

**Chemische Biologie von Membranproteinen:  
Synthese und Modifikation des Transducers *NpHtrII* aus dem  
Photorezeptor-Komplex von *Natronomonas pharaonis***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

des Fachbereiches Chemie und Chemische Biologie  
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von  
Marc Dittmann (M. Sc.)  
aus Duisburg

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Martin Engelhard

Dortmund, Januar 2014







Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody unter Anleitung von Prof. Dr. Martin Engelhard durchgeführt. Der experimentelle Teil wurde von Januar 2009 bis Oktober 2013 angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard

Zweitgutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh

### **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift (Marc Dittmann)

Teile der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht:

Dittmann M., Sauermann J., Seidel R., Zimmermann W., Engelhard M. (2010) Native chemical ligation of hydrophobic peptides in organic solvents. *J. Pept. Sci.* 16(10): 558–562.

Dittmann M., Sadek M., Seidel R., Engelhard M. (2012) Native chemical ligation in dimethylformamide can be performed chemoselectively without racemization. *J. Pept. Sci.* 18(5): 312–316.

Gradmann S., Ader C., Heinrich I., Nand D., Dittmann M., Cukkemane A., Dijk M., Bonvin A.M.J.J., Engelhard M., Baldus M. (2012) Rapid prediction of multi-dimensional NMR data sets. *J. Biomol. NMR* 54(4): 377–387.

Dittmann M., Graupner F.F., Maerz B., Oesterling S., de Vivie-Riedle R., Zinth W., Engelhard M., Lüttke W. (2014) Photostabilität von 4,4'-Dihydroxythioindigo: ein Mimetikum des Indigo. *Angew. Chem.* 126(2): 602–605.

Dittmann M., Graupner F.F., Maerz B., Oesterling S., de Vivie-Riedle R., Zinth W., Engelhard M., Lüttke W. (2014) Photostability of 4,4'-Dihydroxythioindigo, a Mimetic of Indigo. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53(2): 591–594.

Dittmann M., Seidel R., Chizhov I., Engelhard M. (2014) Total chemical synthesis of a membrane protein domain analogue containing two transmembrane helices: functional reconstitution of the semisynthetic sensory rhodopsin/transducer complex. *J. Peptide Sci.* doi: 10.1002/psc.2605

## Abkürzungen und Symbole

Die in Kapitel 3.1 gezeigten Verbindungen sind in Anhang A.2 dokumentiert. Ein Verzeichnis der in Kapitel 3.2, 3.3 und 3.4 dargestellten Peptide befindet sich in Anhang A.3.

Äq.	Äquivalent(e)
ATR	abgeschwächte Totalreflexion, ( <i>engl. attenuated total reflection</i> )
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bom	Benzyloxymethyl
Bzl	Benzyl
CD	Circulardichroismus
CheA	Chemotaxisprotein A
CheB	Chemotaxisprotein B
CheR	Chemotaxisprotein R
CheW	Chemotaxisprotein W
CheY	Chemotaxisprotein Y
$\delta$	chemische Verschiebung (NMR-Spektroskopie)
DC	Dünnschicht-Chromatografie
DCM	Dichlormethan
DDM	<i>N</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC	Dodecylphosphocholin
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPL	Expressed Protein Ligation
ESI	Elektrosprayionisation
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz

<i>et al.</i>	und andere ( <i>lat. et alii bzw. et aliae</i> )
FTIR	Fourier-Transformation-Infrarot
Gdn·HCl	Guanidiniumchlorid
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transferase
h	Stunde
HBTU	N-[(1 H-benzotriazol-1-yl) (dimethylamino)methylen]-N-methyl-methan-aminium-hexafluoro-phosphat N-oxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>engl. high performance liquid chromatography</i> )
HR-MS	hochaufgelöste Massenspektrometrie
HTI	Hemithioindigo
Htr	halobakterieller Transducer des Rhodopsins
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie ( <i>engl. isothermal titration calorimetry</i> )
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge des Lichts
LCMS	Flüssigchromatographie mit Massen-Spektrometrie-Kopplung ( <i>engl. Liquid-Chromatography with Mass Spectrometry</i> )
m	Masse
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie ( <i>engl. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> )
mAU	Milli-Absorptionseinheit ( <i>engl. milli Absorbance Unit</i> )
MESNA	Natrium-2-sulfanylethansulfonat
min	Minute
MPAA	4-Mercaptophenylelessigsäure ( <i>engl. 4-mercaptophenylacetic acid</i> )
MS	Massenspektrometrie
MTS	(1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl) methanthiosulfonat
NCL	Native Chemische Ligation
NMR	Kernspinresonanz ( <i>engl. Nuclear Magnetic Resonance</i> )
<i>N. pharaonis</i>	<i>Natronomonas pharaonis</i>



<i>Np</i> HtrII	<i>N. pharaonis</i> Transducer des sensorischen Rhodopsins II
<i>Np</i> SRII	<i>N. pharaonis</i> sensorisches Rhodopsin II
NTA	Nitrilotriessigsäure
p.A.	zur Analyse ( <i>pro Analysis</i> )
Ph	Phenyl
OcHx	Cyclohexylester
OD	optische Dichte
OG	<i>n</i> -Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	-SCH <sub>2</sub> CO-
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>engl. sodium dodecyl sulfate</i> )
SPPS	Festphasenpeptidsynthese ( <i>engl. solid phase peptide synthesis</i> )
SRI	Sensorrhodopsin I
SRII	Sensorrhodopsin II
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
Thz	Thiazolidin
TM	Transmembrane Helix
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tos	Tosyl
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Trt	Trityl
UV	Ultraviolett
Xan	Xanthyl
z	Ladung
Z	Benzyloxycarbonyl

Für Aminosäuren wird der Dreibuchstabencode der International Union of Biochemistry sowie der von der IUPAC empfohlene Einbuchstabencode verwendet (Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides (Recommendations 1983). (1984) *Pure Appl. Chem.* 56(5): 595–624).

D-Aminosäuren werden in Peptiden, welche mit dem Dreibuchstabencode dargestellt sind, durch ein vorangestelltes kleingeschriebenes großes D (Kapitälchen) gekennzeichnet. Werden Peptide im Einbuchstabencode gezeigt, wird für eine D-Aminosäure der Kleinbuchstabe der L-Aminosäure verwendet.

# Inhalt

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Phototaxis der Archaeobakterien.....	2
1.2 Photoschaltbare Verbindungen und Reportergruppen .....	7
1.3 Chemische Synthese von Proteinen .....	9
1.4 Zielsetzung.....	14
<b>2 Experimenteller Teil – Materialien, Methoden und Synthesen</b> .....	<b>16</b>
2.1 Chemikalien.....	16
2.2 Instrumentation.....	17
2.3 Analytische Methoden .....	18
2.3.1 Elektrosprayionisation Massenspektrometrie .....	18
2.3.2 Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie.....	18
2.3.3 Hochleistungsflüssigchromatographie .....	18
2.3.4 SDS-PAGE .....	23
2.3.5 Größenausschluss-Chromatographie.....	24
2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	25
2.4 Chemische Methoden.....	26
2.4.1 Allgemeines .....	26
2.4.2 Synthetisierte Verbindungen .....	28
2.4.3 Charakterisierung der Thioindigoderivate .....	33
2.5 Peptidchemische Methoden .....	35
2.5.1 Festphasensynthese von Peptiden .....	35
2.5.2 Darstellung der Leucin-Thioester .....	36
2.5.3 Darstellung der Arginin-Tag-Thioester.....	37
2.5.4 Abspaltung der Peptide vom Harz.....	37
2.5.5 Kaiser-Test .....	37
2.5.6 Chloroform-Methanol-Fällung.....	37
2.5.7 Synthetisierte Peptide.....	38
2.5.8 Durchführung der Ligationsexperimente .....	51
2.5.9 In-Gel-Verdau .....	53
2.6 Proteinchemische Methoden.....	55
2.6.1 Plasmide und Bakterienstämme .....	55
2.6.2 Genexpression und Aufreinigung.....	55
2.6.3 Isolierung von Lipiden aus <i>Halobacterium salinarum</i> .....	58
2.6.4 Durchführung und Aufreinigung der Ligation mit anschließender Rückfaltung....	59
2.6.5 Rekonstitution in Proteoliposome aus <i>Halobacterium salinarum</i> .....	59
2.7 Biophysikalische Methoden .....	61
2.7.1 CD-Spektroskopie.....	61
2.7.2 Optisch erzeugte Thermophorese .....	61
2.7.3 Blaue-Native-Gelelektrophorese .....	62

<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>63</b>
3.1 Synthese und Charakterisierung von 4,4'-Dihydroxythioindigo.....	63
3.1.1 Synthesestrategie.....	65
3.1.2 Charakterisierung der Thioindigoderivate.....	66
3.2 Native Chemische Ligation in Dimethylformamid.....	77
3.2.1 Untersuchung der Thioester-Umesterung.....	81
3.2.2 Mechanistische Untersuchungen.....	83
3.2.3 Untersuchung von Additiven.....	86
3.2.4 Mögliche Nebenreaktionen: Reaktion mit nukleophilen Gruppen.....	90
3.2.5 Mögliche Nebenreaktionen: Epimerisierung.....	95
3.2.6 Untersuchungen bei erhöhter Temperatur.....	98
3.2.7 Anwendung der NCL in DMF auf weitere Ligationen.....	100
3.3 Totalsynthese, Aufreinigung und Faltung von NpHtrII 1-114.....	108
3.3.1 Synthesestrategie.....	108
3.3.2 Synthese und Aufreinigung der Peptide.....	110
3.3.3 Ligation transmembraner Peptide.....	112
3.3.4 Charakterisierung des synthetischen NpHtrII 1-114.....	121
3.4 Semisynthese und Isotopenmarkierung von NpHtrII 1-157.....	125
3.4.1 Synthesestrategie.....	126
3.4.2 Expression und Aufreinigung der Peptide.....	128
3.4.3 Semisynthese und Isotopenmarkierung.....	130
3.4.4 Charakterisierung des semisynthetischen NpHtrII 1-157.....	137
<b>4 Zusammenfassung</b> .....	<b>143</b>
<b>5 Literatur</b> .....	<b>145</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>159</b>
A.1 UV-VIS-Spektren zur Untersuchung einer Photoisomerisierung.....	159
A.2 Verzeichnis der Verbindungen in Kapitel 3.1.....	163
A.3 Peptid- und Protein-Sequenzen.....	164
<b>Danksagung</b> .....	<b>167</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>169</b>

## 1 Einleitung

Die Signalweiterleitung über eine Zellmembran ist ein grundlegender biologischer Prozess, der es Lebewesen ermöglicht Umwelteinreize zu detektieren, zu verarbeiten und in eine physiologische Reaktion umzusetzen. Diese Kommunikation zwischen „Außen und Innen“ wird durch Membranproteine vermittelt, welche etwa ein Drittel aller Proteine in der Zelle ausmachen (Wallin und von Heijne, 1998). Deren Struktur kann man schematisch in extrazelluläre, transmembrane und zytoplasmatische Domänen unterteilen. Sie übernehmen essenzielle Funktionen, unter anderem als Rezeptoren, Kanäle, Transporter und bei der Energiegewinnung und durchspannen biologische Membranen über helikale oder  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen ganz (integrales Membranprotein) oder sind auf einer Seite der Membran lokalisiert (peripheres Membranprotein; Alberts *et al.*, 2004).

