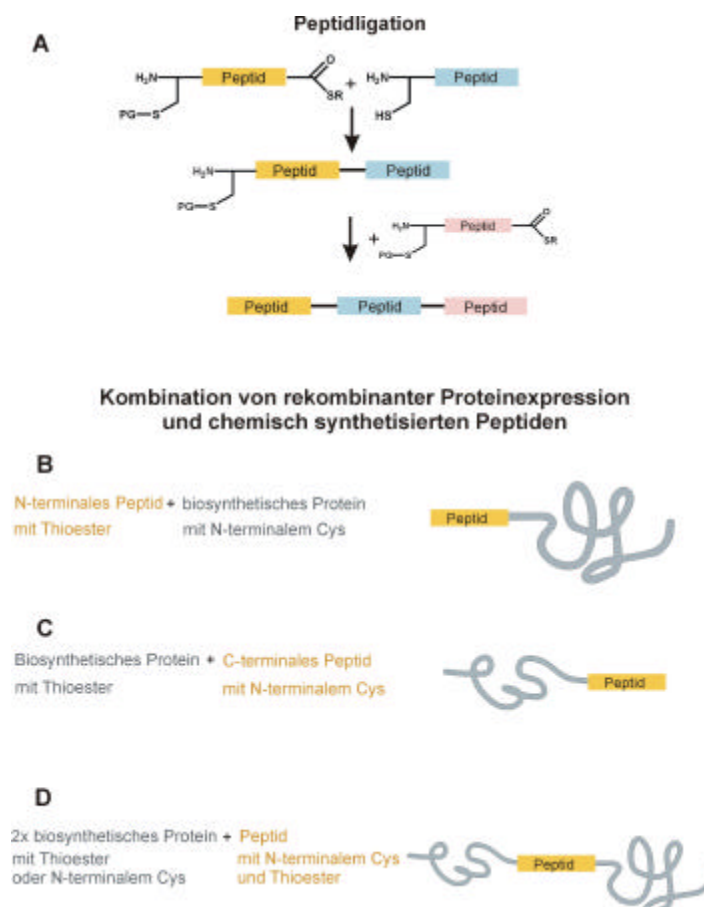


Abb. 83: Verschiedene Wege zur Verknüpfung von chemisch synthetisierten Peptiden und biosynthetischen Proteinsegmenten durch chemische Ligation.

Um solche maßgeschneiderten Proteine herzustellen, wurden die RBD-Proteine und das Ras-Protein durch native chemische Ligation von zwei bzw. drei Peptidsegmenten hergestellt, wobei die Peptide durch Festphasensynthese unter Verwendung der Boc-Schutzgruppenstrategie synthetisiert wurden (Schnölzer et al., 1992 und Dawson et al., 1994; Abb. 83 A). Die so erhaltenen Proteine weisen an der Ligationsstelle eine native Amidbindung auf und können von rekombinant hergestellten Proteinen nicht unterschieden werden. Dies ist bei anderen Ligationmethoden nicht der Fall (Tam et al., 1999 und Walker, 1997).

Die Ligrationsreaktionen, bei denen die Thiolgruppe eines N-terminalen Cys mit einem C-terminalen α -Carboxylthioester reagiert und eine anschließende Umesterung zur Ausbildung der Peptidbindung führt, wurden unter denaturierenden Bedingungen in 6 M Guanidinium durchgeführt (Abb. 1). Dadurch wird die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen in den Peptiden verhindert und durch die vollständige Entfaltung der AS-Kette eine gute Zugänglichkeit der reaktive Zentren gewährleistet (Schnölzer und Kent, 1992). Während der Ligrationsreaktionen können die Seitenketten der AS vollständig geschützt vorliegen, da sie die Reaktionen nicht beeinflussen. Auch nicht-terminale Cysteinreste können nur reversibel mit dem Thioester reagieren und stören die Reaktion nicht. Die Ausbildung einer Amidbindung kann dann nicht stattfinden. Die Zugabe von Thiophenol zum Ligationsgemisch führt zu einer Umesterung des C-terminalen α -Carboxylthioesters des N-terminalen Peptidsegments und zu einer Beschleunigung der Ligrationsreaktion, da die Reaktivität des entstehenden Thioesters höher ist (Dawson et al., 1997).

Die Ligation zweier Peptidsegmente unter Ausbildung einer Amidbindung erfordert nicht unbedingt einen ungeschützten Cysteinrest am N-Terminus des C-terminalen Peptids. Es ist möglich die α -Aminogruppe mit Ethanthiol oder Oxyethanthiol zu modifizieren und dadurch eine Ligation ohne Cys an der N-terminalen Position durchzuführen (Canne et al., 1996). Die nicht-natürlichen Modifikationen der N^α -Position können, z.B. durch Behandlung mit Zn/H_2 , entfernt werden. Außerdem können Ligrationsreaktionen durchgeführt werden, die durch die Konformation der Peptide unterstützt werden. Dabei ist kein N-terminales Cys am 2. Peptid notwendig und eine der größten Einschränkungen der nativen chemischen Ligation wird damit umgangen (Beligere und Dawson, 1999).

Die Verbindung zweier Peptidsegmente über eine native Amidbindung ist keine notwendige Voraussetzung um aktive Proteine zu erhalten. Es gibt zahlreiche Beispiele in denen die Peptidsegmente über Disulfid-, Thioether- oder Oximbrücken miteinander verbunden und vollständig aktive Proteine erhalten wurden (Dawson und Kent, 2000).

Allerdings sind Ligationsreaktionen mit Cysteinresten den anderen Methoden vorzuziehen, wenn in der AS-Sequenz Cysteinreste an geeigneter Position zur Verfügung stehen. Dadurch wird der Syntheseaufwand verringert und die Ausbeuten bei dieser Reaktion sind sehr gut.

Als Ligationsstelle für die Synthese der RBD-Proteine bieten sich die Cysteinreste 95 und 96 an, da sie ungefähr in der Mitte der AS-Sequenz der RBD liegen und somit zwei ungefähr gleich lange Peptide synthetisiert werden müssen (Abb. 11). Beide Peptide sind durch die Festphasensynthese in hoher Reinheit und großer Menge zugänglich. Das Cys 95 wurde nicht zur Ligation benutzt, da in diesem Fall die C-terminale AS des 1. Peptids eine Glutaminsäure (Glu 94) gewesen wäre. Die Carboxylseitenkette dieser AS kann in einer intramolekularen Reaktion mit dem Thioester reagieren und damit die Ligationsreaktion verhindern. Aus diesem Grund wurde das Cys 96 als Ligationsstelle ausgewählt.

Die chemische Synthese des Ras ist allein auf Grund der Größe des Proteins aufwendiger, als die Darstellung der RBD-Proteine. Um die Synthese zu vereinfachen, wurde eine C-terminal verkürzte Form des Proteins hergestellt. Dabei wurden die 23 C-terminalen AS ausgelassen. Diese Verkürzung beeinflusst die Nukleotidbindungseigenschaften, die GTP-Hydrolyse und die Wechselwirkung mit der RBD nicht (Scherer et al., 1989). Die biologische Funktion des C-Terminus liegt darin, dass dort posttranslationale Modifikationen wie Farnesylierung oder Palmitoylierung stattfinden, die für die Verankerung in der Membran benötigt werden (Hancock et al., 1990.).

Die Auswahl der durch Festphasensynthese herzustellenden Peptidsegmente war besonders wichtig, da die Herstellung von Peptiden mit bis zu 60 AS in guten Ausbeuten gelingt. Aus diesem Grund sollten keine wesentlich längeren Peptide für die Totalsynthese verwendet werden, da in diesen Fällen mehr Nebenprodukte als Zielpeptid entstehen (Dawson und Kent, 2000 und Sakakibara, 1999). Dies bedeutet, dass die Synthese durch Ligation von mindestens drei oder vier Segmenten durchgeführt werden musste. Die Analyse der Aminosäuresequenz des Ras zeigte eine günstige Verteilung der Cysteinreste, die als potentielle Ligationsstellen betrachtet werden können. Die Cysteinreste verteilen sich so über das Protein, dass einerseits eine Ligation von drei Segmenten möglich ist, andererseits aber auch eine Ligation von vier Segmenten.

Der Nachteil der Ligation von drei Segmenten liegt darin, dass ein Segment bestehend aus 67 AS synthetisiert werden muss. Andererseits erfordert die Ligation von vier Segmenten einen wesentlich höheren Reinigungsaufwand, da alle Peptide nach der

Synthese, nach jedem Ligationsschritt und nach Abspaltung der Schutzgruppen von N-terminalen Cysteinresten über die HPLC aufgereinigt werden müssen. Dieser Grund war entscheidend dafür, nur drei Segmente zu synthetisieren und zwei Ligungsreaktionen durchzuführen.

Die Menge des längsten Segments (67 AS) blieb limitierend für den Maßstab der Gesamtsynthese. Bei der Synthese dieses Segments musste außerdem beachtet werden, dass es eine C-terminale Thioesterfunktion und ein N-terminales Cys aufwies und somit eine inter- bzw. intramolekulare Reaktion, die zur Dimerisierung oder Zyklisierung führen konnte. Um dies zu verhindern wurde die Thiolfunktion des N-terminalen Cys geschützt und erst im Anschluss an die Ligation des mittleren und C-terminalen Segments wurde diese Schutzgruppe entfernt. Dies erforderte einen weiteren Reaktions- und Aufreinigungsschritt. Der zweite Ligationsschritt verlief unter den für die RBD-Proteine und die erste Ras-Ligation beschriebenen Bedingungen unbefriedigend, da die eingesetzte Menge an Peptidsegmenten immer weiter abnahm, aber kein Produkt gefunden wurde. Die Erklärung, für die Abnahme der Peptidmengen ohne Entstehung eines Ligungsproduktes, könnte sein, dass das Produkt an der Glaswand des Reaktionsgefäßes adsorbiert wird und nicht in Lösung bleibt. Die Zugabe von 1% Dodecyl- β -maltosid zu dem Ligungsansatz löste dieses Problem und es konnte ein Produktsignal während der HPLC-Analysen beobachtet werden. Das Detergenz erhöht in diesem Fall außerdem die Reaktionsgeschwindigkeit und kann generell bei der Ligation schnell aggregierender Peptidsegmente, wie sie z.B. bei der Synthese von Membranproteinen auftreten, hilfreich sein.

Das Ras(1-166) stellt eines der größten bisher durch chemische Synthese hergestellten Proteine dar (Tab. 4). Die erzielte Ausbeute an Ras war ausreichend für eine genaue biophysikalische Charakterisierung. Es wurde der Zugang zu einem nahezu beliebig modifizierbaren Ras-Protein, das aufgrund seiner Bedeutung für die Signaltransduktion in Zellen sehr interessant für die Forschung ist, geschaffen. Besonders der Aufbau des Proteins aus mehreren Peptidsegmenten ermöglicht es relativ leicht, durch Synthese nur eines neuen Segmentes, gezielt Veränderungen im Protein vorzunehmen. Ein Beispiel dafür ist der Einbau von Fluoreszenzmarkern für Anwendungen in der zeitaufgelösten Kristallographie. Dabei würde die Hydrolyse von caged-GTP durch Bestrahlung mit Licht ausgelöst und die Hydrolysereaktion mit Hilfe der Fluoreszenzemission des Fluorophors beobachtet (A. Scheidig, persönliche Mitteilungen).

Proteine	Größe (Anzahl AS)	Anzahl Cysteinreste in Disulfidbrücken
SH2 Domäne	~ 90	keine
SH3 Domäne	~ 60	keine
b/HLH Transkriptionsfaktor	~ 68 - 180	keine
Chemokine	~ 68 - 90	4
Cytokine	~ 160	4
Ser PR Inhibitoren	~ 58 - 70	keine
Cyt b5	~ 85	keine
β_2 Mikroglobulin	99	2
Desulforedoxin	2 · 36	4
Rubredoxin	53	keine
AGRPs	112	8
Anaphlytoxine	~ 72	6
EGFs/ TGF- α	~ 50	6
Retrovirale Proteasen	2 · (99 - 116)	keine
secPLA ₂	124	14
MIF	3 · 115	keine
SOD	153	keine
Barnase	110	keine

Tab. 4: Ausgewählte Proteine, die durch chemisch Totalsynthese unter Verwendung der nativen chemischen Ligation hergestellt wurden (Dawson und Kent, 2000).

Andere Ansätze zur Ligation mehrere Peptidsegmente nutzen unterschiedliche chemische Reaktionen zur Verknüpfung oder führen die Ligation, ähnlich wie die Peptidsynthese, in einer Festphasenreaktion durch, was die Anzahl der Aufreinigungsschritte erheblich verringert. Dadurch wird auch die Ausbeute erhöht, da insbesondere die HPLC-Reinigungen immer zu großen Verlusten führen. Die sogenannte Tandem-Ligation beruht darauf, dass Peptide mit N-terminalen Cys oder Thr/Ser unter Bildung eines Thia- bzw. Oxaprolins miteinander verknüpft werden können. Dabei wird die unterschiedliche Reaktivität der AS ausgenutzt, die unter verschiedenen Bedingungen mit einem C-terminalen Glykoaldehydester reagieren (Miao und Tam, 2000). Der Nachteil dieser Ligationsstrategie ist, dass immer Prolinanaloga an der Ligationsstelle generiert werden, die die Struktur des Peptidrückgrats beeinflussen.