Obwohl heute viel über extrazelluläre Rezeptordomänen sowie die korrespondierenden zytoplasmatischen Signalkaskaden bekannt ist, gibt es nur wenige Informationen über den eigentlichen Mechanismus des transmembranen Signaltransfers. Dies liegt einerseits an dem eingeschränkten Zugang und der schwierigen Handhabung von Membranproteinen. Andererseits lassen sich diese Proteine nur eingeschränkt kristallisieren oder in einer nativen Form solubilisieren, was die Einsatzmöglichkeiten von vielen biophysikalischen Techniken einschränkt (Seddon *et al.*, 2004). Dies steht im Kontrast zu den Erkenntnissen, die über lösliche Proteine gewonnen wurden, für die seit der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts durch die Weiterentwicklung der Röntgenstrukturanalyse und der multidimensionalen kernmagnetischen Resonanz-Spektroskopie bedeutende Einblicke in Struktur und Funktion gewonnen werden konnten. Für die Erforschung von Membranproteinen auf molekularer Ebene wurden deshalb alternative Methoden eingesetzt, wie z. B. die Festkörper-NMR-, die FTIR- und die ESR-Spektroskopie.

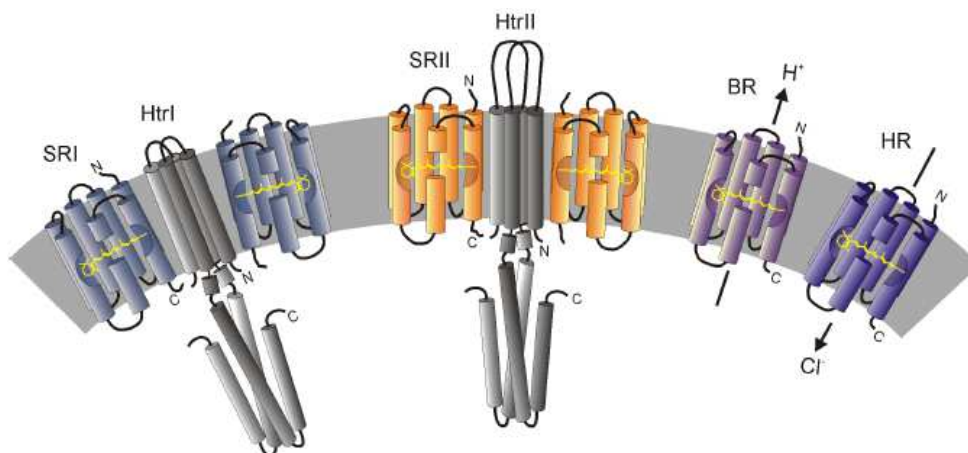
Die Frage, wie ein Signal auf molekularer Ebene über eine Zellmembran hinweg geleitet wird und daraufhin zelluläre Komponenten aktiviert, wurde daher erst in wenigen Systemen erforscht. Als Beispiele sind Rhodopsin (ein G-Protein gekoppelter Rezeptor;

Palczewski, 2006), und die archaebakteriellen Photorezeptoren (sensorischen Rhodopsine; Klare *et al.*, 2008) zu nennen. In dieser Arbeit soll der molekulare Signaltransfer an Hand des archaebakteriellen Photorezeptors sensorisches Rhodopsin II erforscht werden.

### 1.1 Phototaxis der Archaeobakterien

*Halobacterium salinarum* und *Natronomonas pharaonis* sind Archaeobakterien, welche die Fähigkeit zur Phototaxis besitzen (Übersicht in Spudich und Bogomolni, 1988; Klare und Engelhard, 2004; Klare *et al.*, 2008). Unter konstanten Lichtverhältnissen wechseln die zur Fortbewegung dienenden Flagellenbündel etwa alle 10 Sekunden ihre Drehrichtung, was zu einer ungerichteten Bewegung führt. Eine Bestrahlung der Archaeobakterien mit für sie schädlichem blauem Licht führt zu einer Erhöhung der Umschaltfrequenz des Flagellenbündels, währenddessen die Einwirkung von orangefarbigem Licht diese verringert. Die hieraus hervorgehende Gesamtbewegung führt die Archaeobakterien weg von blauem und hin zu orangefarbenem Licht.

Verantwortlich für die Phototaxis sind Membranrezeptoren aus der Gruppe der archaebakteriellen Rhodopsine (Abbildung 1.1; Übersicht in Schäfer *et al.* 1999). Diese Proteine besitzen sieben transmembrane Helices und binden den Chromophor Retinal kovalent über ein protoniertes Imin.

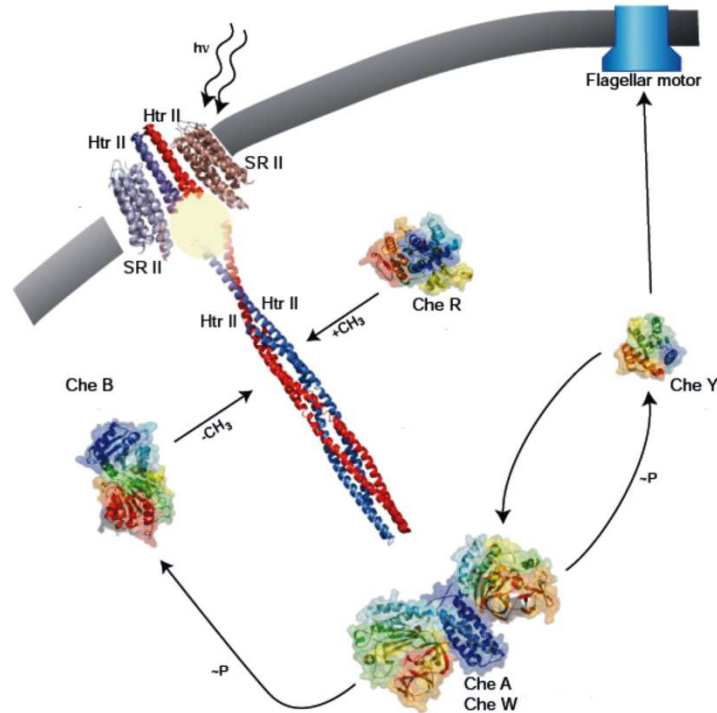


**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der archaebakteriellen Rhodopsine aus *H. salinarum*. Links und Mitte: SRI und SR II bilden mit den jeweiligen Transducern Htr I und Htr II einen 2:2-Komplex. Rechts: Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR). Das Zytosol befindet sich in dieser Darstellung unterhalb der Membran (übernommen aus Klare, 2002).

Nach ihrer Funktion können sie in zwei Gruppen unterteilt werden: Die Ionenpumpen Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR), sowie die für die Phototaxis verantwortlichen sensorischen Rhodopsine Sensorrhodopsin I (SRI) und Sensorrhodopsin II (SRII). SRI vermittelt die photophile Antwort der Archaeobakterien auf orangefarbiges Licht und über einen Zweiphotonenprozess die photophobe Reaktion auf blaues bzw. UV-Licht (Bogomolni und Spudich, 1982; Hazemoto *et al.*, 1983; Spudich und Bogomolni, 1984). Darüber hinaus wurde SRII als photophober Rezeptor für blaues bzw. UV-Licht identifiziert, welcher die Zellen vor photooxidativen Schädigungen schützt (Takahashi *et al.*, 1985). Beide Rezeptoren binden für sie spezifische Transducermoleküle (HtrI im Fall von SRI und HtrII bei SRII) in einem 2:2-Komplex (SRI/HtrI: Chen und Spudich, 2002; SRII/HtrII: Wegener *et al.*, 2001). Dabei ist der SRII/HtrII-Komplex aus *N. pharaonis* besonders gut untersucht und soll daher in dem vorliegenden Forschungsprojekt als Modellsystem verwendet werden. *N. pharaonis* besitzt im Gegensatz zu *H. salinarum* von den in Abbildung 1.1 gezeigten Proteinen nur das HR, das SRII und den zugehörigen Transducer HtrII. Das HtrII aus *N. pharaonis* (im Folgenden als *NpHtrII* bezeichnet) besitzt eine Membrandomäne mit zwei transmembranen Helices und eine zytoplasmatische Domäne. Diese ragt als ein langes in sich verwobenes Bündel aus vier Helices etwa 260 Å in das Zytoplasma hinein und enthält sowohl eine Signaldomäne zur Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade als auch eine Methylierungsregion, welche die Aktivität der Signaldomäne steuert (siehe Abbildung 1.2 und 1.5).

Eine Anregung des SRII durch Licht führt zu einer Isomerisierung des Retinal-Chromophors von der *all-trans*- zur *13-cis*-Konfiguration. In der Folge durchläuft das System einen Photozyklus, wobei eine Reihe von Intermediaten mit charakteristischen Absorptionsmaxima gebildet werden (K, L, M, N und O genannt). Am Ende des Zyklus geht das Retinal wieder in den Grundzustand über (Chizhov *et al.*, 1998).

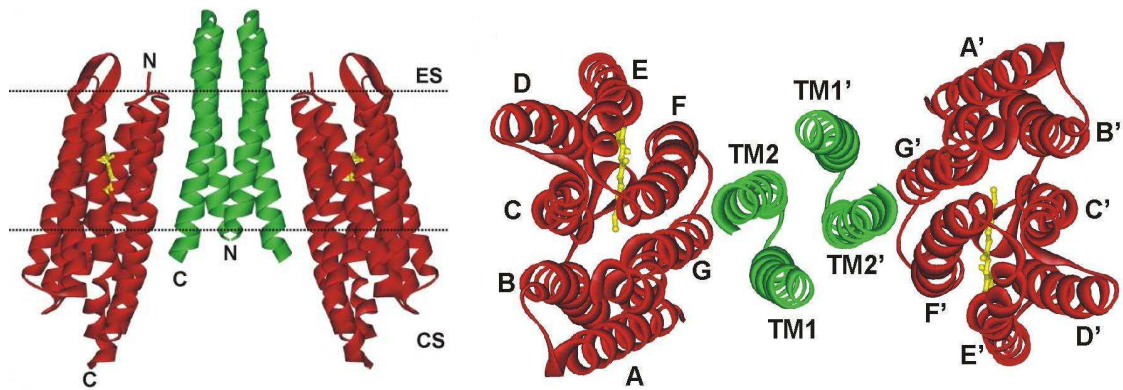
Das Signal wird dann vom Rezeptor über das HtrII zur zytoplasmatischen Domäne weitergeleitet. Dies führt zur Aktivierung eines Zweikomponentensystems (Abbildung 1.2), welches homolog zur bakteriellen Chemotaxis organisiert ist (Rudolph *et al.*, 1996).



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der archaebakteriellen Signaltransduktion (übernommen aus Etzkorn, 2008). Die Lichtanregung des SR II führt zu einer Aktivierung des Htr II, wodurch wiederum die Histidinkinase Che A aktiviert wird, welche über Che W an der zytosomatischen Domäne des Htr II gebunden ist. Es kommt zur Autophosphorylierung eines konservierten His-Rests am Che A. Die Phosphatgruppe kann anschließend auf eine Asparaginsäure der „response Regulatoren“ Che Y oder Che B übertragen werden. Che Y fungiert als Schalter, der die Drehrichtung des Flagellenmotors ändert. Che B und Che R sind an die Adaptation an konstante Stimuli involviert. Die erste HAMP-Domäne des Htr II ist nicht sichtbar, da die Struktur Gegenstand aktueller Forschung ist.

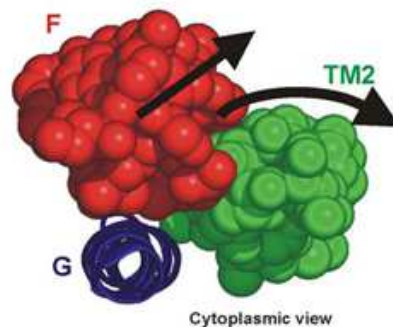
Der SR II/Htr II-Rezeptor-Transducer-Komplex aus *N. pharaonis* konnte aus kubischen Lipidphasen kristallisiert und die Struktur bestimmt werden (Gordeliy *et al.*, 2002; Abbildung 1.3). Dabei wurde für diese Untersuchungen ein verkürztes, die ersten 114 Aminosäuren umfassendes Konstrukt des Htr II verwendet. Im Kristall beobachtet man einen 2:2-Komplex, wobei die Transducerhelices TM1 und TM2 Kontaktflächen zu den Helices F und G des Rezeptors darstellen. Es konnten nur Daten über den transmembranen Bereich des *NpHtr II* detektiert werden (Aminosäuren 24-82), da für den C-Terminus keine Elektronendichte gefunden wurde (Gordeliy *et al.*, 2002).





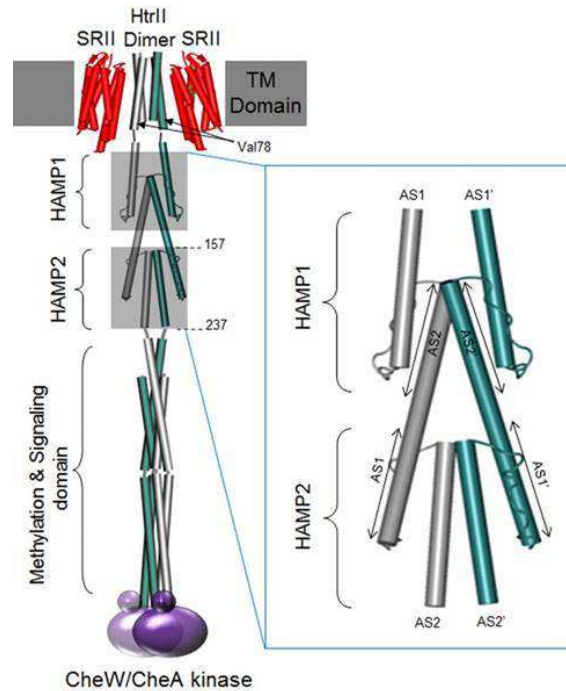
**Abbildung 1.3:** Kristallstruktur des 2:2-SRII/HtrII-Komplexes aus *N. pharaonis* (Gordeliy *et al.*, 2002). Links: Seitenansicht des Komplexes. Rechts: Sicht von der zytoplasmatischen Seite. Rot: SRII. Grün: HtrII. Gelb: Retinal. ES: Extrazellulärer Raum. CS: Zytoplasma. Die gestrichelten Linien grenzen den in der Membran liegenden Bereich ein (übernommen aus Klare *et al.*, 2004).

Die Forschung der letzten Jahre zeigte, dass die Aktivierung des sensorischen SRII durch blaues Licht zu einer Drehbewegung der C-terminalen transmembranen Helix (TM2) des Transducers führt (Wegener *et al.*, 2001; Klare *et al.*, 2004; Moukhametzianov *et al.*, 2006; Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4:** Modell der lichtinduzierten Konformationsänderungen (übernommen aus Klare *et al.*, 2004). Gezeigt ist die Wechselwirkung der Helix F des SRII und der TM2 des *NpHtrII*.

Wie diese kleine Rotationsbewegung zur Aktivierung der Histidinkinase CheA führt, ist bislang nicht geklärt. Um dies zu ermitteln, werden strukturelle und funktionelle Daten der zwei HAMP-Domänen, welche der Membrandomäne des *NpHtrII* folgen, benötigt (siehe Abbildung 1.2 und 1.5). Den beiden HAMP-Domänen wird eine entscheidende Bedeutung bei der Signalweiterleitung zur zytoplasmatischen Domäne beigemessen. Zum Beginn dieses Forschungsprojektes waren nur wenige Strukturinformationen über den generellen Aufbau von HAMP-Domänen bekannt.



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung des 2:2 SRII/HtrII Komplexes (übernommen aus Wang *et al.*, 2012). Gezeigt ist SRII in rot, jeweils ein HtrII in grün bzw. grau und CheW/CheA in lila. Die Strukturen der zwei HAMP-Domänen sind analog der aus Airola *et al.* (2010) dargestellt. HAMP1 und HAMP2 bestehen jeweils aus zwei Helices AS1 und AS2 (AS1' und AS2' für das andere HtrII), welche durch eine kurze Schleife verbunden sind. Gezeigt ist eine Vergrößerung der beiden HAMP-Domänen.

HAMP-Domänen sind als Strukturelement in prokaryontischen Histidin-Kinasen, Adenylyl-Cyclasen, Methyl-Akzeptor-Proteinen und Phosphatasen weit verbreitet (Aravind und Ponting, 1999). Sie leiten Konformationsänderungen, welche von Rezeptordomänen herrühren, zu Domänen, die enzymatische Aktivitäten modulieren. Die Anzahl der HAMP Domänen variiert in verschiedenen Proteinen. Strukturell bestehen einzelne Module allerdings immer aus zwei amphipathischen Helices, AS1 und AS2 genannt, und einem nicht strukturierten Linker (Hulko *et al.*, 2006).

In bisher allen untersuchten Fällen bildet ein Protein-Dimer eine Vier-Helix-coiled-coil-Struktur (coiled-coil, dt. *gewundene Schraube*) bestehend aus jeweils zwei Helices; AS1 und AS2 (Wang *et al.*, 2012). Im Jahre 2010 konnte ein Poly-HAMP Segment aus einem Aerotaxis Rezeptor (Aer2) aus *Pseudomonas aeruginosa* kristallisiert und die Struktur bestimmt werden (Airola *et al.*, 2010). Das untersuchte Konstrukt besaß drei HAMP-Domänen, wobei die erste und die dritte HAMP-Domäne einer schon bekannten, durch NMR-Spektroskopie ermittelten Struktur ähneln (Hulko *et al.*, 2006). Die zweite

HAMP-Domäne aus Aer2 unterscheidet sich im Vergleich merklich und wurde als gestörte oder offenere Struktur beschrieben (Airola *et al.*, 2010). Es wurde die Theorie aufgestellt, dass diese beiden Strukturen unterschiedliche Signalzustände widerspiegeln könnten (Airola *et al.*, 2010).

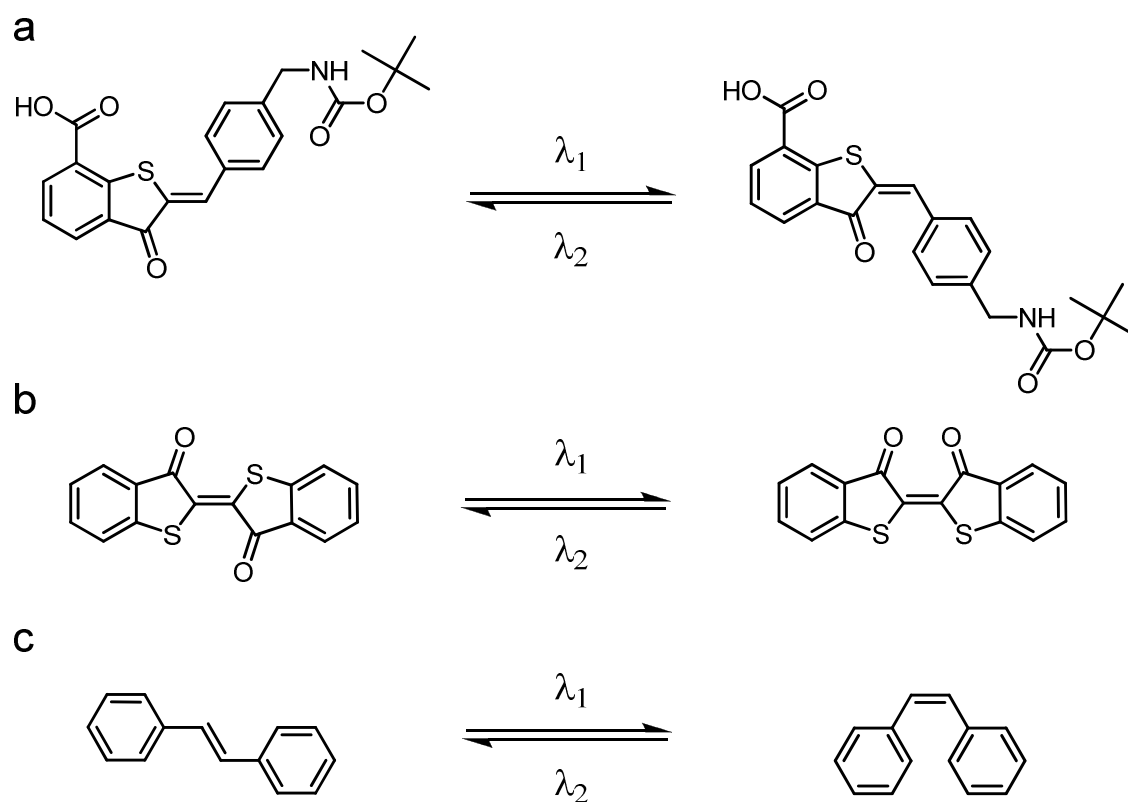
Im Falle des *NpHtrII* ließ eine Analyse der Primärstruktur der ersten HAMP-Domäne ebenfalls auf eine helikale Sekundärstruktur des Linkers schließen (Übersicht in Klare *et al.*, 2011). Allerdings zeigten ESR-Untersuchungen an der ersten HAMP-Domäne nur eine definierte Sekundärstruktur für die erste Hälfte der Helix AS-1 (AS1: Aminosäuren 88 bis 101). Der restliche Teil wurde als hoch dynamisch beschrieben, so dass keine durchgehende coiled-coil-Struktur (coiled-coil, dt. *gewundene Schraube*) festgestellt wurde (Bordignon *et al.*, 2005). Weitergehende ESR-Untersuchungen zeigten, dass die Struktur der ersten HAMP-Domäne stark von der Salzkonzentration und der Temperatur abhängt, wobei ein Gleichgewicht zwischen einer dynamischen (dHAMP) und einer kompakten Struktur (cHAMP) vorliegt (Doebber *et al.*, 2008).