Die Festphasenligation von Peptiden („*solid phase chemical ligation*“, SPCL) funktioniert, wie die native chemische Ligation, aber das C-terminale Peptidsegment bleibt während der Ligationsreaktionen an eine feste Zellulosephase gebunden. Diese feste Phase auf Zellulosebasis weist in dem wässrigen Milieu, das für die Ligationsreaktion benötigt wird, ein besseres Quellverhalten auf, als die normalerweise

verwendeten Harze, die aus Styrol, quervernetzt mit Divinylbenzol, gewonnen werden. Diese Methode erlaubt die Verknüpfung mehrerer Peptidsegmente unter Vermeidung vieler Reinigungsschritte und vereinfacht die Entfernung von überschüssigen Reagenzien bzw. Nebenprodukten. Außerdem wird durch die Bindung an das Harz die Tendenz zur Aggregation der ligierten Peptide verringert (Canne et al., 1999). Ein Nachteil dieser Methode ist bisher, dass die feste Phase, an der die Ligationsreaktionen durchgeführt werden, nicht für die Peptidsynthese verwendet werden kann. Deshalb ist es notwendig das C-terminale Peptid von einem Trägerharz abzuspalten und an einen anderen zu koppeln, was nur mit geringen Ausbeuten gelingt. Aus diesem Grund wurde für die Ras-Synthese auf diese Methode verzichtet.

Ein anderer Ansatz nutzt die natürliche Aktivität von Proteasen zur Spaltung einer Esterbindung am C-Terminus eines N-terminal geschützten Peptids, unter Ausbildung eines Thiol-Acyl-Intermediates mit dem Enzym. Das Enzym wird durch den nukleophilen Angriff eines weiteren Peptids mit ungeschütztem N-Terminus auf das Intermediat wieder freigesetzt. Dabei wird eine Amidbindung zwischen den Peptiden erzeugt, was genau dem Gegenteil der natürlichen Funktion von Proteasen entspricht, bei der der nukleophile Angriff durch Wassermoleküle erfolgt (Jackson et al., 1994; Grünberg et al., 2000). In den eingesetzten Peptiden dürfen dabei keine Erkennungssequenzen für die verwendete Protease auftreten, da dies zu unerwünschten Spaltungsreaktionen führen würde.

Insgesamt ist der Anwendungsbereich der chemischen Ligation für die Synthese von Proteinen bisher auf eine Gesamtlänge der zu synthetisierenden Proteine bis 180 AS beschränkt. Es wurden aber schon zahlreiche Proteine auf nicht-biologischem Weg hergestellt, was zeigt, dass durch die chemische Ligation der Zugang zu und die nahezu beliebige Modifikation von Proteinen und sogar ganzen biologischen Systemen ermöglicht wird (Tab. 4). Es kann z.B. eine Veränderung von Substratspezifitäten erreicht werden, wie es für die D-HIV-1-Protease gezeigt wurde, die aus D-AS chemisch synthetisiert wurde und deren Substratspezifität sich ebenfalls umkehrte (Milton et al., 1992). Außerdem ist die Beeinflussung der katalytischen Aktivität von Enzymen und Veränderung von Proteinwechselwirkungen möglich.

Der Zugang zu wesentlich größeren Proteinen durch die Verknüpfung von Peptidsegmenten wird durch den notwendigen hohen synthetischen Aufwand begrenzt, aber eine Methode unter Verwendung der Inteinchemie, die „*Expressed protein ligation*“, erlaubt die Kopplung von modifizierten Peptiden an biosynthetisch hergestellte Proteine (Muir, 1998). Dadurch gelingt auch die Veränderung von Proteinen die wesentlich größer

als 25 kD sind. Mit Hilfe dieser Methode können chemisch synthetisierte und modifizierte Peptide an den C- oder N-Terminus eines rekombinant hergestellten Proteins gekoppelt werden (Abb. 83, B und C). Es können auch Peptide zwischen zwei rekombinant hergestellte Proteinteile eingefügt werden (Abb. 83, D). Die C-terminale Modifikation erlaubt z.B. die Einführung von fluoreszenzmarkierten Peptiden zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Proteinen (Iakovenko et al., 2000). An das Ras-Protein sind bereits C-terminal farnesylierte und fluoreszenzmarkierte Peptide gekoppelt worden und durch Mikroinjektion in Zellen eingebracht worden, um dort die Verteilung des Proteins beobachten zu können (Bader et al., 1999). Allerdings erfolgte die Kopplung dabei nicht über eine natürliche Amidbindung.

Das Einführen von chemisch synthetisierten Peptiden zwischen zwei rekombinant hergestellte Peptide wurde von Cotton et al. (1999) zum erstenmal durchgeführt, um einen Fluoreszenzmarker zwischen zwei Domänen einzuführen, dessen Fluoreszenzsignal sich bei Bindung der Domänen an ihr Substrat veränderte.

In dieser Arbeit wurde die „*Expressed Protein Ligation*“ benutzt, um auf semi-synthetischem Weg Cy5 markierte RBD bzw. Alexa 488 markiertes Ras herzustellen. Beide Proteine sind auch durch chemische Totalsynthese zugänglich, aber die Herstellung eines kurzen Peptids, das mit den kommerziell erhältlichen Farbstoffen markiert wird, ist weniger aufwendig. Außerdem kann dabei mit geringen Mengen Cy5 und Alexa 488 gearbeitet werden, was ein Vorteil ist, da diese Fluorophore extrem teuer sind.

In diesem Fall wurde das Cy5- bzw. das Alexa 488-Peptid am C-Terminus der RBD bzw. des Ras eingeführt. Beide modifizierten C-Termini sollten die Bindung der Proteine aneinander nicht beeinflussen und durch die Fluoreszenzmarkierung eine eindeutige Detektion der Proteine gewährleisten. Die C-terminalen Thioester wurden durch Abspaltung der Proteine aus den Fusionsproteinen mit einem Intein gewonnen (Abb.83, C). Die C-terminalen Peptide wurden so synthetisiert, dass sie ein N-terminales Cys aufwiesen, das für die chemische Ligation zur Verfügung stand. Des Weiteren musste eine Aminosäure in den Peptiden vorhanden sein, an deren Seitenkette die Farbstoffe gekoppelt werden konnten. Im Cy5-Peptid war dies ein Lys, dessen Seitenkette mit einer Dde-Gruppe geschützt war und im Alexa 488-Peptid ein zusätzliches Cys. Die Peptide enthielten außerdem einen His-Tag, der benötigt wurde, um die ligierten Proteine von den nicht ligierten abzutrennen. Dies war notwendig, da die Abspaltung der Proteine vom Intein und damit die Generierung des C-terminalen Thioesters nahezu quantitativ gelang, die anschließenden Ligationsreaktionen aber nur Ausbeuten zwischen 50 und 80%

lieferten. Eine Steigerung wurde auch durch längere Reaktionszeiten, oder einen größeren Überschuss an Peptid nicht erreicht. Ein Vorteil den dieser Syntheseweg bietet ist, dass die Proteine nach der Expression in ihrer nativen Tertiärstruktur vorliegen und auch während der Ligation nicht denaturiert werden, d.h. eine Rekonstitution ist nicht notwendig. Allerdings kann durch die Faltung der Proteine auch die Zugänglichkeit für die Peptide zum C-terminalen Thioester eingeschränkt sein, was ein Grund für die unvollständigen Ligationsreaktionen sein könnte. Insgesamt stellt dieser Syntheseweg eine generelle Methode für die C-terminale Markierung von Proteinen mit den genannten Farbstoffen dar, wenn es nicht erforderlich ist, die Markierung ortsspezifisch im Protein durchzuführen. Die hier beschriebenen Peptide sind dabei universell einsetzbar.

Für die semisynthetische Herstellung der menschliche TMPK wurde ebenfalls die „*Expressed Protein Ligation*“ genutzt. Die Rolle der TMPK bei der Metabolisierung des anti-HIV-Medikamentes AZT macht dieses Enzym zu einem interessanten Ziel für das Proteinengineering. Die TMPK besteht aus 212 AS und ist damit durch die chemische Totalsynthese nur unter sehr hohem Aufwand zugänglich. Deshalb wurde die Peptidsynthese mit der biosynthetischen Herstellung von Proteinen verbunden und die TMPK wurde auf semisynthetischem Weg hergestellt. Zuerst wurde die TMPK mit nativer Aminosäuresequenz synthetisiert, um zu prüfen, ob die Synthese durchführbar ist und ob das erhaltene Enzym vollständig aktiv ist. In der Aminosäuresequenz der TMPK tritt an Position 31 ein Cys auf, das eine geeignete Ligationsstelle für ein Peptidsegment bestehend aus 30 AS und der restlichen TMPK(31-212) darstellt. Da die Modifikationen im N-terminalen Bereich, der TMP-Bindungsdomäne der TMPK (AS 1-30) stattfinden sollten, wurde dieser Bereich durch Festphasensynthese hergestellt. Das Leu30 als letzte AS des Peptidsegments ist gut für Ligationsreaktionen geeignet und wurde mit einem C-terminalen Thioester unter Verwendung der Boc-Schutzgruppenstrategie synthetisiert. Die rekombinante Herstellung der N-terminal verkürzten TMPK(31-212) erfolgte wie für das vollständige Protein beschrieben als N-terminales GST-Fusionsprotein (Brundiers et al. 1999). Dabei musste vor das Cys31 eine Schnittstelle für eine Protease eingeführt werden, die so schneidet, dass das Cys31 als N-terminale AS mit freier Aminogruppe verbleibt, da in *E. coli* exprimierte Proteine ansonsten mit einem N-terminalen Met versehen werden. Durch diesen Proteaseschnitt wird gleichzeitig auch das GST abgetrennt, dass nur zur Aufreinigung benötigt wurde. Die Protease Factor Xa bietet sich an, da sie eine der wenigen bekannten Proteasen ist, die nach einer kurzen, definierten Schnittstelle schneidet und bereits für die Generierung von N-terminalen Cysteinresten

genutzt wurde (Cotton et al., 1999). Ein Problem bei der Anwendung des Factor Xa war, dass diese Protease das angebotene Substrat niemals vollständig geschnitten hat und auch bei Zugabe von neuer Protease zeigte sich kein weiterer Reaktionsfortschritt. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Zugänglichkeit der Schnittstelle auf Grund der Sekundärstruktur eines Teils des Proteins sehr gering war. Das Einfügen einiger Glycinreste zwischen der Schnittstelle und dem GST-Protein könnte zu einer Verbesserung der Effizienz in diesem Schritt führen. Eine andere Methode zur Generierung eines N-terminalen Cys stellt das „*Intein Splicing*“ dar, wobei nach der „*Splicing*“-Reaktion das C-terminale Extein ein N-terminales Cys aufweist (Muir et al., 1998). Allerdings ist auch in diesem Fall die Abspaltung nicht vollständig. Der Verdau mit Factor Xa wurde ausgewählt, da es für diese Methode nicht erforderlich war das Gen, das für die verkürzte TMPK kodiert, in einen neuen Expressionsvektor zu klonieren.

Das Fusionsprotein aus TMPK(31-212) und GST wurde durch Überexpression in *E. coli* hergestellt, bildete aber *inclusion bodies*. Im löslichen Überstand konnte nach dem Zellaufschluss kein Fusionsprotein gefunden werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass dem Protein mit den AS 1-30 die TMP-Bindungsdomäne fehlt. Dadurch kann sich nicht die normale Tertiärstruktur ausbilden und das Protein aggregiert. Auch der GST-Tag konnte die Löslichkeit nicht erhöhen. Ein Vorteil der Bildung von *inclusion bodies* war, dass das Fusionsprotein nach dem Lösen mit Puffern, die chaotrope Reagenzien enthielten, relativ sauber vorlag. Nach dem Verdau mit Factor Xa und dem Lösen der Proteine in einem Puffer mit 6 M Guanidinium wurde ein Gemisch aus drei Proteinen erhalten, das in dieser Form zur Ligation mit dem chemisch synthetisierten Peptid eingesetzt werden konnte, da nur die TMPKn` über ein N-terminales Cys verfügt, das für eine irreversible Reaktion mit dem Thioester der TMPK(1-30) unter Ausbildung einer Amidbindung notwendig ist. Das Gemisch bestand aus GST-TMPK-Fusionsprotein, GST-Protein und TMPKn`-Protein. Die beschriebene Selektivität der Ligationsreaktion, die nur mit einem ungeschützten N-terminalen Cys ablaufen kann, erweist sich als großer Vorteil bei Verknüpfungen von Peptiden durch diese Methode. Der C-terminale Reaktionspartner muss nicht aufgereinigt werden, so lange nur dieser ein N-terminales Cys aufweist und die anderen Komponenten in dem Gemisch nicht.

Die Ligationsreaktion wurde, wie bereits für die RBD-Proteine und Ras, unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Aus diesem Grund konnte die, in einem Puffer mit 6 M Guanidinium gelöste, TMPK(31-212) direkt weiterverwendet werden. Für die Reaktion wurde ein großer Überschuss an N-terminalem Peptidsegment eingesetzt,

um eine möglichst vollständige Umsetzung der TMPK(31-212) zu gewährleisten. Nach 36 h Reaktionszeit wurde eine Umsetzung von ca. 80-90%, bezogen auf die TMPKⁿ, beobachtet. Dabei waren in dem Ligationsansatz immer noch das GST-TMPK-Fusionsprotein und das GST enthalten. Insbesondere das GST stellte ein Problem bei der HPLC-Analytik dar, da keine Trennung von der ligierten TMPK erreicht werden konnte. Das Problem der Aufreinigung ließ sich aber in einem Schritt mit der Rückfaltung lösen, da nur die ligierte TMPK in eine Form überführt werden konnte, wo sie auch ohne chaotrope Reagenzien, wie Guanidinium, löslich war. Dies ist eine Aufreinigungsmöglichkeit, die für alle Proteine angewendet werden kann, die nur nach erfolgreicher Ligation rekonstituiert werden können, so dass sie in eine wasserlösliche Form übergehen. Durch diese Methode waren bei dem gewählten Synthesemaßstab Mengen von ca. 1-2 mg semisynthetischer TMPK zugänglich, was ungefähr der Menge an chemisch synthetisiertem Ras entspricht. Auch hier besteht wieder die Möglichkeit gewünschte Modifikationen und Funktionalitäten in den N-Terminus nur durch eine neue Synthese des N-terminalen Peptidsegments einzubringen. Besonders interessant ist dies für Studien, bei denen das Asp-Analogon L-3,3-Difluorasparaginsäure an Stelle des Asp 15 eingebaut werden soll, um zu klären, ob eine protonierte Seitenkettencarboxylgruppe für die katalytische Aktivität des Enzyms entscheidend ist. Die Substitution der Wasserstoffatome an C3 durch Fluor führt zu einer deutlichen Absenkung des pK_a-Wertes dieser Carboxylgruppe. Damit sollte unter physiologischen Bedingungen die deprotonierte Form vorliegen. Außerdem sind die Fluoratome sehr gut als Heterokerne für NMR-Studien geeignet. Problematisch ist nur die Synthese der L-3,3-Difluorasparaginsäure, die in der Literatur nur einmal beschrieben wurde, wobei Perchlorylfluorid (FCIO₃) als Fluorierungsreagenz für Acetessigsäureethylester eingesetzt wurde (Hageman et al., 1977). Dieses Reagenz ist hochexplosiv und nur in Speziallaboren handhabbar. Die Fluorierung mit anderen elektrophilen Fluorierungsmitteln, wie N-Fluor-bis-(phenylsulfonyl)-amin gelang bisher nicht. Synthesen für die homologe 4,4-Difluor-glutaminsäure sind häufiger in der Literatur beschrieben (Konas und Coward, 1999; Hart und Coward, 1993). Allerdings kann das Asp nicht gegen Glu ausgetauscht werden, ohne dass die enzymatische Aktivität verloren geht. Die Synthese eines an der C3-Position monofluorierten Derivats der Asparaginsäure würde auch zu einer Absenkung des pK_a-Wertes der Seitenkettencarboxylgruppe führen. Wenn aber keine Kontrolle der Stereochemie erfolgt, führt dies zur Bildung eines Racemats (Hudlicky und Merola, 1990). Dabei ist der Einfluss der unterschiedlichen Stereochemie an der C3-

Position auf die Struktur und Aktivität des Proteins unbekannt, was diese Verbindung für die Struktur-Funktionsuntersuchungen weniger geeignet erscheinen lässt.

5.2. Faltung der Proteine

Die Faltung der synthetisierten Proteine in ihre native Tertiärstruktur ist unabdingbare Voraussetzung zur Erlangung ihrer biologischen Funktionsfähigkeit. Dieser Faltungsprozess ist bei Proteinen, z.B. durch Knüpfung von Disulfidbrücken und Vermeidung von Aggregaten durch Wahl des richtigen Konzentrationsbereichs, sehr komplex. Bisher gibt es jedoch kein Beispiel dafür, dass sich ein chemisch synthetisiertes Protein nicht korrekt gefaltet hätte (Dawson und Kent, 2000). Die Tertiärstrukturen einiger synthetisierter Proteine wurde durch NMR-Messungen und durch Röntgenkristallographie bestimmt und sie unterscheiden sich nicht von denen, der rekombinant hergestellten Proteine (Wilken et al., 1999 und Lu et al., 1999). Das bedeutet, dass die Faltung von kleinen Proteinen, die meist nur aus einer Domäne bestehen und die durch die chemische Synthese zugänglich sind, auch *in vitro* sehr gut funktioniert. Des Weiteren gibt es Beispiele für chemisch synthetisierte Proteine, die die korrekte Tertiärstruktur angenommen haben, obwohl in dieser Struktur mehrere Disulfidbrücken auftreten (Hackeng et al., 1997). Dies ist ein Beweis dafür, dass die Primärstruktur der Proteine ihre Tertiärstruktur eindeutig bestimmt.

Die Untersuchung der verschiedenen chemisch synthetisierten RBD-Proteine, nach der Faltung, durch CD-Spektroskopie zeigte keine Unterschiede zu dem CD-Spektrum der rekombinant hergestellten RBD. Daraus lässt sich schließen, dass die Proteine die korrekte Tertiärstruktur angenommen haben und auch die eingebauten Modifikationen keine Veränderungen verursachen, die diese Tertiärstruktur wesentlich stören.

Die Faltung des Ras gelang ebenfalls, allerdings nur in Gegenwart eines Guanosinnukleotids, wie GppNHp. Das Nukleotid ist notwendig, da es als Gerüst für die korrekte Faltung des Proteins dient. Aus Untersuchungen mit rekombinant hergestelltem Ras ist bekannt, dass das Fehlen von Nukleotid das Protein sehr stark destabilisiert (Zhang und Matthews, 1998). Bei den ersten Faltungsversuchen wurde aber auch in Gegenwart von Nukleotid keine vollständige Faltung beobachtet. Es falteten sich ca. 50% des eingesetzten Proteins. Das restliche Protein verblieb in einer unlöslichen Form. Die Faltungseffizienz konnte stark gesteigert werden, in dem das lyophilisierte, aufgereinigte Ras(1-166) in einem Puffer mit 5 M Guanidinium und einem Überschuss an Nukleotid

gelöst wurde. Das Guanidinium wurde dann durch Verdünnen und Dialyse entfernt. Unter diesen Bedingungen faltete sich das eingesetzte Ras-Protein vollständig.

Die Faltung der semisynthetischen TMPK erfolgte während eines Dialyseschrittes bei dem vorhandenes Guanidinium abgetrennt wurde. Dabei ist Voraussetzung, dass die Substrate der TMPK (TMP und ATP) im Überschuss vorhanden sind, damit hier, genau wie beim Ras-Protein, diese Nukleotide als Gerüst für die Faltung dienen können. Während dieser Dialyse wird die TMPK auch aufgereinigt, da nur dieses Protein in eine lösliche Form übergeht und das GST-TMPK-Fusionsprotein, sowie das GST unlöslich bleiben. Die erreichte Reinheit der TMPK ist nicht so hoch, wie die der HPLC-gereinigten RBD-Proteine oder die des Ras. Aktivitätstests zeigen aber, dass die semisynthetische TMPK die Phosphorylierung von TMP zu TDP unter Verbrauch von ATP ähnlich gut katalysiert, wie die vollständig rekombinant hergestellte TMPK.

Daraus geht hervor, dass auch nukleotidbindende Proteine, die durch chemische Synthese oder Semisynthese hergestellt wurden in ihre korrekte Tertiärstruktur gefaltet werden können, wobei allerdings die Anwesenheit der entsprechenden Substrate benötigt wird.

5.3. Die Fluoreszenzmarker

Die Auswahl der Fluoreszenzmarker für die Modifikation der synthetisierten Proteine ist von besonderer Bedeutung, da sie direkt in die Aminosäuresequenz eingebaut werden. Sie müssen die chemischen Funktionalitäten einer AS aufweisen, da nur so der Einbau in die Peptide während der Festphasensynthese gelingt. Die zu verwendenden nicht-codierten, fluoreszierenden AS müssen außerdem mit der Chemie der Peptidsynthese, d.h. entweder Boc- oder Fmoc-Schutzgruppenstrategie, kompatibel sein.

Des Weiteren sollten die nicht-codierten, fluoreszierenden AS möglichst geringe sterische Ansprüche haben, da sie ansonsten die Faltung des Proteins oder die Wechselwirkung mit anderen Proteinen stören können. Dies ist hier besonders wichtig, da die Fluoreszenzmarker nicht über einen langen, flexiblen Linker mit dem Protein verbunden sind, wie es bei den kommerziell erhältlichen Fluoreszenzmarkern der Fall ist, die mit den Amino- oder Thiolgruppen in rekombinant hergestellten Proteinen reagieren. Bei dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz werden die Fluoreszenzmarker außerdem immer so in den Proteinen positioniert, dass sie direkt in der Nähe der Bindungsfläche bzw. -tasche sind. Dadurch ist die Gefahr einer Beeinflussung der Proteinaktivität sehr groß und diese kann

nur durch sehr kleine Fluorophore verringert werden. Es muss ein Kompromiss gefunden werden, bei dem der Fluoreszenzmarker so in das Zielprotein inkorporiert wird, dass eine Beobachtung des gewünschten Prozesses möglich ist, ohne dass dieser gestört wird.

Ein großer Vorteil für eine solche fluoreszierende AS, die als spektroskopische Sonde für die Detektion von Konformationsänderungen, die durch Wechselwirkungen mit anderen Molekülen hervorgerufen werden, dienen soll, ist eine hohe Sensitivität bezüglich Veränderungen in der Umgebung. Eine große Rolle spielen dabei Wechsel zwischen hydrophoben und hydrophilen Bedingungen, da dies z.B. die Quantenausbeute von Fluorophoren und damit die Sensitivität beeinflusst.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Auswahl der fluoreszierenden AS ist der Spektralbereich, in dem der Fluorophor angeregt wird und in dem die Fluoreszenz-emission erfolgt. Das Fluoreszenzsignal muss sich deutlich von der intrinsischen Fluoreszenz von Proteinen, die durch Trp, Tyr und Phe verursacht wird, unterscheiden. Eine möglichst hohe Quantenausbeute und ein hoher Extinktionskoeffizient erleichtern die Detektion des Fluoreszenzsignals und erlauben Messungen bei geringen Konzentrationen. Besonders vorteilhaft sind Fluoreszenzmarker, die sich durch eine hohe Photostabilität auszeichnen und durch Laser-Licht anregen lassen, was z.B. eine Voraussetzung für Einzelmolekülmessungen ist.

Ein Fluoreszenzmarker, der einen Großteil dieser Anforderungen erfüllt, ist die Nitrobenzofurazangruppe. Das 4-Chlor-7-nitrobenzofurazan lässt sich in einer einfachen Reaktion an die nicht-codierte AS N²-Boc-L-2,3-diaminopropionsäure koppeln, was zu der nicht-codierten, fluoreszierenden AS N²-Boc-N³-Nitrobenzofurazan-L-2,3-diaminopropionsäure (NBD-Dap) führt, die direkt für die Festphasensynthese unter Verwendung der Boc-Schutzgruppenchemie zur Verfügung steht. NBD-Dap lässt sich bei 475 nm anregen und zeigt ein Emissionmaximum bei 535 nm. Die relativ große Stokes-Verschiebung erleichtert die Abtrennung des anregenden Lichtes bei der Detektion der Fluoreszenz.

Eine andere nicht-codierte AS, die die genannten Bedingungen erfüllt, ist das N-Boc-L-(6,7-dimethoxy-4-coumaryl)-alanin. Diese AS wurde durch eine asymmetrische Synthese entsprechend der modifizierten Vorschrift von Bennett et al. (1999) dargestellt und lässt sich bei einer Wellenlänge von 350 nm anregen und zeigt ein Emissionsmaximum bei 439 nm. Durch die Überlappung des Emissionsmaximums von Dmca mit dem Wellenlängenbereich für die Anregung des NBD-Dap sind FRET-Messungen mit diesen Fluoreszenzmarkern möglich.

Die Auswahl der Fluoreszenzmarker Cy5 und Alexa 488 erfolgte unter anderen Voraussetzungen als die der bis jetzt beschriebenen Fluorophore. Das Cy5 und Alexa 488 sind sterisch sehr anspruchsvolle Farbstoffe und aus diesem Grund nicht für den Einbau in die aktiven Zentren oder Bindungsstellen von Proteinen geeignet. Sie würden die Wechselwirkung mit anderen Proteinen oder kleinen Liganden stören und keine Möglichkeit zur Beobachtung dieser Prozesse liefern. Ihr großer Vorteil liegt jedoch darin, dass sie sehr hohe Extinktionskoeffizienten aufweisen und ihre Anregungs-, sowie Emissionsmaxima zwischen 590 und 670 nm liegen. Dadurch können sie durch Laser angeregt werden und auch in sehr geringen Konzentrationen, oder als Einzelmoleküle detektiert werden. Sie sind auch sehr photostabil und bleichen langsam bei der Anregung mit energiereichem Laserlicht. Damit sind diese Fluorophore gut geeignet, um als universelle Marker an Proteinen zu dienen mit denen z.B. die Lokalisation der Proteine in Zellen beobachtet werden kann, oder die für Screening-Verfahren mit hohem Durchsatz eingesetzt werden können. Insbesondere Einzelmolekülmessungen unter Anwendung der Zweifarben-Kreuzkorrelationsspektroskopie können genutzt werden, um Inhibitoren der Ras-RBD-Wechselwirkung zu finden.