Weitere Erkenntnisse sollten durch den Einsatz der Festkörper-NMR- oder der FTIR-Spektroskopie gewonnen werden können. Hierzu müssen proteinsynthetische Probleme überwunden werden, um für die jeweiligen Techniken geeignete Reportergruppen einzuführen.

## 1.2 Photoschaltbare Verbindungen und Reportergruppen

Lichtinduzierte Konformationsänderungen spielen nicht nur in natürlichen Systemen wie der archaebakteriellen Phototaxis eine große Rolle sondern können ebenfalls mit photoschaltbaren Verbindungen in künstlichen Systemen ausgelöst werden (Übersicht in Szymański *et al.*, 2013). Photoschaltbare Verbindungen verändern ihre Struktur bei Bestrahlung mit Licht einer charakteristischen Wellenlänge. Typische Vertreter sind Azobenzole, Stilbene, Spiropyrane, Diarylethene, Thiophenfulgide und auf Hemithioindigo basierende Verbindungen (HTI). Sie lassen sich durch die Absorptionsmaxima der Isomere und durch den Grad der durch die Photoreaktion ausgelösten Konformationsänderungen charakterisieren (Szymański *et al.*, 2013).

HTI-Derivate sind aus einem Hemithioindigo- und einem Hemistilben-Teil aufgebaut und können reversibel zwischen der E- und Z-Konfiguration isomerisieren. Dabei erfolgt bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 400-410 nm eine Isomerisierung von der Z- zur E-Konfiguration; bei 480-490 nm eine Isomerisierung von der E- zur Z-Konfiguration (Abbildung 1.6 (a)). Die Stammverbindungen Thioindigo (Abbildung 1.6 (b)) und Stilben (Abbildung 1.6 (c)) besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Photoisomerisierung. HTI-Derivate konnten bereits in Peptide eingebaut werden, da deren chemische Eigenschaften mit den Bedingungen der Peptidsynthese kompatibel und Aminosäurederivate chemisch zugänglich sind (Abbildung 1.6 (a), Steinle und Rück-Braun, 2003). Dabei zeigten Untersuchungen mittels zeitaufgelöster Absorptions- und FTIR-Spektroskopie, dass durch die Photoisomerisierung Konformationsänderungen in den analysierten Peptiden induziert werden konnten (Regner *et al.*, 2012).



**Abbildung 1.6:** (a) Boc-geschütztes HTI, (b) Thioindigo, (c) Stilben und lichtinduzierte Isomerisierungen um die zentrale Doppelbindung.

Zum Nachweis von Konformationsänderungen in Proteinen können verschiedene biophysikalische Methoden angewendet werden, wobei sich die ESR-, die FTIR-Differenz-

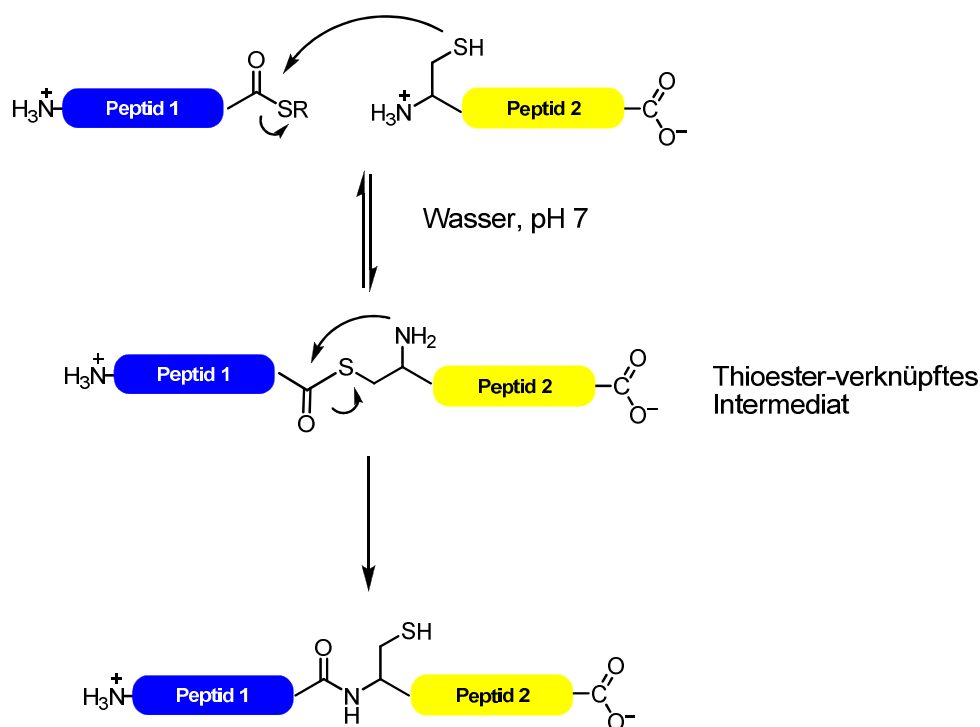
und die Festkörper-NMR-Spektroskopie besonders für Membranproteine eignen. Um diese Techniken anwenden zu können, müssen allerdings für die jeweiligen Methoden geeignete Reportergruppen eingeführt werden. Im Falle der ESR-Spektroskopie (Übersicht in: Hubbell *et al.*, 2000; Steinhoff, 2002; Steinhoff, 2004) werden zur Untersuchung von Proteinen stabile organische Radikale (Spin-Label), wie z. B. das Nitroxid-Radikal, kovalent an eine Aminosäure des Proteins gebunden. Im Falle des häufig verwendeten MTS-Spin-Labels erfolgt diese Bindung an ein über ortsspezifische Mutagenese in das Protein eingeführtes Cystein in Form einer Disulfidbrücke (Berliner *et al.*, 1982). Die FTIR-Differenzspektroskopie ist ebenfalls geeignet, lichtinduzierte Konformationsänderungen von Chromophor enthaltenden Proteinen zu detektieren (Übersicht in: Vogel und Siebert, 2000; Vogel und Siebert, 2003). Durch Einführung von Infrarot-Sonden (wie z.B. Azid- (Ye *et al.*, 2009) oder Nitril-Gruppen (Getahun *et al.*, 2003; Reisdorf, 2009)) können Aussagen über Stärke von elektrostatischen Feldern und Konformationsänderungen in Membranproteinen getroffen werden. Die Festkörper-NMR-Spektroskopie ist eine weitere Möglichkeit Struktur und Dynamik von Membranproteinen zu analysieren (Übersicht in Luca *et al.*, 2003; Renault *et al.*, 2010). Um eine höhere Signalintensität zu erreichen, werden dazu Isotopenmarkierungen (z. B.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) in Proteine eingeführt. Dies kann durch heterologe Expression in synthetischen Minimalmedien geschehen, welche beispielsweise  $^{13}\text{C}$  D-Glukose und/oder  $^{15}\text{N}$  Ammoniumchlorid als Kohlenstoff bzw. Stickstoffquelle enthalten.

### 1.3 Chemische Synthese von Proteinen

Der Einbau nahezu beliebiger Modifikationen in Peptide kann durch die von Merrifield entwickelte Festphasenpeptidsynthese erreicht werden (Übersicht in Merrifield, 1985). Bei dieser erfolgt die Synthese an modifizierten Polystyrolkugeln, welche als Harz bezeichnet werden. Hierbei ist die Darstellung von Peptiden bis zu einer Größe von etwa 60 Aminosäuren praktikabel. Da aber viele Proteine deutlich größer sind, können diese nicht alleine mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt werden.

Zwei Entwicklungen der letzten 20 Jahre – die Native Chemische Ligation (NCL) und die Expressed Protein Ligation (EPL) – haben die chemische Darstellung ganzer Proteine wesentlich vereinfacht. Die NCL ermöglicht die Verknüpfung zweier ungeschütz-

ter Peptide in Gegenwart eines Thiolkatalysators in wässriger Umgebung und bei physiologischem pH-Wert (Dawson *et al.*, 1994). Sie beruht auf einer anfänglichen Umesterung, gefolgt von einer  $S \rightarrow N$ -Acylgruppenübertragung (Abbildung 1.7), wobei ein solcher Vorgang zuerst von Wieland *et al.* (1953) beschrieben wurde. Voraussetzungen sind das Vorhandensein eines Thioesters an der  $\alpha$ -Carboxygruppe der C-terminalen Aminosäure des N-terminalen Peptides und ein Cysteinrest am N-Terminus des C-terminalen Peptides. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 1.7 gezeigt. In Anwesenheit eines Thiolkatalysators kommt es zunächst zu einer reversiblen Umesterung zwischen dem Thioester des Peptides 1 und dem N-terminalen Cystein des Peptides 2. Durch eine spontane und unter den Versuchsbedingungen irreversible Folgereaktion ( $S \rightarrow N$  Acyltransferreaktion), bei der die Aminogruppe des N-terminalen Cysteins des Peptides 2 den vorhandenen Thioester substituiert, entsteht eine native Amidbindung an der Ligationstelle.



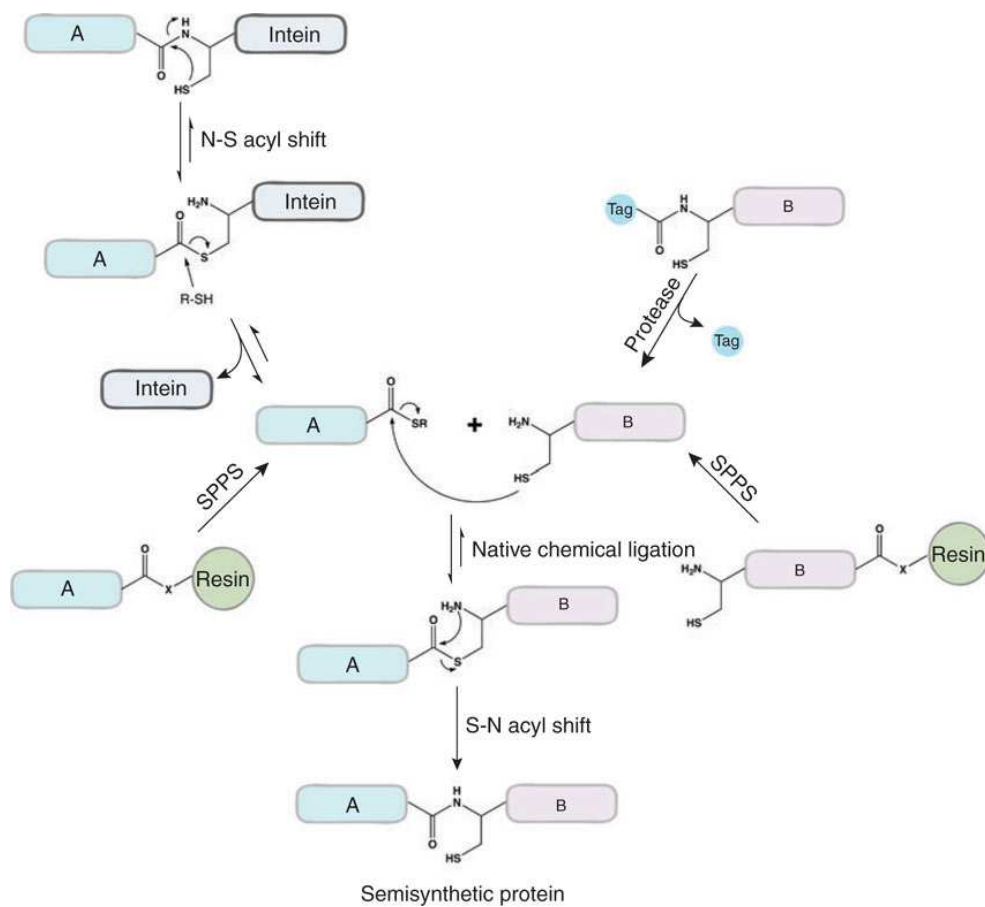
**Abbildung 1.7:** Mechanismus der NCL (vgl. Kent., 2009).

Dabei ist die NCL in hohem Maße chemoselektiv. Das heißt, es werden keine Nebenprodukte mit anderen nukleophilen Gruppen, wie z. B.  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Amino-Gruppen, im Peptid ausgebildet. Weiterhin ist bislang keine Epimerisierung der Thioester-tragenden Aminosäure beobachtet worden (Kent, 2009). Theoretisch lässt sich eine beliebige

Anzahl von Peptiden verknüpfen, jedoch ist die Ausbeute der NCL und die Aufreinigungseffizienz der limitierende Faktor, so dass bisher die vollsynthetische Darstellung von Proteinen mit einer Größe von maximal 304 Aminosäuren gelungen ist (Kumar *et al.*, 2011).

Die EPL erlaubt synthetische Peptide mit rekombinanten Proteinen zu verknüpfen und beruht auf der Nutzung von Inteinen (Severinov und Muir, 1998). Bei Inteinen handelt es sich um Proteindomänen, die sich autokatalytisch aus einem größeren Protein herausschneiden und dabei die verbleibenden Proteinfofragmente (Exteine) durch eine native Peptidbindung miteinander verbinden können. Dieser Vorgang wird auch als Proteinspleißen bezeichnet. Durch biochemische Studien konnten für diesen Vorgang essentielle Reste identifiziert werden, was zur Postulierung eines Reaktionsmechanismus führte (Übersicht in Noren *et al.*, 2000). Durch Generierung von speziellen Mutanten kann dieser Prozess zur Darstellung von Thioester-enthaltenen Proteinen ausgenutzt werden. Hierzu wird das Proteinspleißen auf der ersten Stufe abgebrochen, so dass nicht zwei Exteine miteinander verbunden werden, sondern ein dabei auftretendes Thioesterintermediat gebildet wird. Wird nun ein Protein als N-terminales Fusionskonstrukt mit einem derartig mutierten Intein überexprimiert, kann dieses durch Thiolzugabe vom Intein abgespalten werden und besitzt darüber hinaus einen C-terminalen Thioester (Abbildung 1.8). In Folge dessen kann es in einer NCL eingesetzt werden (Severinov und Muir, 1998; Muralidharan und Muir, 2006).

Heutzutage stehen kommerziell erhältliche Expressionsvektoren in Form von Plasmiden zu Verfügung, auf denen unter anderem die Sequenz für ein Intein und ein Affinitätstag kodiert sind. Durch Einfügen der gewünschten Proteinsequenz auf DNA-Ebene und nachfolgende heterologe Genexpression in *E. coli* lässt sich so theoretisch eine beliebige Proteinsequenz mit C-terminalem Thioester darstellen, welche dann in einer NCL eingesetzt werden kann (Abbildung 1.8). Dabei kann das C-terminale Fragment entweder mittels Festphasenpeptidsynthese oder mittels heterologer Genexpression erzeugt werden. Durch die EPL kann die Größenlimitierung eines vollsynthetischen Ansatzes überwunden werden.



**Abbildung 1.8:** Schematische Darstellung der Expressed Protein Ligation (EPL). Protein (A) wird als Inteininfusionskonstrukt dargestellt. Dabei kann das Intein durch Zugabe von Thiolen abgespalten und ein Thioester generiert werden. Protein (B) enthält ein N-terminales Cystein. Dieses kann rekombinant dargestellt werden, indem das N-terminale Cystein durch eine Proteaseschnittstelle geschützt wird, welche später entfernt wird. Protein (A) und (B) können auch mittels Festphasenpeptidsynthese an einem Harz mit geeignetem Linker (X) chemisch synthetisiert werden (übernommen aus Muralidharan und Muir, 2006).

Beispiele für die Anwendungen der NCL und EPL sind der ortsspezifische Einbau von unnatürlichen Aminosäuren mit Reportergruppen für spektroskopische Methoden (Chromophore, Isotopen für NMR und FTIR), von D-Aminosäuren, von Resten mit einer modifizierten oder völlig veränderten Rückgratchemie oder von Resten mit Funktionalitäten für Quervernetzung oder für Immobilisierung auf Oberflächen (Goody *et al.*, 2003; Kent, 2009; Flavell und Muir, 2009; Kent *et al.*, 2012).

Obwohl die NCL und EPL für lösliche Proteine gut etabliert sind, stellen die Voll- und Semisynthese von Membranproteinen besondere Herausforderungen dar (Übersicht in Olschewski und Becker, 2008; Shen *et al.*, 2011). Schwierigkeiten sind insbesondere die mangelnde Löslichkeit von Membranproteinen in wässrigen Puffern und deren Ten-



denz zu aggregieren (Johnson und Kent, 2007). Darüber hinaus sind klassische Aufreinigungsmethoden wie die HPLC nur eingeschränkt anwendbar. Um diese Probleme zu umgehen, wurden verschiedene Strategien entwickelt, wie z.B. die Einführung eines solubilisierenden Arginin-Tags über einen Thioester (Johnson und Kent, 2007). Bei Durchführung einer NCL wird der Arginin-Tag abgespalten oder kann nach erfolgter Aufreinigung durch basische Hydrolyse entfernt werden (Camarero *et al.*, 2000). Um hydrophoben Peptide während einer NCL in Lösung zu halten, wurden Detergenzien, wie z. B. SDS, zum Reaktionsansatz hinzugefügt (Valiyaveetil *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2005), organische Cosolventien wie TFE zugesetzt (Kochendoerfer *et al.*, 1999) oder die Ligation durch Vermittlung einer Lipiddoppelschicht bzw. in kubischen Lipidphasen durchgeführt (Otake *et al.*, 2004; Hunter und Kochendoerfer, 2004). Veröffentlichungen der letzten 15 Jahre brachten den Nachweis, dass so die Darstellung von Membranproteinen mit einer transmembranen  $\alpha$ -Helix erreicht werden kann, aber nur in Einzelfällen größere Membrandomänen zugänglich sind (Valiyaveetil *et al.*, 2002; Clayton *et al.*, 2004). Hervorzuheben ist eine Arbeit von Lahiri *et. al* (2011), die das drei transmembrane Helices enthaltene Protein Diacylglycerol Kinase chemisch darstellen konnten, indem sie zwei aufeinander folgende Ligationen in einem wässrigen Puffer aus 8 Harnstoff und 20 mM OG bzw. 50 mM DPC durchführten. Trotz dieser vereinzeltten Erfolge existiert aber zurzeit keine routinemäßig einsetzbare Methode für die Ligation zweier transmembraner  $\alpha$ -helikaler Peptide.

## 1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die methodischen Voraussetzungen für eine chemische Modifizierung des archaebakteriellen Transducerproteins *NpHtrII* zu schaffen. Die Etablierung einer Synthese und einer Semisynthese soll sowohl den Einbau eines chemisch synthetisierten Photoschalters als auch die Inkorporation verschiedener Reportergruppen, wie z. B. Label für die Festkörper-NMR-, die FTIR- sowie die ESR-Spektroskopie gestatten. Diese Modifizierungen sollen weitere biophysikalische Untersuchungen an diesem Protein ermöglichen und so helfen, zusätzliche Kenntnisse über dessen Funktion auf molekularer Ebene zu erhalten.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollen zunächst mechanistische Untersuchungen zur Photoisomerisierung des Thioindigos erfolgen, wobei dies den Grundchromophor des bereits in Peptide eingebauten HTI-Photoschalters darstellt. Hierzu sollen die Thioindigoderivate 4,4'-Dihydroxythioindigo und 4,4'-Dimethoxythioindigo chemisch dargestellt und sowohl mittels stationärer als auch mittels zeitabhängiger Spektroskopie untersucht werden. Eine zentrale Frage lautet, ob ein Protonentransfer im Hemi-thioindigo-Teil ausreichend ist, um eine hohe Photostabilität zu gewährleisten.