Weitere Anwendungen der beiden Farbstoffe werden dadurch ermöglicht, dass eine Energieübertragung vom Alexa 488 auf das Cy5 möglich ist. Dies soll z.B. bei dem Ras/C191_(Alexa 488)/His-RBD/K137_(Cy5)/His-Paar ausgenutzt werden, um die Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen zu beobachten, da nur bei Bildung des Komplexes aus aktiviertem, Alexa 488 markiertes Ras und Cy5 markierter RBD ein FRET-Signal auftritt.

5.4. Kinetische und spektroskopische Charakterisierung der Proteine

Aufbauend auf der Arbeit von Sydor et al. (1999) wurden die nicht-codierte, fluoreszierende AS Dmca und NBD-Dap ortsspezifisch in die RBD eingebaut, um die Wechselwirkung mit aktiviertem Ras zu beobachten. Der Einbau erfolgte an der Position 91 anstelle eines Leucins durch Festphasensynthese der RBD-Peptide. Diese Position wurde durch Analyse der Kristallstruktur des Komplexes aus dem Ras-homologen Protein Rap1a und der RBD ausgewählt, da sie in der Nähe der Bindungsstelle zwischen der RBD und Ras liegt, aber die Bindung kaum beeinflussen sollte (Nassar et al., 1995). Sydor et al. (1999) konnten, durch den Einbau eines Tryptophananalogons zeigen, dass diese

Position geeignet ist und dass eine Fluoreszenzänderung bei Bindung der RBD an Ras auftritt. Die dabei beobachtete Fluoreszenzänderung war allerdings so gering, dass sie nicht ausreichte, um die Detektion von Ras mit immobilisierter, fluoreszenzmarkierter RBD zu ermöglichen. Aus diesem Grund war es notwendig andere fluoreszierende AS zu finden, die dies ermöglichen und die alle Bedingungen für einen erfolgreichen Einbau an der Position 91 erfüllen, ohne die Wechselwirkung mit dem Ras-Protein zu stören.

Die fluoreszierenden AS N³-Nitrobenzofurazan-L-1,3-diaminopropionsäure und L-(6,7-Dimethoxy-4-coumaryl)-alanin konnten zum erstenmal durch Festphasensynthese in ein Protein eingebaut werden. Das Dmca wurde bisher nur in kurze Modellpeptide eingebaut (Bennett et al., 1999) und das NBD-Dap wurde durch Suppression eines Nonsense-Codons in *Xenopus* Oocyten in den NK2-Rezeptor eingebaut und dort für Untersuchungen bezüglich der Lokalisierung des Rezeptors in der Membran genutzt (Turcatti et al., 1996). Die verschiedenen fluoreszenzmarkierten RBD-Proteine wurden in Ausbeuten von ~15-30 mg erhalten, wobei die Verluste hauptsächlich auf die HPLC-Reinigungsschritte zurückzuführen sind (Sakakibara, 1999).

Die Wechselwirkung der chemisch synthetisierten RBD-Proteine mit aktiviertem Ras wurde mit Hilfe der Stopped flow Methode untersucht, um die biologische Funktionsfähigkeit, zumindest innerhalb des hier verwendeten Modellsystems, festzustellen. Es war notwendig eine Methode anzuwenden, die die Beobachtung schnell verlaufender Reaktionen, wie die zwischen RBD und Ras·GppNHp, erlaubt. Das Ergebnis von Sydor et al. (1999), dass sich die chemisch synthetisierte und die rekombinant hergestellte RBD bezüglich ihrer Affinität zu Ras·mGppNHp nicht unterscheiden, konnte bestätigt werden ($K_D = 170 \text{ nM}$). Die Wechselwirkung zwischen der RBD/L91NBD-Dap und Ras·GppNHp konnte, unter Ausnutzung des von der NBD-Dap produzierten Fluoreszenzsignals, ebenfalls untersucht werden. Dabei wurden aber, im Gegensatz zu den Messungen mit mGppNHp, biphasische Bindungskurven erhalten, deren langsame, zweite Phase Konzentrations-unabhängig war. Es zeigte sich, dass der Fluoreszenzmarker einen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation hat, der dazu führt, dass der K_D -Wert um den Faktor 3 höher ist, als für die RBD-Proteine mit nativer AS-Sequenz ($K_D = 610 \text{ nM}$). Eine ähnliche Veränderung des K_D -Wertes wird für die Wechselwirkung der RBD/L91BD-Dap/His mit Ras·GppNHp beobachtet ($K_D = 540 \text{ nM}$). In der Arbeit von Sydor et al. (1999) wurde bereits gezeigt, dass der C-terminale His-Tag der RBD einen Einfluss auf die Affinität zu Ras·GppNHp besitzt, der für eine Erhöhung des K_D -Wertes um den Faktor 2 verantwortlich ist. Aus den erhaltenen Ergebnissen für

die RBD/L91NBD-Dap/His kann geschlossen werden, dass die beiden Effekte durch den His-Tag und den Einbau des Fluoreszenzmarkers, die zur Erhöhung der K_D -Werte führen, nicht synergistisch wirken, da ansonsten der K_D -Wert für die RBD/L91NBD-Dap/His noch weiter erhöht sein müsste.

Des Weiteren wurden Stopped flow Versuche durchgeführt, bei denen der Energietransfer zwischen den verschiedenen Fluorophoren ausgenutzt wurde. Dies funktioniert einerseits mit der RBD/L91NBD-Dap/His und Ras-mGppNHp, wobei die mant-Gruppe des Nukleotids angeregt wird und der Energietransfer zum NBD-Dap stattfindet, wenn beide Fluorophore sich in räumlicher Nähe zueinander befinden. Diese Nähe entsteht durch die Bindung der RBD an Ras. Die Beobachtung der Fluoreszenzemission der NBD-Dap in den FRET-Experimenten erlaubt die Bestimmung eines K_D -Wertes, wobei dieser um den Faktor 3 größer ist als der K_D -Wert, der durch direkte Anregung der NBD-Dap erhalten wurde. Die Veränderung des K_D -Wertes ist auf eine kleinere Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation zurückzuführen. Die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation bleibt unverändert.

Das Auftreten einer zweiten, langsameren Phase bei direkter Beobachtung der NBD-Fluoreszenz kann auf eine lokale Änderung der Struktur zurückgeführt werden, die bei den FRET-Messungen, oder den Messungen mit mGppNHp nicht detektiert werden kann. Diese Strukturveränderung ist wahrscheinlich unabhängig von dem linearen Bindungsmechanismus von Ras an RBD und trägt durch ihre kleine Gleichgewichtskonstante nicht zu einer wesentlichen Erhöhung der Affinität bei.

Die kinetischen Parameter für die Wechselwirkung zwischen der RBD/L91Dmca und Ras-GppNHp konnten nicht durch direkte Beobachtung des Fluoreszenzsignals des Dmca erhalten werden, da das Signal-Rausch-Verhältnis bei den Stopped flow Messungen sehr schlecht war und keine eindeutige Interpretation der Daten zuließ. Um dennoch die Parameter für die Wechselwirkung dieser beiden Proteine zu erhalten, wurden Messungen mit Hilfe des Energietransfers durchgeführt. In diesem Fall wurde ein Trp im Ras-GppNHp angeregt und die Emission des Dmca beobachtet. Ras besitzt kein natürliches Trp und aus diesem Grund musste die Ras/Y32W-Mutante benutzt werden. In diesem Protein ist das Trp in der Nähe des P-Loops positioniert (Rensland et al., 1995). Der erhaltene K_D -Wert beträgt 480 nM und es zeigt sich ein Einfluss des eingebauten Fluoreszenzmarkers auf die Wechselwirkung, der zu einer Erhöhung des K_D -Wertes um den Faktor 3 im Vergleich zur nativen RBD führt.² Der Einfluss des Dmca auf die

² Für eine Zusammenfassung aller kinetischen Parameter siehe Tab. 2, S. 65.

Bindung kann auf die sterischen Ansprüche oder die chemischen Funktionalitäten, wie das Lacton, zurückgeführt werden.

Um zu bestätigen, dass auch das chemisch synthetisierte Ras die biologisch aktive Tertiärstruktur angenommen hat, wurde die Wechselwirkung mit der ebenfalls synthetisch hergestellten RBD/L91NBD-Dap untersucht. Die durchgeführten Stopped Flow Messungen lieferten einen K_D -Wert von 480 nM, der sehr gut mit dem Wert übereinstimmt, der für die Wechselwirkung der RBD/L91NBD-Dap mit rekombinant hergestelltem Ras-GppNHp erhalten wurde. Die einzelnen erhaltenen Kurven waren identisch mit denen von rekombinant hergestelltem Ras. Damit wurde gezeigt, dass die biologische Funktionsfähigkeit zweier miteinander wechselwirkender Proteine durch chemische Totalsynthese generiert werden kann. Das Ras-RBD-System ist das erste Beispiel für ein vollständig chemisch synthetisiertes Protein-Effektor-System, das *in vitro* eine normale biologische Aktivität zeigt.

Die Nukleotidbindungseigenschaften des chemisch synthetisierten Ras wurden ebenfalls untersucht, um zu zeigen, dass nicht nur die Wechselwirkung mit der RBD vergleichbar mit biosynthetischem Ras ist, sondern auch die Nukleotidbindung. Die Verdrängungskinetik von GppNHp aus dem chemisch synthetisierten und dem rekombinanten Protein mit einem fluoreszierendem GDP-Analog lieferte nahezu identische Ergebnisse. Dies beweist weiterhin, dass das Ras(1-166) eine mit dem rekombinanten Protein vergleichbare Tertiärstruktur aufweist und *in vitro* die selben biologischen Funktionen erfüllen kann wie dieses.

In die TMPK wurde auf semisynthetischem Weg ebenfalls die nicht-codierte, fluoreszierende AS NBD-Dap eingebaut, um mit Hilfe des Fluoreszenzsignals die Bindung von Nukleotiden in der TMP-Bindungstasche verfolgen zu können. Die Position wurde, wie bereits für die RBD, durch Analyse der vorliegenden Kristallstruktur der TMPK ausgewählt (Ostermann et al., 2000). Dabei bot sich besonders die Position 25 an, da sie sich kurz hinter dem P-Loop befindet und damit sehr nahe an der Bindungstasche liegt. Die fluoreszierende AS ersetzt an dieser Stelle ein Lys, dessen Seitenketten, zumindest im Kristall, keine Wechselwirkungen mit dem Nukleotid oder anderen AS ausbildet. Ein Aktivitätstest mit der TMPK bzw. der TMPK/K25NBD-Dap zeigte, nach erfolgreicher Synthese und Faltung, dass die fluoreszenzmarkierte TMPK ca. $\frac{1}{4}$ der enzymatischen Aktivität von rekombinant hergestellter TMPK aufweist. Die semisynthetische TMPK mit der nativen Aminosäuresequenz jedoch phosphoryliert TMP ähnlich gut, wie die biosynthetische Form des Enzyms. Dies beweist, dass der Einbau des

Fluoreszenzmarkers die Funktionsfähigkeit des Enzyms beeinträchtigt. Entweder wurden bisher nicht erkannte Wechselwirkungen durch den Austausch des Lys gestört, oder die Proteinfaltung wird durch den größeren sterischen Anspruch des eingebauten Fluoreszenzmarkers, im Vergleich zum Lys, verändert. Daraus geht hervor, dass die Entwicklung kleiner fluoreszierender AS mit geeigneten spektroskopischen Eigenschaften sehr wichtig für alle Anwendungen ist, wo Bindungs- oder Reaktionsmechanismen in Proteinen direkt beobachtet werden sollen.

Die Nutzung der NBD-Dap an Position 25 in der TMPK zur Beobachtung der Bindung von Bisubstratinhibitoren, wie AP₅T, an das Enzym über Veränderung des Fluoreszenzsignals war nicht erfolgreich, da keine Veränderung des Signals bei Zugabe des Inhibitors zum nukleotidfreien Protein auftrat. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das AP₅T nicht gebunden wird, da der Fluoreszenzmarker den Bindungsprozess stört, oder die Umgebungsänderung um den Fluorophor herum ist so gering, dass die Fluoreszenzemission nicht beeinflusst wird. Da das AP₅T allerdings im Aktivitätstest mit der TMPK/K25NBD die Phosphorylierung von TMP zu TDP inhibierte, kann ausgeschlossen werden, dass dieses Nukleotid nicht an das Enzym bindet. Die TMPK/K25NBD ist nur bedingt für die Untersuchung der Nukleotidbindungseigenschaften geeignet, da dieses modifizierte Enzym eine geringere enzymatische Aktivität als das native Protein aufweist. Deshalb könnten die gewonnenen Ergebnisse nicht unbedingt auf das native Enzym übertragen werden. Eine mögliche Anwendung für dieses fluoreszenzmarkierte Protein wäre die Untersuchung von Faltungsprozessen bzw. Rückfaltungsprozessen durch Beobachtung des Fluoreszenzsignals.

Für die bereits diskutierten Stopped flow Experimente wurden die spektroskopischen Eigenschaften der chemisch synthetisierten und fluoreszenzmarkierten RBD-Proteine ausgenutzt. Die ersten Untersuchungen dieser Eigenschaften erfolgten unter *steady-state* Bedingungen, wobei vor allem der Einfluss der Zugabe von Ras-GppNHp bzw. Ras-GDP untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass bei keiner der beiden verwendeten fluoreszierenden, nicht-codierten AS bei Bindung an Ras-GppNHp eine Verschiebung des Emissionsmaximums auftrat. Eine solche Verschiebung wäre mit einer „Ja-Nein“-Antwort für die Bildung des Komplexes aus RBD und Ras-GppNHp zu vergleichen und wesentlich einfacher zu detektieren und zu interpretieren, als die bei beiden Fluoreszenzmarkern beobachtete Verringerung der Signalintensität. Diese geringere Intensität der Fluoreszenzemission im Komplex mit Ras-GppNHp weist darauf hin, dass

es zu einem Quenchingprozess im Komplex kommt, oder dass die Fluorophore einer Konformationsänderung des Proteins ausgesetzt sind, die zu einer hydrophileren Umgebung führt. Es ist bekannt, zumindest für die NBD-Gruppe, dass die Fluoreszenzintensität in einer hydrophoben Umgebung wesentlich höher ist, als in einer hydrophilen, da dort die Quantenausbeute höher ist.

Beide Fluorophore zeigen ein ähnliches Verhalten der Fluoreszenzintensität bei Bindung an Ras-GppNHp. Allerdings ist die Intensitätsabnahme von ca. 20% des Ausgangssignals bei der RBD/L91NBD-Dap erheblich größer, als bei der RBD/L91Dmca, wo die Abnahme nur ca. 12% der Gesamtintensität beträgt. Die Zugabe von Ras-GDP zeigte, bei einer Konzentration beider Proteine von 2 μM , keinen Einfluss auf die Fluoreszenzemission, da Ras-GDP ca. 200mal schwächer gebunden wird als Ras-GppNHp (Herrmann et al., 1995). NBD-Dap ist auf Grund der größeren Änderung des Fluoreszenzsignals besser für den Nachweis von aktiviertem Ras geeignet. Dies zeigt sich auch in den Stopped flow Versuchen, wo mit dem Dmca-Marker keine auswertbaren Messungen möglich waren.

Die spektroskopischen Eigenschaften der RBD/L91NBD-Dap ließen sich durch Zusatz von verschiedenen Additiven beeinflussen. Die Zugabe von polaren, aprotischen Lösungsmitteln, wie DMF oder DMSO bis zu Konzentrationen von 5% führte dazu, dass der Unterschied zwischen der Fluoreszenzintensität der freien RBD/L91NBD-Dap und dem Komplex mit Ras-GppNHp geringer wurde. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Lösung insgesamt einen hydrophoberen Charakter bekommt und somit kann sich eine Umgebungsänderung bei Komplexbildung nicht mehr so dramatisch auswirken und verursacht keine starke Veränderung der Fluoreszenzemission.

Das Fluoreszenzverhalten kehrt sich bei Zugabe von 5% Hexafluorisopropanol (HFIPA) um. Es kommt zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität der freien RBD/L91NBD-Dap um 50% im Vergleich zu Lösungen ohne HFIPA. Bei Bildung des Komplexes mit Ras-GppNHp verdoppelt sich die Fluoreszenzintensität dann jedoch. Eine Titration von RBD/L91NBD-Dap in Gegenwart von Ras-GppNHp und ohne Ras-GppNHp zeigte, dass die größte Differenz der Fluoreszenzintensität bei HFIPA-Konzentrationen zwischen 5 und 7,5% auftritt. Bei höheren Konzentrationen nähern sich die Intensitäten mit und ohne Ras-GppNHp langsam an, da es zu einer Denaturierung der Proteine kommt, die die Komplexbildung verhindert. Deshalb liegt in beiden Fällen nur freie, entfaltete RBD/L91NBD-Dap vor³. Der Einfluss fluorierter Alkohole auf Proteine und Peptide

³ Für die entsprechenden Daten siehe Abb. 36 und 37, S. 67 und 68.

wurde bereits häufig untersucht, allerdings ist immer noch unklar welche Wirkung solche Verbindungen, wie Trifluorethanol (TFE) oder Hexafluorisopropanol (HFIPA), als Cosolventien im Einzelnen haben (Reiersen und Rees, 2000; Buck, 1998). TFE und auch HFIPA werden häufig benutzt um die Löslichkeit von Peptiden oder Proteinen zu erhöhen, da sie solubilisierende Eigenschaften haben und die Aggregation verhindern. Außerdem besitzen sie helixstabilisierende Eigenschaften (Luidens et al., 1996). Die Einflüsse sind aber jeweils stark abhängig von der Aminosäuresequenz, der Konzentration des Cosolvenz und der Zusammensetzung des restlichen Puffers. Die Weise, wie die fluorierten Alkohole die Struktur von Proteinen und Peptiden beeinflussen, schließt die Verstärkung von internen Wasserstoffbrückenbindungen, die Zerstörung von Wasserstrukturen, die Abschwächung hydrophober Effekte, das Eindringen dieser Solvenzmoleküle in den Proteinkern und die bevorzugte Solvatisierung bestimmter chemischer Gruppen ein (Buck, 1998; Rajan und Balaram, 1996). Für den Nachweis der Bindung von RBD an aktiviertes Ras ist der Zusatz von HFIPA auch im Hinblick auf Messungen mit immobilisierter RBD günstig, da durch die größere Änderung des Messsignals das Signal-Rausch-Verhältnis besser wird.

Die Zugabe von Acrylamid in Konzentrationen von 2 bis 5% zeigte keine Auswirkung auf die Fluoreszenzintensität. Das wäre aber zu erwarten gewesen, wenn die Wirkung des HFIPA nur auf einem Quenchingeffekt beruht, da Acrylamid die Fluoreszenz verschiedener Fluorophore sehr effektiv quencht. Daraus kann geschlossen werden, dass die Wirkung des HFIPA nicht nur auf Fluoreszenzquenching zurückzuführen ist.

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer der RBD/L91NBD-Dap im Komplex mit und ohne Ras-GppNHp gelang nur mit einem relativ großem Fehler, da für die durchgeführten Messungen kein geeigneter Fluorophor mit bekannter Lebensdauer als Referenz zur Verfügung stand. Aus den Messungen ging hervor, dass die Fluoreszenzlebensdauer im Komplex mit Ras-GppNHp nur halb so groß ist, wie die der freien RBD/L91NBD-Dap. Dies bedeutet, dass sich der angeregte Zustand des Fluorophors im Komplex wesentlich schneller abbaut. Die Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer der RBD/L91NBD-Dap bei Bindung an Ras-GppNHp liefert eine weitere Möglichkeit, außer der Veränderung der Fluoreszenzintensität, aktiviertes Ras zu detektieren. Allerdings ist die Meßmethode für Fluoreszenzlebensdauern wesentlich aufwendiger, als Messungen der Fluoreszenzintensität, oder der Wellenlänge des Emissionsmaximums und damit ungeeignet für die einfache Detektion von aktiviertem Ras.

Die Fluoreszenzlebensdauer der RBD/L91Dmca konnte mit einer wesentlich höheren Genauigkeit bestimmt werden, da für den Anregungs- und Emissionsbereich des Dmca ein passender Referenzfluorophor zur Verfügung stand. Die gemessenen Lebensdauern für die RBD/L91Dmca im Komplex mit und ohne Ras-GppNHp unterscheiden sich nicht. Der Dmca-Marker ermöglicht also auch durch Messung der Fluoreszenzlebensdauer keine direkte Detektion der Bindung von aktiviertem Ras an die RBD/L91Dmca.

5.5. Entwicklung eines Biosensors

Die RBD/L91NBD-Dap/His stellt ein einzigartiges System dar, mit dem die Detektion von aktiviertem Ras über die Veränderung der NBD-Fluoreszenz bei Komplexbildung durchgeführt werden kann. Die Entwicklung eines Biosensors für die Detektion von aktiviertem Ras, z.B. in Tumorgewebe, auf Fluoreszenzbasis setzt die gezielte Immobilisierung der RBD/L91NBD-Dap/His voraus. Eine weitere Anwendung für einen solchen Biosensor wäre die Suche nach einem spezifischen Inhibitor der Ras-RBD-Wechselwirkung. Dabei ist es besonders wichtig, dass das Protein so auf eine Oberfläche aufgebracht wird, dass die Wechselwirkung mit Ras ungestört stattfinden kann. Dies ist meist nicht leicht zu erreichen, da Proteine sehr gut an Kunststoff oder Glasoberflächen adsorbiert werden und dabei ihre Funktionsfähigkeit verlieren.

Die Immobilisierung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Einmal über sogenannte Affinitätstags, wie GST, Biotin oder den His-Tag, die eine starke spezifische Wechselwirkung mit einem immobilisierten Substrat oder Metallion eingehen, oder über eine kovalente Immobilisierung durch Ausbildung einer chemischen Bindung. Der Vorteil der Immobilisierung über einen Affinitätstag ist die Reversibilität der Bindung, die es erlaubt das Protein zurückzugewinnen und die Oberfläche erneut zu beladen. Der Nachteil dieser Methode ist das sogenannte „ausbluten“ der Oberfläche, was nach einiger Zeit für einen deutlichen Verlust an immobilisierter Spezies führt. Dieser Nachteil tritt bei der kovalenten Immobilisierung nicht auf. Bei der kovalenten Immobilisierung kann man wiederum verschiedene Verfahren unterscheiden, nämlich einmal die gezielte Ausbildung einer chemischen Bindung durch Einführung einer einzigartigen funktionellen Gruppe in das Protein, wie z.B. eine Keto- oder Aldehydfunktion und die weniger gezielte Immobilisierung über Seitenkettenfunktionalitäten der natürlichen AS, wie die ϵ -Aminogruppe des Lys. Bei dem zweiten Verfahren gibt es meist verschiedene Möglichkeiten, über welchen Lysinrest die Immobilisierung erfolgt, was zu

unterschiedlichen räumlichen Anordnungen des selben Proteins auf der Oberfläche führt. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit, dass einige der gebundenen Proteinmoleküle ihre biologische Funktion erfüllen können, erhöht (MacBeath und Schreiber, 2000).

In dieser Arbeit wurde die Immobilisierung der fluoreszenzmarkierten RBD über den C-terminalen His-Tag durchgeführt, da keine geeignete Oberfläche für die kovalente Immobilisierung über die Ketofunktion der Lävulinsäure zur Verfügung stand. Die Oberfläche sollte aus einem, für die Fluoreszenzemission der RBD/L91NBD-Dap/His durchlässigem Material bestehen, wie z.B. SiO₂. Die Präparation solcher Oberflächen, die mit einer Hydrazin- oder Hydrazidfunktion gebunden an eine lineare Alkylkette versehen sind, ist bis jetzt nicht gelungen (C. Hoffmann, persönliche Mitteilungen). Die Alkylketten sind notwendig, um eine einheitliche Bedeckung und Orientierung der Oberfläche zu gewährleisten („*self assembling monolayers*“). Die Synthese einer solchen Oberfläche mit einer Ni-NTA-Beschichtung ist, bis jetzt, ebenfalls noch nicht gelungen. Die Entwicklung einer Goldoberfläche mit einer Ni-NTA-Beschichtung wurde in der Literatur beschrieben, wobei sich die Oberflächenchemie aber aufgrund der verschiedenen Materialien stark unterscheidet (Sigal et al., 1996).

Als Oberfläche zur Immobilisierung der RBD/L91NBD-Dap/His wurden Ni-NTA-modifizierte Mikrotiterplatten der Firmen Qiagen oder Pierce benutzt. Dabei war es besonders wichtig die unspezifische Bindung der RBD/L91NBD-Dap/His zu unterdrücken, da Versuche mit RBD/L91NBD-Dap ohne His-tag gezeigt haben, dass dieses Protein ebenfalls an die Oberfläche bindet. Dabei erwies sich die Vorbehandlung der Platten mit einem Puffer, der 5% BSA enthielt als unzulänglich, obwohl damit alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Kunststoffoberfläche der Platten abgesättigt werden sollten. Das BSA wurde durch fettfreies Milchpulver ersetzt, was aber immer noch nicht zu einem befriedigenden Ergebnis führte, da die unspezifische Bindung immer noch sehr hoch war. Eine Erklärung dafür könnten drei Histidinreste sein, die in der nativen Sequenz der RBD auftreten und eine ähnlich Wechselwirkung, wie der C-terminale His-Tag mit dem Ni²⁺ eingehen können. Um diese semispezifische Bindung zu unterdrücken wurden zwei weitere Waschschrte mit einem Puffer, der 50 mM Imidazol enthielt und mit einem Puffer, der 0,05% Tween20 enthielt, eingeführt. Probleme mit unspezifischer Bindung von Proteinen, wie gerade beschrieben, können dadurch umgangen werden, dass zur Immobilisierung chemische Funtionalitäten genutzt werden, die ansonsten in Proteinen nicht auftreten, wie z.B. die bereits beschriebene Ketofunktion.