Um eine chemischen Synthese des *NpHtrII* zu ermöglichen, soll zuvor ein neues Ligationverfahren für hydrophobe Peptide entwickelt werden, da die NCL von transmembranen Peptiden wegen der schlechten Löslichkeit der Komponenten und deren Tendenz zu aggregieren mit großen Schwierigkeiten behaftet ist. Eine Möglichkeit zur Lösung dieser Problematik wäre die Durchführung einer NCL in organischen Lösungsmitteln. Eine solche NCL ist zum Beginn dieser Arbeit noch unbekannt gewesen. Daher sollen zunächst verschiedene organische Lösungsmittel auf die Möglichkeit zur Durchführung einer NCL getestet werden und bei einem positiven Ergebnis die Reaktionsbedingungen optimiert, die Chemoselektivität analysiert und eine Epimerisierung der Thioester-tragenden Peptide nach Möglichkeit ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus soll die 114 Aminosäuren umfassende Membrandomäne des *NpHtrII* synthetisch dargestellt werden, da die Etablierung einer chemischen Synthese die Vo-

raussetzung für den Einbau von nicht nativen Aminosäuren darstellt. In darauf folgenden Arbeitsschritten könnte der Einbau eines Photoschalters (z. B. der HTI-Photoschalter) in die extrazelluläre Schleife der Membrandomäne des *NpHtrII* erfolgen und so ein artifizielles Modellsystem für den transmembranen Signaltransfer dargestellt werden. Eine lichtinduzierte Isomerisierung des Photoschalters könnte reversible Konformationsänderungen auslösen, die mittels ebenfalls eingebauter Reportergruppen durch ESR- oder FTIR-Spektroskopie erkannt und über die Membran hinweg verfolgt werden könnte. Da der Photoschalter in die Schleife zwischen den beiden transmembranen Helices eingebaut werden soll, wird zu diesem Zweck eine geeignete Strategie entwickelt. Dazu sollen je eine transmembrane Helix umfassende Peptide mittels Boc-Festphasenpeptidsynthese dargestellt und durch HPLC aufgereinigt werden. Von diesen ausgehend sollen Ligationsbedingungen gefunden werden, welche eine NCL der hydrophoben Peptide gestatten. Darüber hinaus müssen sowohl Reaktionsanalytik als auch eine Aufreinigungsstrategie und ein Rückfaltungsprotokoll etabliert werden. Abschließend ist zu testen, ob das synthetische Protein ähnliche Eigenschaften wie ein rekombinant dargestelltes *NpHtrII* 1-114 besitzt.

Um die Größenlimitierung des vollsynthetischen Ansatzes zu überwinden, soll die Semisynthese eines verkürzten, die Membran- und die erste HAMP-Domäne umfassenden Analogon des *NpHtrII* etabliert werden. Darauf aufbauend ist es geplant, die für die Signalweiterleitung bedeutende erste HAMP-Domäne mittels [ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-Isotopenlabel zu markieren. Zunächst soll die Semisynthese mit unmarkierten Peptiden etabliert und nach Abschluss der synthetischen Arbeiten die Rückfaltung des *NpHtrII*-Analogons in eine native Konformation erfolgen. Durch Darstellung des [ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] isotopenmarkierten Analogons könnten in nachfolgenden Messungen mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie die spektrale Auflösung verbessert und so neue Erkenntnisse über die Struktur der ersten HAMP-Domäne erhalten werden.

## 2 Experimenteller Teil – Materialien, Methoden und Synthesen

### 2.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien über den kommerziellen Handel, mindestens in p.A.-Qualität, von Sigma Aldrich (München, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Wasser (>18MW/cm) wurde einer MilliQ Reinstwasser-Anlage der Firma Millipore (Billerica, USA) entnommen. Bei allen %-Angaben in dieser Arbeit handelt es sich bei Feststoffen um Gewichtsprozent, bei Flüssigkeiten um Volumenprozent.

**Tabelle 2.1:** Bezugsquellen der Chemikalien.

Chemikalie	Lieferant	Ort
DCM	Applied Biosystems	Karlsruhe, Deutschland
DMF	Applied Biosystems	Karlsruhe, Deutschland
HBTU	IRIS Biotech	Marktredwitz, Deutschland
TFA	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Boc-L-Arg-(Tos)-Pam Harz	NoeMPS	Straßburg, Frankreich
Boc-L-His-(3-Bom)-Pam Harz	NoeMPS	Straßburg, Frankreich
Boc-L-Leu-Pam Harz	NoeMPS	Straßburg, Frankreich
Glukose-D U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 99% <sup>13</sup> C	CortecNet	Voisins-Le-Bretonneux, Frankreich
Ammoniumchlorid 98% <sup>15</sup> N	CortecNet	Voisins-Le-Bretonneux, Frankreich
Trypton	Gibco BRL	Neu Isenburg, Deutschland
Hefeextrakt	Gibco BRL	Neu Isenburg, Deutschland

## 2.2 Instrumentation

Die manuell durchgeführte Festphasenpeptidsynthese erfolgte in einer handelsüblichen Glasfritte (D3). Die HF-Abspaltung der synthetisierten Peptide wurde mit einer Teflon-Apparatur der Protein Research Foundation (Minoh, Osaka, Japan) durchgeführt. Die Gefriertrocknung der Peptide erfolgte mit Gefriertrocknungsanlagen der Firma Christ (Osterode, Deutschland) vom Typ Alpha I-5 oder Alpha 2-4 LD plus. UV-VIS-Absorptionsmessungen wurden an einem UV-2401PC von Shimadzu (Duisburg, Deutschland) durchgeführt. Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluoromax-3 Spectrofluorometer (HORIBA Jobin Yvon Inc., Edison, USA) bei Raumtemperatur aufgenommen. Es wurden folgende Tischzentrifugen verwendet: 5417R mit FA45-24-11 Rotor, 5418 und 5415C von Eppendorf (Hamburg, Deutschland). Für Sedimentationen wurden die Zentrifugen Optima L-80XP mit Ti45 oder Ti70 Rotor und Avanti J-26XP mit einem JLA-8.1000 Rotor (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) verwendet und für die Zentrifugation von Proben in Falcon-Tubes die Zentrifuge 5810R der Firma Eppendorf. Für pH-Messungen wurde das pH-Meter 766 Calimatic und eine pH-Elektrode Typ pH/pt der Firma Knick verwendet. Die Zellanzucht erfolgte unter aeroben Bedingungen in den Schüttlern der Firma New Brunswick (Nürtingen, Deutschland). Zur Ankonzentrierung von Proteinlösungen wurden Amicon Centrifugal Filter Devices (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet (10 kDa oder 30 kDa MWCO). Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Mikrofluidizer der Firma Microfluidics Corporation (Newton, USA). Zur Aufreinigung von Proteinen mit einem His-Tag wurde Ni-NTA-Superflow der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Proteine, die einen GST-Affinitätstag besaßen, wurden über GSH-Sepharose der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) aufgereinigt. Es wurde eine SpeedVac Plus SC110 A Savant (Savant Instruments inc, New York, USA) verwendet.

## 2.3 Analytische Methoden

### 2.3.1 Elektrosprayionisation Massenspektrometrie

In diesem Forschungsvorhaben wurden die Messungen mit einem Finnigan LCQ Advantage MAX (Thermo Electron Corporation, San Jose, USA) durchgeführt. Mit diesem Gerät können Proben vor Eintritt in die Ionisationsregion chromatographisch mittels HPLC über eine analytische C4-Säule aufgetrennt werden. So wird ein Chromatogramm erhalten, in dem man zusätzlich die darin enthaltenen detektierten m/z-Werte eines jeden Peaks ablesen kann (LCMS, Flüssigchromatographie mit MS-Kopplung). Dabei erfolgte die Elution des zu analysierenden Peptids oder Proteins mit einem Gradienten von 20% nach 80% Puffer B (Acetonitril, 0.08% TFA) in Puffer A (Wasser, 0.1% TFA) in 20 min. Des Weiteren ist es möglich Massenspektren ohne die erwähnte HPLC-Trennung aufzunehmen, indem Proben direkt in den Zustrom zur ESI-Kapillare (1:1 Acetonitril/Wasser + 0.1% TFA) injiziert werden (ESI-MS-Experiment). Bei ESI-MS-Experimenten wurde ein Bereich von 200-2000 m/z vermessen; im Falle von LCMS-Experimenten von 700-2000 m/z.

### 2.3.2 Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie

Die Messung von MALDI-Massenspektren erfolgte mit einem Voyager-DE Pro MALDI-Massenspektrometer von Perseptive Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) oder an einem Bruker autoflex (Rheinstetten, Deutschland). Als Matrix wurde eine gesättigte Lösung von 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA verwendet. Die Messungen an dem Voyager-DE Pro MALDI-Massenspektrometer wurden mit folgenden Einstellungen vorgenommen: *linear operation mode*, *positive polarity*, *25 000 V accelerating voltage*, *93% grid voltage*, *0.3% guide wire*, *1500 nsec extraction delay time*, *20 Hz laser repetition rate* und *3 000 Da low mass gate*.

### 2.3.3 Hochleistungsflüssigchromatographie

Für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden im analytischen Maßstab Anlagen der Firma Beckman Coulter Inc. (Brea, USA, System Gold, Module 126, 168, 508) verwendet. Die HPLC im präparativen Maßstab wurde mittels einer An-

lage der Firma Waters (Eschborn) bestehend aus Controller 600, Dual  $\lambda$  Absorbancedetector 2487 und einem Waters Fraktionssammler durchgeführt. Sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab wurden Säulen der Firma Grace (Deerfield, USA) und Bischoff (Leonberg, Deutschland) verwendet. Die Vydac-Säulen von Grace wurden dabei von folgenden Anbietern bezogen: Alltech Grom GmbH (Rottenburg-Hailfingen, Deutschland), MZ Analysentechnik GmbH (Mainz, Deutschland) und Altmann Analytik GmbH & Co. KG (München, Deutschland). Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei Wellenlängen von 214 nm, 270 nm oder 280 nm.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene Eluentensysteme verwendet, die in Tabelle 2.1 zusammengefasst sind.

**Tabelle 2.1:** Verwendete mobile Phasen.

<b>Eluentensystem</b>	<b>Eluent A</b>	<b>Eluent B</b>
1	Wasser, 0.1% TFA	Acetonitril, 0.1% TFA
2	5 mM NaPi in Wasser, pH = 8	5 mM NaPi in 60% Acetonitril, 40% Wasser, pH = 8
3	Wasser, 0.1% TFA	60% Isopropanol, 30% Acetonitril, 10% Wasser, 0.1% TFA
4	60% Ameisensäure, 40% Wasser	Isopropanol

### 2.3.3.1 Analytische HPLC

Die Analyse und Charakterisierung der Proben erfolgte im analytischen Maßstab durch HPLC mit unterschiedlichen, den jeweiligen Fragestellungen angepassten Flussraten, Puffern, Gradienten und Probenmengen. Darüber hinaus wurde die Temperatur variiert. Es wurden folgende Säulen verwendet:

- (1) Bischoff (Leonberg, Deutschland), C18-ProntoSIL AQ, C18-Säule, 250 x 4.6 mm, 5 µm, 120 Å Porengröße
- (2) Grace (Deerfield, USA), VYDAC, C4-Säule, 125 x 4.6 mm, 5 µm, 300 Å Porengröße
- (3) Grace (Deerfield, USA), VYDAC, Diphenyl-Säule, 250 x 4.6 mm, 5 µm, 300 Å Porengröße

Zur Analyse wurden verschiedene Gradienten angewendet, welche an dieser Stelle dokumentiert sind.

Gradient 1: 5% B nach 65% B in 30 min.

Startzeit / min	Anteil des Eluenten B in %	Dauer / min
0	5	3
3	5 → 65	30
33	65 → 75	3
36	75 → 75	3
39	75 → 5	2
41	5 → 5	5

Gradient 2: 20% B nach 80% B in 20 min.

Startzeit / min	Anteil des Eluenten B in %	Dauer / min
0	20	3
3	20 → 80	20
23	80 → 95	10
33	95 → 95	10
43	95 → 20	5



Gradient 3: 20% B nach 80% Puffer in 30 min.

Startzeit / min	Anteil des Eluenten B in %	Dauer / min
0	20	3
3	20 → 80	30
33	80 → 95	5
38	95 → 95	5
43	95 → 20	5

Gradient 4: 20% B nach 40% B in 30 min.

Startzeit / min	Anteil des Eluenten B in %	Dauer / min
0	5	3
3	5 → 20	10
13	20 → 40	30
43	40 → 75	5
48	75 → 75	5
53	75 → 5	5
58	5 → 5	5

Gradient 5: 5% Puffer B nach 80% Puffer B in 30 min.

Startzeit / min	Anteil des Eluenten B in %	Dauer / min
0	5	3
3	5 → 80	30
33	80 → 95	5
38	95 → 95	5
43	95 → 5	5

Gradient 6: 2% Puffer B nach 20% Puffer B in 25 min.

Startzeit / min	Anteil des Eluenten B in %	Dauer / min
0	2	10
10	2 → 20	25
35	20 → 75	10
45	75 → 75	10
55	75 → 2	5
60	2 → 2	5

Gradient 7: 5% Puffer B nach 65% Puffer B in 60 min.

Startzeit / min	Anteil des Eluenten B in %	Dauer / min
0	5	3
3	5 → 65	60
63	65 → 75	3
66	75 → 75	3
69	75 → 5	2
71	5 → 5	5

### 2.3.3.2 Aufreinigung der Peptide im präparativen Maßstab

Die Aufreinigung der Rohprodukte nach der Festphasenpeptidsynthese erfolgte im präparativen Maßstab durch HPLC mit C4- (250 x 22 mm, 5 µm), C18- (250 x 22 mm, 5 µm) oder mit Diphenyl-Säulen (250 x 22 mm, 10 µm) bei Flussraten von 8 bis 10 ml·min<sup>-1</sup>. Dazu wurde das jeweilige Peptid (maximal 150 mg) sofern nicht anders vermerkt in einem möglichst geringen Volumen Wasser/Acetonitril 0.1% (v/v) TFA oder in einem wässrigen Puffer mit Zusatz von 6 M Guanidiniumchlorid gelöst und manuell in das HPLC-System injiziert. Die Elution des dargestellten Peptides erfolgte mit jeweils angepassten Gradienten (0.1-0.5% B/min). Die Detektion geschah bei Wellenlängen von 214 nm und 280 nm. Es wurden jeweils 120 Fraktionen genommen und

mittels ESI-MS, LCMS oder MALDI-MS und analytischer HPLC analysiert. Die Fraktionen, welche das dementsprechende Produkt in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt, lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

#### 2.3.4 SDS-PAGE

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden mit dem Mini-PROTEAN 3 Cell System der Firma BioRad (Hercules, USA) durchgeführt. Dabei wurde der Protein-Molekulargewichtsmarker der Firma Pharmacia (Freiburg, Deutschland) verwendet. Dieser setzte sich aus folgenden Proteinen zusammen: Phosphorylase b (97 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20.1 kDa) und  $\alpha$ -Lactalbumin (14.4 kDa). Die Durchführung erfolgte in dieser Arbeit nach der Methode von Schägger und Jagow (1987). Dabei wurden Trenngele mit 12-19% Acrylamid bzw. Sammelgele mit 4% Acrylamid verwendet. Die Proben wurden mit 10  $\mu$ l 2 X Probenpuffer (maximales Volumen: 20  $\mu$ l) aufgefüllt. Nach Auftragung der Proteine oder der Peptide auf das SDS-Polyacrylamidgel wurden diese bei einer Spannung von 80 bis 120 V aufgetrennt. In der Folge wurden die Proteinbanden zunächst 20 bis 60 min mit Coomassie-Blue-Färbelösung gefärbt und anschließend mittels der Entfärbelösung entfärbt. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

**Tabelle 2.2:** Komponenten der SDS-PAGE.

Komponente	Zusammensetzung
Acrylamid-Stammlösung	30% (w/v) Acrylamid, 0.8% (w/v) <i>N,N</i> -Methylenbisacrylamid
S. u. J. Gelpuffer	3 M Tris-HCl, 0.01 M SDS, pH 8.45
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
10% APS	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
2-mal Probenpuffer	120 mM Tris-HCl, 6% (w/v) SDS, 35% (w/v) Glycerin, 3.6% (v/v) Monothioglycerol, 0.05% (w/v) Bromphenolblau
Kathodenpuffer	100 mM Tris-HCl, 100 mM Tricin, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.25
Anodenpuffer	200 mM Tris-HCl, pH 8.9
Färbelösung	0.1% (w/v) Coomassie Blue R-250, 10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Ethanol
Entfärbelösung	10% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Ethanol

Der Ansatz für die Herstellung zweier Gele ist in Tabelle 2.3 dokumentiert.

**Tabelle 2.3:** Gele SDS-PAGE.

	4% Sammelgellösung (2 Gele)	12% Trenngellösung (2 Gele)
Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 0.8)	0.59 ml	3 ml
S. u. J. Gelpuffer	1.2 ml	2.5 ml
Wasser	2.67 ml	2 ml
10% APS	25 µl	37.5 µl
TEMEDA	7 µl	7 µl

### 2.3.5 Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie wurde in dieser Arbeit an einer ÄKTApurifier der Firma GE Healthcare (Chalfont St Giles, Großbritannien) durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine Säule vom Typ Superdex 200 10/300 GL verwendet, sowie als mobile Phase ein Puffer bestehend aus 0.05% DDM, 150 mM Na-

triumchlorid, 10 mM Tris, pH 8 (Fluss: 0.5 ml·ml<sup>-1</sup>). Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei Wellenlängen von 215 nm und 280 nm.

### 2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der verschiedenen Transducer-Konstrukte erfolgte aufgrund des geringen Vorkommens aromatischer Aminosäuren nach der Methode von Ehresmann (Ehresmann *et al.*, 1973; vgl. Klare, 2002) oder nach Scopes (Scopes, 1974). Bei der Methode nach Ehresmann wird die Absorption bei 228.5 nm ( $A_{228.5}$ ) und bei 234.5 nm ( $A_{234.5}$ ) gemessen und die Proteinkonzentration nach folgender Formel abgeschätzt:

$$c_{NpHtrII} (mg / ml) = \frac{A_{228.5} - A_{234.5}}{3.14} \quad (1)$$

Alternativ ergibt sich nach Scopes der Extinktionskoeffizient bei 205 nm ( $\epsilon_{205}$ ) nach folgender Formel:

$$\epsilon_{205} (1 \text{ mg} / \text{ml}) = \frac{27}{1 - 3.85 \times \frac{A_{280}}{A_{205}}} \quad (2)$$

Für die verschiedenen Konstrukte des *NpHtrII* entspricht eine Absorption von OD = 31 bei 205 nm etwa einer Proteinkonzentration von 1 mg·ml<sup>-1</sup>.

Die Konzentration des Photorezeptors *NpSRII* wurde über die maximale Absorption des Retinal-Chromophors bei 498 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 40000 \text{ cm} \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$  über das Lambert-Beersche-Gesetz ermittelt (vgl. Klare, 2002).

$$c(\text{mol} / \text{l}) = \frac{A_{498}}{\epsilon_{498} \cdot d} \quad (3)$$

c = Konzentration [mol·l<sup>-1</sup>]

$\epsilon_{498}$  = Extinktionskoeffizient [cm·l·mol<sup>-1</sup>] bei 498 nm

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

$A_{498}$  = Absorption bei 498 nm

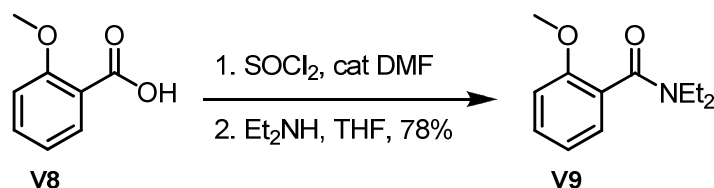
## 2.4 Chemische Methoden

### 2.4.1 Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität und wurden von den Firmen Merck, Fluka und Sigma-Aldrich bezogen. Luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in ausgereizten Apparaturen unter Argonatmosphäre durchgeführt. Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 40 °C am Rotationsverdampfer entfernt. Mangan(III)-acetat-Dihydrat wurde gemäß Williams und Hunter (1976) dargestellt. Die NMR-Messungen erfolgten bei 400 oder 500 MHz, wobei diese in CDCl<sub>3</sub> oder DMSO-d<sub>6</sub> an einem Varian Mercury 400 (Palo Alto, USA) oder an einem Bruker DRX 500 (Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen wurden. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte auf das Signal der verwendeten Lösungsmittel. Referenzen:  $\delta$  (ppm) = 7.26 für CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H-NMR) bzw. 77 (<sup>13</sup>C-NMR),  $\delta$  (ppm) = 2.5 für DMSO (<sup>1</sup>H-NMR) bzw. 39.43 (<sup>13</sup>C-NMR). Die Beschreibungen der Signale wurden wie folgt abgekürzt: br (verbreitert), s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), m (Multiplett). ATR-FTIR-Spektren wurden mit einem Tensor 27 Spektrometer der Firma Bruker (Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen. Proben wurden als Reinsubstanz eingeklemmt zwischen zwei Diamantplatten vermessen. Die GC-MS-Messungen erfolgten durch die Geräte HP 6890 GC System und HP Mass Selective Detector 5973, wobei die Proben in Ethylacetat gelöst vorlagen. Elementaranalysen wurden mittels eines CHNS-932 der Firma Leco angefertigt. Die verwendeten DC-Karten Alugram® Sil G/UV<sub>254</sub> wurden von der Firma Machery-Nagel (Düren, Deutschland) bezogen. Die Detektion mittels UV-Licht erfolgte bei 254 nm. Die Entwicklung mittels Färbereagenzien erfolgte mit *p*-Anisaldehyd-Lösung (5% *p*-Anisaldehyd in 90 ml Methanol, 10 ml Eisessig, 1 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) oder Molybdatophosphorsäure-Tauchlösung (10% Lösung in Ethanol). UV-VIS-Absorptionsmessungen wurden an einem UV-2401PC von Shimadzu (Duisburg, Deutschland) durchgeführt. Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem LS55 Spectrometer von PerkinElmer (Waltham, USA) bei Raumtemperatur aufgenommen. ESI-MS-Messungen wurden an einem Finnigan LCQ Advantage MAX (Thermo Electron Corporation, San Jose, USA) durchgeführt. Es wurde ein Bereich von 150-2000 m/z vermessen. Hochaufgelöste Massenspektren (HR-MS) wurden an einem LTQ Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen. Die