Die Beladung der Oberfläche mit RBD/L91NBD-Dap/His erfolgte bei einer Konzentration von 2 μM , da Verdünnungsreihen gezeigt haben, dass eine Abhängigkeit zwischen Konzentration bei der Beladung und resultierender Fluoreszenzintensität nach dem Waschen besteht. Eine Steigerung der Fluoreszenzintensität auf der Oberfläche konnte bei Konzentrationen der RBD/L91NBD-Dap/His über 2 μM nicht mehr beobachtet werden. Bei Inkubation der Oberfläche mit RBD/L91NBD-Dap/His Konzentrationen unterhalb von 250 nM lag die resultierende Fluoreszenz nicht mehr signifikant über der Hintergrundfluoreszenz. Die Zugabe von Ras·GppNHp in Konzentrationen, die denen der für die Oberflächenbeladung verwendeten RBD/L91NBD-Dap/His entsprachen, führte immer zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Bei Konzentrationen unterhalb von 300 nM traten aber keine signifikanten Änderungen der Fluoreszenzintensität mehr auf, was dadurch erklärt werden kann, dass in diesem Konzentrationsbereich nicht mehr hauptsächlich der Komplex aus beiden Proteinen vorliegt, sondern viel freies Ras·GppNHp (vgl. K_D -Werte, Tab. 2, S. 65). Die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Messungen auf der Oberfläche stimmte sehr gut mit den Ergebnissen überein, die für Messungen in Lösung erhalten wurden. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die immobilisierte RBD/L91NBD-Dap/His ähnlich verhält, wie in Lösung. Die Messungen auf der Oberfläche in Gegenwart von HFIPA zeigten, dass dieses Kosolvenz den selben Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten hat, wie bei Messungen in Lösung. Allerdings steigt bei diesen Messungen die Nachweisgrenze für Ras·GppNHp auf eine Konzentration von 500 nM an. Die kinetischen Parameter für die Wechselwirkung zwischen RBD/L91NBD-Dap/His und Ras·GppNHp in Gegenwart von 5% HFIPA sind nicht bekannt und deshalb kann nur vermutet werden, dass die Wechselwirkung durch Zugabe des HFIPA etwas geschwächt wird. Aus diesem Grund wird eine höhere Konzentration an Ras·GppNHp benötigt.

Bei Ras·GppNHp handelt es sich um eine aktivierte Form des Ras-Proteins, dass in diesem Zustand verbleibt, da das Nukleotid GppNHp nicht hydrolysiert werden kann. Um zu zeigen, dass der beschriebene Nachweis auch mit natürlich auftretenden Ras-Mutanten funktioniert, deren intrinsische GTP-Hydrolyseaktivität stark verlangsamt ist, wurde die Ras/Q61L-Mutante in der GTP-gebundenen Form eingesetzt (Ahmadian et al., 1999). Alle Messergebnisse, die mit diesem Protein erhalten wurden, waren sehr gut mit denen für das Ras·GppNHp vergleichbar. Dies zeigt, dass diese natürlich auftretende onkogene Mutante des Ras-Proteins, die für die ununterbrochene Signalweiterleitung in Krebszellen

mitverantwortlich ist, mit der beschriebenen Methode, zumindest bei Konzentrationen größer als 300 nM, nachgewiesen werden kann.

Ähnliche Messungen wurden auch in Gegenwart von HeLa-Zellextrakten durchgeführt, denen Ras-GppNHp zugesetzt wurde. Durch diese Messungen wurde gezeigt, dass aktiviertes Ras auch in Gegenwart von anderen Zellbestandteilen nachgewiesen werden kann. Dies ist notwendig für den Nachweis von aktiviertem Ras in Tumorgewebe. Dabei ist allerdings zu beachten, dass Ras in Zellen membranassoziiert ist, d.h. es ist über einen C-terminalen Farnesyl- und/oder einen Palmitoyl-Rest in der Zellmembran verankert und auch nur in dieser Form aktiv. Dies bedeutet, dass das aktivierte Ras für einen eindeutigen Nachweis mit der immobilisierten RBD/L91NBD-Dap/His von der Membran gelöst werden muss, was durch Zugabe von Detergenzien gelingt (Finney et al., 1993). Ein weiteres Problem stellt die relativ hohe Konzentration von mindestens 300 nM aktiviertem Ras dar, die zum Nachweis benötigt wird. Unter den hier verwendeten Bedingungen würde ein Volumen von 200 μ l mit dieser Konzentration benötigt. Das entspricht einer Menge von 60 pmol aktiviertem Ras-Protein, das aus mehreren Zellen gewonnen werden müsste.

Ein weiteres Absenken der Nachweisgrenze wird nur durch Veränderungen der intrinsischen Eigenschaften des Ras-RBD-Systems möglich. Die Wechselwirkung beider Proteine weist einen K_D -Wert zwischen 200 und 600 nM auf und eine Absenkung der Nachweisgrenze weit unterhalb des dadurch vorgegebenen Konzentrationsbereichs kann nur gelingen, wenn die Bindungseigenschaften der RBD so verändert werden, dass die Wechselwirkung mit aktiviertem Ras verstärkt wird.

Um dies zu erreichen könnten evolutionäre Ansätze zur Veränderung der RBD benutzt werden, wobei eine Selektion für RBDs mit verbesserten Ras-Bindungseigenschaften durchgeführt wird.

Insgesamt ist festzustellen, dass die Entwicklung eines Biosensor für aktiviertes Ras gelungen ist. Das hier beschriebene System kann weiter verbessert werden, um die Anwendbarkeit für die Routinediagnostik zu erhöhen. Wobei ein Ziel für Verbesserungen die Auswahl der Position des Fluoreszenzmarkers in der RBD ist. Die bisher genutzte Position 91 erlaubt die Detektion der Bindung von aktiviertem Ras unter geringer Beeinflussung des K_D -Wertes. Es besteht aber die Möglichkeit, dass andere, bisher nicht erkannte, Positionen in der RBD eine größere Veränderung der Umgebung erfahren und die Wechselwirkung gar nicht stören. Auch die Position des His-Tags am C-Terminus erscheint nicht optimal zu sein, da auch dieser die Bindung der RBD an Ras beeinflusst.

Dieses Problem könnte durch eine andere Immobilisierungsmethode für die RBD gelöst werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Orientierung des Proteins seine Funktionsfähigkeit ermöglichen muss.

Die Auswahl und Entwicklung anderer Fluoreszenzmarker wurde bereits unter 5.4. diskutiert. Dabei ist besonders die Photostabilität der Fluorophore wichtig, um die Anregung mit sehr energiereichen Lichtquellen, wie z.B. Lasern durchführen zu können.

Im Vergleich mit den herkömmlichen ELISA-Tests, die für den gezielten Nachweis von Proteinen Antikörper nutzen, ist der beschriebene Biosensor überlegen, da bisher keine Antikörper entwickelt werden konnten, die zwischen Ras-GDP und Ras-GTP unterscheiden. Die Erzeugung eines solchen spezifischen Antikörpers ist auf Grund des geringen Unterschieds in der Konformation von Ras-GTP und Ras-GDP, sowie der möglichen Umwandlung zwischen beiden Formen kaum möglich.

Eine weitere Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei Biosensoren kann dadurch erreicht werden, dass die Kapazität der Oberflächen erhöht wird. Dadurch stehen mehr Signalgebende Proteine zur Verfügung, was die Emissionsintensität erhöhen sollte. Bei der Erhöhung der Kapazität muss allerdings die Größe und Form der Proteine berücksichtigt werden, so dass ausreichend Platz für die korrekt gefalteten Proteine ist.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die chemische Totalsynthese der Ras-Bindungsdomäne von c-Raf1 (RBD) mit verschiedenen Modifikationen und Funktionalisierungen, unter Ausnutzung der nativen chemischen Ligation zweier Peptidsegmenten, beschrieben. Dabei wurden zwei fluoreszierende, nicht-codierte Aminosäuren in die RBD eingebaut und Modifikationen für die zielgerichtete Immobilisierung der Proteine eingeführt. Die Auswahl und Synthese dieser Aminosäuren wurde unter Berücksichtigung der Fluoreszenzeigenschaften und der Größe der Fluorophore durchgeführt. Der Einbau der nicht-codierten Aminosäuren N³-Nitrobenzofurazan-L-2,3-diaminopropionsäure oder L-(6,7-Dimethoxy-4-coumaryl)-alanin an Position 91 der RBD erlaubt die Detektion der Wechselwirkung der RBD mit dem Ras-Protein auf Basis einer Intensitätsveränderung der Fluoreszenzemission dieser AS. Das Fluoreszenzverhalten wurde eingehend untersucht, wobei auch Fluoreszenzlebenszeitmessungen durchgeführt wurden. In Stopped flow Versuchen wurden K_D-Werte (zwischen 170 nM und 610 nM) für die Wechselwirkung von Ras und verschiedenen RBD-Proteinen bestimmt, die zeigten, dass der Einbau der fluoreszierenden, nicht-codierten Aminosäuren nahe der Bindungsstelle der RBD an Ras die Wechselwirkung nur wenig beeinflusst. Ein C-terminaler His-Tag wurde benutzt, um die RBD/L91NBD-Dap/His auf einer Ni-NTA-beschichteten Oberfläche zu immobilisieren. Ausgehend davon wurde ein Biosensor entwickelt, der den Nachweis von aktiviertem Ras, auch in Gegenwart von Zellextrakten, erlaubt. Die Nachweisgrenze liegt bei einer Konzentration von 300 nM aktiviertem Ras. Der Zusatz von Hexafluorisopropanol zum Puffer während der Fluoreszenzmessungen bewirkte eine dramatische Veränderung des Fluoreszenzverhaltens der NBD-Gruppe und vereinfachte die Detektion von aktiviertem Ras mit immobilisierter RBD.

Des Weiteren wurde eine C-terminal verkürzte Form des Ras-Proteins durch chemische Totalsynthese hergestellt. Dazu wurden drei Peptidsegmente synthetisiert und sukzessive durch native chemische Ligation miteinander verknüpft. Das Protein wurde in hoher Reinheit erhalten und unter Ausnutzung eines Cofaktors, wie GppNHp (ein GTP-Analog), als Faltungsgerüst gelang die Faltung in die biologisch aktive Tertiärstruktur. Die vollständige biologische Aktivität des chemisch synthetisierten Ras konnte für die Bindung an die RBD und für die Nukleotidbindung nachgewiesen werden.

Mit dem Ras-RBD-System ist es zum erstenmal gelungen ein biologisches System aus zwei Proteinen vollständig chemisch zu synthetisieren und volle biologische Funktionsfähigkeit zu erhalten.

Weiterhin konnten die RBD und Ras an den C-Termini mit den Farbstoffen Cy5 und Alexa 488 markiert werden. Dazu wurden kurze Peptide synthetisiert, an die die Fluorophore gekoppelt wurden und die zusätzlich einen His-Tag enthielten. Ras und RBD mit C-terminalen Thioestern wurden aus Intein-Fusionsproteinen gewonnen und in dieser Form zur Ligation mit den synthetisierten Peptiden eingesetzt. Die resultierenden fluoreszenzmarkierten Proteine waren für Energietransfermessungen mit Alexa 488 (als Donor) und Cy5 (als Akzeptor) geeignet und erlaubten die Beobachtung der Komplexbildung aus aktiviertem Ras und RBD. Damit wurde ein genereller Weg zur C-terminalen Fluoreszenzmarkierung von Proteinen aufgezeigt. Die eingesetzten Farbstoffe zeichnen sich durch ihre sehr hohen Extinktionskoeffizienten, die hohen Anregungs- und Emissionswellenlängen, sowie ihre große Photostabilität aus.

Außerdem wurde die humane Thymidinmonophosphatkinase (TMPK) auf semi-synthetischem Weg hergestellt. Dazu wurde der größte Teil des Proteins (TMPK 31-212) in *E. coli* exprimiert, wobei eine Protease-Schnittstelle vor der AS 31 eingeführt wurde, die es erlaubte ein N-terminales Cys zu generieren, das für die Ligationreaktion mit dem chemisch synthetisierten N-terminalen Peptid (AS 1-30) benötigt wird. Dabei ist es gelungen die N-terminal verkürzte TMPK aus *inclusion bodies* zu gewinnen und nach der Ligation in Gegenwart von Substraten dieses Enzyms (TMP und ATP) in die biologisch aktive Tertiärstruktur zu falten. Der Einbau der fluoreszierenden, nicht-codierten Aminosäure N³-Nitrobenzofurazan-L-2,3-diaminopropionsäure an Position 25, an Stelle eines Lys, bewirkte einen Rückgang der Phosphorylierungsaktivität des Enzyms um den Faktor 4. Die Position 25 wurde nach Analyse der Kristallstruktur der TMPK ausgewählt, da diese Position in der Nähe der TMP-Bindungsstelle liegt. Eine Beobachtung der Nukleotidbindung durch Veränderung der Fluoreszenzemission war nicht möglich.

7. Literatur

- Ahmadian, M.R., Zor, T., Vogt, D., Kabsch, W., Selinger, Z., Wittinghofer, A., Scheffzek, K. (1999). Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7065-7070.
- Atherton, E., Sheppard, R.C. (1989). *Solid Phase Synthesis: A Practical Approach*. IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford.
- Bader, B., Kuhn, K., Owen, D.J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., Kuhlmann, J. (2000). Bioorganic synthesis of lipid-modified proteins for the study of signal transduction. *Nature* **403**, 223-226.
- Barbacid, M. (1987). Ras Genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-827.
- Barrett, G.C., Elmore, D.T. (1998). *Amino Acids and Peptides*. Cambridge University Press.
- Beligere, G.S., Dawson, P.E. (1999). Conformationally Assisted Protein Ligation Using C-Terminal Thioester Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6332-6333.
- Bennett, F., Barlow, D.J., Dodoo, A.N.O., Hider, R.C., Lansley, A.B., Lawrence, M.J., Marriott, Bansal, S.S. (1999). Synthesis and Properties of (6,7-Dimethoxy-4-coumaryl)alanine: A Fluorescent Peptide Label. *Analyt. Biochem.* **270**, 15-23.
- Bennett, F.A., Barlow, D.J., Dodoo, A.N.O., Hider, R.C., Lansley, A.B., Lawrence, M.J., Marriott, C., Bansal, S.S. (1997). L-(6,7-dimethoxy-4-coumaryl) alanine: an intrinsic Probe for the Labelling of Peptides. *Tet. Lett.* **38** (42), 7449-7452;
- Berghäuser, J. (1975). A reactive arginine in adenylate kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **379**, 370-376.
- Berthod, A., Liu, Y., Bagwill, C., Armstrong, D.W. (1996). Facile Liquid Chromatographic Enantioresolution of native Amino Acids and Peptides using a Teicoplanin chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* **731**, 123-137;
- Block, C., Janknecht, R., Herrmann, C., Nassar, N., Wittinghofer, A. (1996). Quantitative Structure-activity Analysis correlating Ras/RAF Interaction In Vitro to RAF Activation In Vivo. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 244-251.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brundiers, R., Lavie, A., Veit, T., Reinstein, J., Schlichting, I., Ostermann, N., Goody, R.S., Konrad, M. (1999). Modifying human thymidylate kinase to potentiate azidothymidine activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 35289-35292.
- Buck, M. (1998). Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Quart. Rev. Biophys.* **31**, 297-355.
- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J., Huber, R. (1995). High-Level Biosynthetic Substitution of Methionine in Proteins by its Analogs 2-Aminohexanoic acid,

- Selenomethionine, Telluromethionine and Ethionine in Escherichia Coli. *Europ. J. Biochem.* **230**, 788-796.
- Burgering, B.M., Bos, J.L. (1995). Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem. Sci.* **20**,18-22.
- Campbell-Burk, S.L., Carpenter, J.W. (1995). Refolding and purification of Ras proteins. *Methods in Enzymology* **255**, 3-13.
- Canne, L.E., Botti, P., Simon, R.J., Chen, Y.J., Dennis, E.A., Kent, S.B.H. (1999). Chemical protein synthesis by solid phase ligation of unprotected peptide segments. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8720-8727.
- Canne, L.E., Bark, S.J., Kent, S.B.H. (1996). Extending The Applicability Of Native Chemical Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5891-5896.
- Canne, L.E., Walker, S.M., Kent, S.B.H. (1995). A General Method For The Synthesis Of Thioester Resin Linkers For Use In The Solid Phase Synthesis Of Peptide-Alpha-Thioacids. *Tetrahedron Lett.* **36**, 1217-1220.
- Canne, L.E., Ferré-D'Amaré, A.R., Burley, S.K., Kent, S.B.H. (1995). Total Chemical Synthesis of a Unique Transcription Factor-Related Protein: cMyc-Max. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2998-3007.
- Caruso, M., Klatzmann, D. (1994). Genetically controlled pharmacomodulation for HIV gene therapy. *C. R. Acad. Sci. Paris Sci. Vie/Life Sci.* **317**, 1027-1030.
- Cepus, V., Scheidig, A.J., Goody, R.S., Gerwert, K. (1998). Time-resolved FTIR studies of the GTPase reaction of H-ras p21 reveal a key role for the beta-phosphate. *Biochemistry* **37**, 10263-71,
- Chuang, E., Barnard, D., Hettich, L., Zhang, X.F., Avruch, J., Marshall, M.S. (1994). Critical binding and regulatory interactions between Ras and Raf occur through a small, stable N-terminal domain of Raf and specific Ras effector residues. *Molec. Cell. Biol.* **14**, 5318-5325.
- Chung, H.H., Benson, D.R., Schultz, P.G. (1993). Probing the Structure and Mechanism of Ras Protein with an Expanded Genetic Code. *Science* **259**, 806-809.
- Clark, J.M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9677-9686.
- Conti, M., Falini, G., Samori, B. (2000). How strong is the Coordinate Bond between a Histidine Tag and Ni-Nitrilotriacetate? An Experiment of Mechanochemistry on Single Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 215-218.
- Cornish, V.W., Schultz, P.G. (1994). A New Tool for Studying Protein Structure and Function. *Curr. Op. Struct. Biol.* **4**, 601- 607.
- Cornish, V.W., Hahn, K.M., Schultz, P.G. (1996). Site-Specific Protein Modification Using A Ketone Handle. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8150-8151.
- Cotton, G.J., Ayers, B., Xu, R., Muir, T.W. (1999). Insertion of a Synthetic Peptide into a Recombinant Protein Framework: A Protein Biosensor. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1100-1101.

- Cotton, G.J., Muir, T.W. (2000). Generation of a dual-labeled fluorescence biosensor for Crk-II phosphorylation using solid-phase expressed protein ligation. *Chemistry & Biology* **7**, 253-261.
- Dawson, P.E., Churchill, M.J., Ghadiri, M.R., Kent, S.B.H. (1997). Modulation of reactivity in native chemical ligation through the use of thiol additives. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 4325-4329.
- Dawson, P.E., Kent S.B.H. (2000). Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Ann. Rev. Biochem.* **69**, 925-962.
- Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I., Kent, S.B.H. (1994). Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **266**, 776-779.
- Dietrich, C., Schmitt, L., Tampe, R. (1995). Molecular Organization Of Histidine-Tagged Biomolecules At Self-Assembled Lipid Interfaces Using A Novel Class Of Chelator Lipids. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* **92**, 9014-9018.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- DeLoskey, R.J., Van Dyk, D.E., Van Aken, T.E., Campbell-Burk, S. (1994). Isolation and refolding of H-ras from inclusion bodies of Escherichia coli: refold procedure and comparison of refolded and soluble H-ras. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 72-78.
- Dougherty, D.A. (2000). Unnatural amino acids as probes of protein structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 645-652.
- Emerson, S.D., Waugh, D.S., Scheffler, J.E., Tsao, K.L., Prinzo, K.M., Fry, D.C. (1994). Chemical shift assignments and folding topology of the Ras-binding domain of human Raf-1 as determined by heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 7745-7752.
- Evans, T.C., Benner, J., Xu, M.Q. (1998). Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Sci.* **7**, 2256-2264.
- Feuerstein, J., Goody, R.S., Wittinghofer, A. (1987). Preparation and characterization of nucleotide-free and metal ion-free p21 "apoprotein". *J. Biol. Chem.* **262**, 8455-8458.
- Finney, R.E., Robbins, S.M., Bishop, J.M. (1993). Association of pRas and pRaf-1 in a complex correlates with activation of a signal transduction pathway. *Curr. Biol.* **3**, 805-812.
- Ghosh, P.B., Whitehouse, M.W. (1968). 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: a new fluorogenic reagent for amino acids and other amines. *Biochem. J.* **108**, 155-156.
- Grünberg, R., Domgall, I., Gunther, R., Rall, K., Hofmann, H.J., Bordusa, F. (2000). Peptide bond formation mediated by substrate mimetics -Structure-guided optimization of trypsin for synthesis. *Eur. J. Biochem.* **267**, 7024-7030.
- Hackeng T.M., Mounier C.M., Bon C., Dawson P.E., Griffin J.H., Kent S.B.H. (1997). Total chemical synthesis of enzymatically active human type II secretory phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7845-7850.

- Hageman, J.J.M., Wanner, M.J., Koomen, G.J., Pandit, U.K. (1977). Potential Carcinostatics. Synthesis and Biological Properties of d- and l- β,β -Difluoroaspartic Acid and β,β -Difluoroasparagine. *J. Med. Chem.* **20**, 1677-1679.
- Hancock, J.F., Paterson, H., Marshall, C.J. (1990). A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**, 133-139.
- Hart, B.P., Coward, J.K. (1993). The Synthesis of DL-3,3-Difluoroglutamic Acid from 3-Oxoprolinol Derivative. *Tet. Lett.* **34**, 4917-4920.
- Herrmann, C., Martin, G.A., Wittinghofer, A. (1995). Quantitative analysis of the complex between p21(Ras) and the Ras-binding domain of the human RAF-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 2901-2905.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Hojo, H., Kwon, Y., Kakuta, Y., Tsuda, S., Tanaka, I., Hikichi, K., Aimoto, S. (1993). Development of a Linker with an enhanced Stability for the Preparation of Peptide Thioesters and its Application to the Synthesis of a Stable-Isotope-Labeled HU-Type DNA-Binding Protein. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **66**, 2700-2706.
- Hoppe, D., Beckmann, L. (1979). Selektive Mono- und Dialkylierung von N-[Bis(alkylthio)-methylenglycin-ethylestern zum Aufbau von kettenverlängerten und α -verzweigten α -Aminosäureestern. *Liebigs Ann. Chem.*, 2066-2075.
- Hudlicky, M., Merola, J.S. (1990). New Stereospecific Syntheses and X-ray Diffraction Structures of (-)-D-Erythro- and (+)-L-Threo-4-Fluoroglutamic Acid. *Tet. Lett.* **31**, 7403-7406.
- Iakovenko, A., Rostkova, E., Merzlyak, E., Hillebrand, A.M., Thoma, N.H., Goody, R.S., Alexandrov, K. (2000). Semi-synthetic Rab proteins as tools for studying intermolecular interactions. *FEBS Letters* **468**, 155-158.
- Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. (1994). A designed peptide ligase for total synthesis of ribonuclease A with unnatural catalytic residues. *Science* **266**, 243-247.
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Nordheim, A., Stunnenberg, H.G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8972-8976.
- John, J., Sohmen, R., Feuerstein, J., Linke, R., Wittinghofer, A., Goody, R.S. (1990). Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry* **29**, 6059-6065.
- John, J., Frech, M., Wittinghofer, A. (1988). Biochemical properties of Ha-ras encoded p21 mutants and mechanism of the autophosphorylation reaction. *J. Biol. Chem.* **263**, 11792-11799.
- Jones, J. (1995). Synthese von Aminosäuren und Peptiden. Hrsg. Davies, S.G., VCH, Weinheim.
- Kent, S.B. (1988). Chemical synthesis of peptides and proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 957-989.

- Kettling, U., Koltermann, A., Schwille, P., Eigen, M. (1998). Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 1416-1420.
- Kochendoerfer G.G., Salom D., Lear J.D., Kent S.B.H., DeGrado W.F. (1999). Total chemical synthesis of the integral membrane protein influenza A virus M2 proton channel: role of its cytoplasmic domain for pore assembly. *Biochemistry* **38**, 11905-13.
- Koltermann, A., Kettling, U., Bieschke, J., Winkler, T., Eigen, M. (1998). Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: high throughput screening for enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 1421-1426.
- Konas, D.W., Coward, J.K. (1999). Synthesis of L-4,4-difluoroglutamic acid via electrophilic difluorination of a lactam. *Org. Lett.* **1**, 2105-2107.
- Lakowicz, J.R. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kluwer Academics/Plenum Publishers, New York.
- Li, Y., Zhang, Y., Yan, H. (1996). Kinetic and thermodynamic characterizations of yeast guanylate kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 28038-28044.
- Luidens, M.K., Figge, J., Breese, K., Vajda, S. (1996). Predicted and trifluoroethanol-induced alpha-helicity of polypeptides. *Biopolymers* **39**, 367-376.
- Lu, W., Randal, M., Kossiakoff, A., Kent, S.B. (1999). Probing intermolecular backbone H-bonding in serine proteinase-protein inhibitor complexes. *Chemistry & Biology* **6**, 419-427.
- MacBeath, G., Schreiber, S.L. (2000). Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science* **289**, 1760-1763.
- Marshall, M.S. (1987). Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J.* **9**, 1311-1318.
- Merrifield, R.B. (1985). Solid Phase Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **97**, 799-810.
- Merrifield, R.B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. 1. Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2156.
- Miao, Z., Tam, J.P. (2000). Bidirectional Tandem Pseudoproline Ligations of Proline-Rich Helical Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4253-4260.
- Milton, R.C., Milton, S.C., Kent, S.B. (1992). Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show reciprocal chiral substrate specificity. *Science* **256**, 1445-1448.
- Miranda, L.P., Jones, A., Meutermaans, W.D.F., Alewood, P.F. (1998). p-Cresol as a reversible Acylium ion scavenger in Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 1410-1420.
- Morrison, D.K., Cutler, R.E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 174-179.
- Muir, T.M., Sondhi, D., Cole, P.A. (1998). Expressed protein ligation: A general method for protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6705-6710.
- Mujumdar, R.B., Ernst, L.A., Mujumdar, S.R., Lewis, C.J., Waggoner, A.S. (1993). Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chem.* **4**, 105-111.

- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F., 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;
- Netzer, W.J., Hartl, U. (1997). Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* **388**, 343-349.
- Norren, C.J., Wang, J., Perler, F.B. (2000). Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and Its Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 450-466.
- Oppolzer, W., Moretti, R., Thomi, S. (1989). Asymmetric Alkylations of a Sultam-derived Glycinate Equivalent: Practical preparation of enantiomerically pure α -Amino Acids. *Tetrahedron Lett.* **44**, 6009-6010.
- Ostermann, N., Schlichting, I., Brundiers, R., Konrad, M., Reinstein, J., Veit, T., Goody, R.S., Lavie, A., Insights into the phosphoryltransfer mechanism of human thymidylate kinase gained from crystal structures of enzyme complexes along the reaction coordinate. *Structure* **8**, 629-642.
- Ostermann, N. (2000). Struktur-Aktivitätsuntersuchungen antiviraler Vorläufermedikamente an Thymidylatkinasen. Dissertation Universität Dortmund.
- Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R.P., Bishop-Stewart, J., Bhalgat, M.K., Millard, P.J., Mao, F., Leung, W.Y., Haugland, R.P. (1999). Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1179-1788.
- Persidis, A. (1998). Biochips. *Nature Biotechnology* **16**, 981-983.
- Peter, A., Török, G., Armstrong, D.W. (1998) High-Performance Liquid Chromatography Separation of Enantiomers of unusual Amino Acids on a Teicoplanin chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* **793**, 283-296.
- Qian, M., Bui, T., Ho, R. J. Y., Unadkat, J. D. (1994). Metabolism of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) in human placental Trophoblasts and Hofbauer cells. *Biochem. Pharmac.* **48**, 383-389.
- Rajan, R., Balaram, P. (1996). A Model For The Interaction Of Trifluoroethanol With Peptides And Proteins. *Int. J. Pept. & Prot. Res.* **48**, 328-336.
- Reiersen, H., Rees, A.R. (2000). Trifluoroethanol may form a solvent matrix for assisted hydrophobic interactions between peptide side chains. *Protein Engineering* **13**, 739-743.
- Reinstein, J., Brune, M., Wittinghofer, A. (1988). Mutations in the Nucleotide Binding Loop of Adenylate Kinase of Eschericia coli. *Biochemistry* **27**, 4712-4720.
- Rensland, H., John, J., Linke, R., Simon, I., Schlichting, I., Wittinghofer, A., Goody, R.S. (1995). Substrate and Product Structural Requirements for binding of Nucleotides to H-Ras p21: The Mechanism of Discrimination between Guanosine and Adenosine Nucleotides. *Biochemistry* **34**, 593-599.
- Resh, M.D. (1996). Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cellular Signalling* **8**. 403-412.
- Rich, R.L., Smirnov, A.V., Schwabacher, A.W., Petrich, J.W. (1995). Synthesis and Photophysics of the Optical Probe N-1-Methyl-7-Azatriptophan. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11850-11853.

- Sakakibara, S. (1999). Chemical Synthesis of Proteins in Solution. *Biopolymers* **51**, 279-296.
- Sarin, V.K., Kent, S.B.H., Tam, J.P., Merrifield, R.B. (1981). Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Analyt. Biochem.* **117**, 147-157.
- Scheffler, J.E., Waugh, D.S., Bekesi, E., Kiefer, S.E., LoSardo, J.E., Neri, A., Prinzo, K.M., Tsao, K.L., Wegrzynski, B., Emerson, D., Fry, D.C. (1994). Characterization of a 78-residue fragment of c-Raf-1 that comprises a minimal binding domain for the interaction with Ras-GTP. *J. Biol. Chem.* **269**, 22340-22346.
- Scherer, A., John, J., Linke, R., Goody, R.S., Wittinghofer, A., Pai, F.P., Holmes, K.C. (1989). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the human c-H-ras-oncogene product p21 complexed with GTP analogues. *J. Mol. Biol.* **206**, 257-259.
- Schmitt, J., Hess, H., Stunnenberg, H.G. (1993). Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Rep.* **18**, 223-230.
- Schnölzer, M., Alewood, P., Jones, A., Alewood, D., Kent, S.B.H. (1992). *In situ* neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.* **40**, 180-193.
- Schnölzer, M., Kent, S.B.H. (1992). Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease. *Science* **256**, 221-225.
- Sheng, X. R., Li, X., Pan, X. M. (1999). An iso-random Bi Bi mechanism for adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 22238-22242.
- Sigal, G.B., Bamdad, C., Barberis, A., Strominger, J., Whitesides, G.M. (1996). A Self-Assembled Monolayer for the Binding and Study of Histidine-Tagged Proteins by Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.* **68**, 490-497.
- Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M.J., Itakura, K., Wallace, R.B. (1981). Use of synthetic oligo-desoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences using purified genes. Hrsg. Brown, D., Fox, C.F., Academic Press, New York, 683-693.
- Sydor, J.R., Engelhard, M., Wittinghofer, A., Goody, R.S., 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., Engelhard, M. (1999). Design, total chemical synthesis, and binding properties of a [Leu-91-N¹-methyl-7-azaTrp]Ras-binding domain of c-Raf1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7865-7870.
- Tam, J.P., Yu, Q., Miao, Z. (1999). Orthogonal Ligation Strategies for Peptide and Protein. *Biopolymers* **51**, 311-332.
- Tam, J.P., Merrifield, R.B. (1985). Solid-Phase Synthesis Of Gastrin-I - Comparison Of Methods Utilizing Strong Acid For Deprotection And Cleavage. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **26**, 262-273.

- Tucker, J., Sczakiel, G., Feuerstein, J., John, J., Goody, R.S., Wittinghofer, A. (1986). Expression of p21 proteins in *Escherichia coli* and stereochemistry of the nucleotide-binding site. *EMBO J.* **5**, 1351-1358.
- Turcatti, G., Nemeth, K., Edgerton, M.D., Meseth, U., Talabot, F., Peitsch, M., Knowles, J., Vogel, H., Chollet, A. (1996). Probing the structure and function of the tachykinin neurokinin-2 receptor through biosynthetic incorporation of fluorescent amino acids at specific sites. *J. Biol. Chem.* **271**, 19991-19998.
- Veit, T. (2000). Kinetischer Mechanismus der menschlichen Thymidylatkinase – der induced fit als Grund für die unzureichende Aktivierung des Anti-HIV-Medikamentes 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidinmonophosphat (AZTMP). Universität Dortmund.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., Cooper, J.A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**, 205-214.
- Walker, M.A. (1997). Proteinsynthese durch chemische Verknüpfung ungeschützter Peptide in wässriger Lösung. *Angew. Chem.* **109**, 1113-1115.
- Wieland, T., Bokelmann, E., Bauer, L., Lang, H.U., Lau, H. (1953). Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten. *Liebigs Ann. Chem.* **583**, 129-149.
- Wiesmuller, L., Wittinghofer, A. (1992). Expression of the GTPase activating domain of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in *Escherichia coli* and role of the conserved lysine residue. *J. Biol. Chem.* **267**, 10207-10210.
- Wilken, J., Kent, S.B.H. (1998). Chemical protein synthesis. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 412-426.
- Wilken, J., Hoover, D., Thompson, D.A., Barlow, P.N., McSparron, H., Picard, L., Wlodawer, A., Lubkowski, J., Kent, S.B. (1999). Total chemical synthesis and high-resolution crystal structure of the potent anti-HIV protein AOP-RANTES. *Chemistry & Biology* **6**, 43-51.
- Wilson, G.S., Hu, Y. (2000). Enzyme-Based Biosensors for in Vivo Measurements. *Chem. Rev.* **100**, 2693-2704.
- Wittinghofer, A., Waldmann, H. (2000). Ras – A Molecular Switch Involved in Tumor Formation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 4192-4214.
- Zahn, H. (1966). Struktur und Synthese des Insulin. *Medizinische Klinik* **61**, 876.
- Zhang, J., Matthews, C.R. (1998). Ligand binding is the principal determinant of stability for the p21(H)-ras protein. *Biochemistry* **37**, 14881-14890.
- Zhang, J., Matthews, C.R. (1998). The role of ligand binding in the kinetic folding mechanism of human p21(H-ras) protein. *Biochemistry* **37**, 14891-14899.
- Zhu, H., Klemic, J.F., Chang, S., Bertone, P., Casamayor, A., Klemic, K.G., Smith, D., Gerstein, M., Reed, M.A., Snyder, M. (2000). Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nature Genetics* **26**, 283-289.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard und Prof. Dr. R.S. Goody für die reizvolle Themenstellung, die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. W. Kreiser danke ich für die Übernahme des Koreferates und sein großes Interesse an der durchgeführten Arbeit.

Ich danke weiterhin:

Herrn Dr. R. Seidel für die Einführung in die Molekularbiologie, die Klonierungen, viele gute Tipps bei Ligationen und Immobilisierungen, sowie die Gesprächsrunde am Abend mit Kaltgetränk.

Frau Dr. C. Hunter und Herrn Dr. S.B.H. Kent für die Einführung in die Peptidsynthese und die Möglichkeit bei Gryphon Sciences zu arbeiten.

Herrn Dr. A. Scheidig für die Hilfe bei den Kristallisationsansätzen und einige Bilder.

Herrn Dr. C. Herrmann für die schnellen Antworten auf Fragen bzgl. der RBD und Ras.

Herrn Dipl.-Chem. Sascha Fahsel für Hilfe bei den Fluoreszenzlebensdauermessungen.

Marion, Anke und Sascha für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor.

Rolf für die Unterstützung bei der Synthese des TMPK-Peptids.

Stefan für die Hilfe bei der Synthese des Cy5-Peptids.

Goran für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Der „Laborgemeinschaft“ B2.15 mit Goran, Gereon, Sascha, Stefan, Andrea und den lieben Nachbarn Almut, Lili und Nathalie für die „niveauvollen“ Späße und die produktive Arbeitsatmosphäre.

Der AG Engelhard mit Ansgar, Astrid, Georg, Hans, Rolf, und Silke für Diskussionen, Ablenkung und viele Informationen über Lichtrezeptoren.

Der gesamten Abteilung 3 und den Zentraleneinrichtungen für die gute Zusammenarbeit und viel Hilfsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinen Eltern, die nach dem Studium auch die Doktorarbeit noch teilfinanziert haben und mir jede Unterstützung gegeben haben, die nötig war.

Der liebste Dank geht an Christina für das Korrekturlesen dieser Arbeit, für ihre Geduld und vieles, vieles mehr.

Lebenslauf

Name: Christian Friedrich Wilhelm Becker
Geburtsort: Altena (Westf.)
Geburtsdatum: 17.06.1973
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1979-1983 Grundschole am Breitenhagen in Altena
 1983-1992 Burggymnasium in Altena
 Juni 1992 Abitur

Bundeswehr

1992-1993 Grundwehrdienst in Frankenberg/Eder

Studium

Okt. 1993 - März 1998 Studium der Chemie an der Universität Dortmund
 Okt. 1995 Diplom-Vorprüfung
 Juli 1997 Diplom-Hauptprüfung
 August 1997 - Februar 1998 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund:
 Synthese halogener Guanosinnukleotide zur biophysikalischen Charakterisierung von Proteinen
 Mai 1998 Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung Physikalische Biochemie unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard und Prof. Dr. R.S. Goody
 Feb. 1999 - Mai 1999 Forschungsaufenthalt bei Gryphon Sciences in So. San Francisco, USA

Publikationen und Vorträge:

Becker, C.F.W., Hunter, C., Seidel, R., Kent, S.B.H., Goody, R.S., Engelhard, M. (2001) "A sensitive fluorescence monitor for the detection of activated Ras: Total chemical synthesis of site specifically labelled Ras-binding domain of c-Raf1 immobilised on a surface." *Chemistry & Biology* **8**, 243-252.

"Generation of biological function by total chemical synthesis of H-Ras and the Ras-binding domain of c-Raf1", Vortrag beim 36. Winter Seminar mit dem Thema „*Molecular Biology and Biophysical Chemistry of Cell Functions*“, 2001 in Klosters, Schweiz.

"Total chemical synthesis of RBD containing novel fluorescent amino acids", Poster bei der Gordon Research Conference „*Chemistry and Biology of Peptides*“, 2000 in Ventura, CA, USA.

Gruen, M., Becker, C., Beste, A., Reinstein, J., Scheidig, A., Goody, R.S. (1999) "2`Halo-ATP and -GTP analogues: Rational phasing tools for protein crystallography." *Protein Science* **8**, 2524-2528.

Gruen, M., Becker, C., Beste, A., Siethoff, C., Scheidig, A., Goody, R.S. (1999) "Synthesis of 2'-Iodo- and 2'-Bromo-ATP and -GTP analogues as potential Phasing Tools for X-Ray Crystallography." *Nucleosides & Nucleotides* **18** (1), 137-151.