Messung von MALDI-Massenspektren erfolgten mit einem Voyager-DE Pro MALDI-Massenspektrometer von Perseptive Biosystems (Weiterstadt) oder mit einem Bruker autoflex (Rheinstetten, Deutschland). Bei Messungen mit dem Voyager-DE Pro wurde 9-Amino-Acridin als Matrix verwendet ( $15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  in Methanol), welche aus dem käuflich erworbenen Hydrochlorid dargestellt wurde (Shroff *et. al.*, 2007). Es wurde  $1 \mu\text{l}$  der Matrix auf den Probeneller pipettiert und in der Folge mit  $1 \mu\text{l}$  der zu analysierenden Lösung vermischt. Nun wurde gewartet, bis sich sichtbare Kristalle gebildet hatten. Die Messungen wurden mit folgenden Einstellungen vorgenommen: *linear operation mode, negative polarity, 15 000 V accelerating voltage, 82% grid voltage, 0.05% guide wire, 110 nsec extraction delay time, 20 Hz laser repetition rate* und *low mass gate: off*. Bei Messungen mit einem Bruker autoflex wurde DHB (gesättigte Lösung in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA) als Matrix verwendet.

## 2.4.2 Synthetisierte Verbindungen

2.4.2.1 Synthese von *N,N*-Diethyl-2-methoxybenzamid (V9)

Zu einer Lösung aus 2-Methoxybenzoesäure (5 g, 1 Äq., 32.5 mmol) in Thionylchlorid (33.8 ml, 14.2 Äq., 463 mmol) wurde unter Rühren tropfenweise DMF (85  $\mu\text{l}$ , 0.03 Äq., 1.1 mmol) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde gerührt, wobei das Thionylchlorid nach 30 min zur Hälfte unter reduziertem Druck entfernt wurde. Es wurde Toluol (25 ml) hinzugefügt und die Lösung im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Daraufhin wurden weitere 25 ml Toluol hinzugefügt und der Prozess des Einengens zweimal wiederholt. Das resultierende Acylchlorid wurde in THF (40 ml) gelöst, die Lösung in einem Eisbad gekühlt und langsam mit Diethylamin (12.5 ml, 3.7 Äq., 120 mmol) versetzt. Die Lösung wurde für 10 min gerührt und in der Folge das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst, zunächst mit Wasser, dann mit gesättigter  $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$  gewaschen und im Vakuum eingengt. Verbindung (V9) wurde säulenchromatographisch (1:1 Petrolether/Ethylacetat) aufgereinigt, wobei ein strohfarbener Feststoff resultierte (78%, 5.3 g, 25.4 mmol).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{ppm}}$  = 7.3 (ddd,  $J$  = 8.3, 7.5, 1.8 Hz, 1.0H), 7.2 (dd,  $J$  = 7.4, 1.7 Hz, 0.9H), 7.0 (dt,  $J$  = 7.5, 1.0 Hz, 1.0H), 6.9 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 0.9H), 3.8 (s, 3H), 3.6 (s, 1.9H), 3.1 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 1.9H), 1.0 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H), 1.2 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H)

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{ppm}}$  = 168.9, 155.2, 129.9, 127.4, 126.7, 120.7, 111.0, 55.5, 42.8, 38.9, 13.9, 12.8

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_2$  (207.13  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ): ber. C 69.54, H 8.27, N 6.76; gef. C 69.1, H 8.2, N 6.6

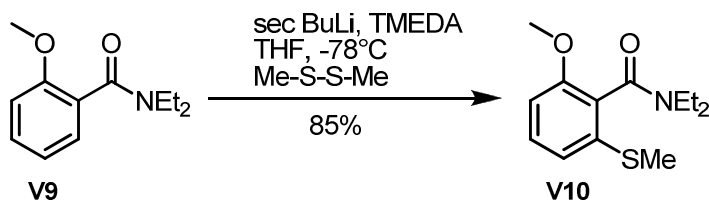
$R_f$  (Cyclohexan, Ethylacetat 1:1): 0.4

ATR-FTIR: 1620  $\text{cm}^{-1}$ , 1598  $\text{cm}^{-1}$ , 1431  $\text{cm}^{-1}$ , 1242  $\text{cm}^{-1}$

ESI-MS: gemessen 208.1 m/z; berechnet für  $[\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_2]^{1+}$  208.1 m/z

HR-ESI-MS: gemessen 208.13317 m/z; berechnet für  $[\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_2]^{1+}$  208.13321 m/z



2.4.2.2 *N,N*-Diethyl-2-methylsulfanyl-6-methoxybenzamid (**V10**)

*N,N*-Diethyl-2-methylsulfanyl-6-methoxybenzamid (1 g, 4.8 mmol, 1 Äq.) wurde unter Rühren bei  $-78^\circ\text{C}$  zu einer Lösung aus TMEDA (0.8 ml, 5.3 mmol, 1.1 Äq.), *sec*-BuLi (5.3 mmol, 1.1 Äq.) in THF (15 ml) zugegeben. Nach 30 min wurde Dimethyldisulfid (0.9 ml, 9.8 mmol, 2 Äq.) in THF (5 ml) bei  $-78^\circ\text{C}$  hinzugeführt und die Temperatur der Reaktionslösung für 15 min konstant gehalten. Nach langsamem Aufwärmen wurde die Reaktionslösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde mittels Rotationsverdampfer entfernt, der resultierende Niederschlag mit einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und die Suspension mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde mittels gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (1:1 Ethylacetat/Cyclohexan) aufgereinigt, wobei Verbindung (**V10**) in Form farbloser Nadeln auskristallisierte (85%, 1.0 g, 4.0 mmol).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{ppm}} = 7.2\text{--}7.3$  (m, 1.0H), 6.9 (dd,  $J = 8.0, 0.7$  Hz, 0.9H), 6.7 (dd,  $J = 8.3, 0.6$  Hz, 1.0H), 3.8 (s, 3H), 3.8 (m, 1H), 3.4 (qd,  $J = 14.2, 7.11$  Hz, 0.9H), 3.1 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.4 (s, 3H), 1.3 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.0 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H)

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{ppm}} = 166.9, 155.5, 136.5, 129.7, 125.8, 119.3, 108.2, 55.7, 42.7, 38.9, 16.4, 13.7, 12.5$

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{S}$  (253.36  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ): ber. C 61.63, H 7.56, N 5.53; gef. C 61.7, H 7.7, N 5.5

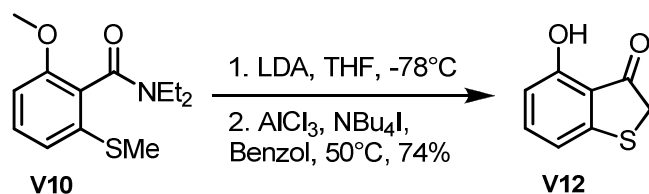
$R_f$  (Cyclohexan, Ethylacetat 1:1): 0.3

ATR-FTIR:  $1618\text{ cm}^{-1}, 1572\text{ cm}^{-1}, 1421\text{ cm}^{-1}, 1258\text{ cm}^{-1}$

ESI-MS: gemessen 254.0 m/z; berechnet für  $[\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}_2\text{S}]^{1+}$  254.1 m/z

HR-ESI-MS: gemessen 254.12083 m/z; berechnet für  $[\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}_2\text{S}]^{1+}$  254.12093 m/z

## 2.4.2.3 2,3-Dihydro-4-hydroxybenzo[b]thiophen-3-on (V12)



Zu einer Lösung aus *n*-BuLi (14.9 mmol, 1.5 Äq.) in THF (50 ml) wurde bei  $-78^\circ\text{C}$  Diisopropylamin (3.5 ml, 24.7 mmol, 1.5 Äq.) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde auf  $-30^\circ\text{C}$  erwärmt und eine Stunde gerührt. In der Folge wurde die Temperatur wieder auf  $-78^\circ\text{C}$  gesenkt und *N,N*-Diethyl-2-methylsulfonyl-6-methoxybenzamid (V10) (2.5 g, 9.9 mmol, 1 Äq.) in 6 ml THF tropfenweise zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 30 min gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 2 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, wobei ein gelber Niederschlag resultierte, welcher in trockenen Benzol (100 ml) gelöst wurde. Aluminiumchlorid (7.9 g, 59.4 mmol, 6 Äq.) und Tetrabutylammoniumiodid (11.0 g, 29.7 mmol, 3 Äq.) wurden unter Argon zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für weitere 90 min bei  $50^\circ\text{C}$  gerührt, danach mittels eines Eisbads gekühlt und langsam mit Wasser und Salzsäure versetzt. Die resultierende Suspension wurde mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde zunächst mit Wasser, dann mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (1:30 Ethylacetat/Cyclohexan) aufgereinigt, wobei Verbindung (V12) als gelblicher Feststoff (74%, 1.2 g, 7.3 mmol) vorlag.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{ppm}} = 9.8$  (s, 1.0H), 7.43 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1.0H), 6.9 (dd,  $J = 7.8, 0.6$  Hz, 0.9H), 6.6 (dd,  $J = 8.2, 0.6$  Hz, 0.9H), 3.9 (s, 2H)

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{ppm}} = 203.4, 160.3, 153.8, 138.5, 117.0, 115.1, 111.5, 39.5$

$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2\text{S}$  (166.20  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ): ber. C 57.81, H 3.64; gef. C 57.8, H 3.7

$R_f$  (Cyclohexan, Ethylacetat 1:1): 0.7

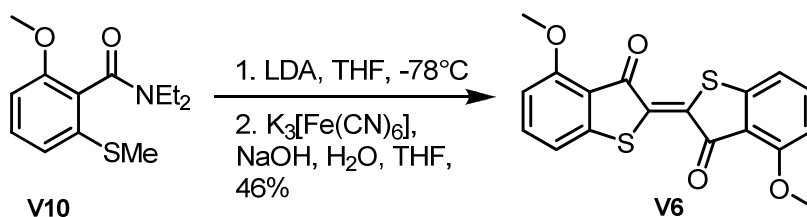
ATR-FTIR:  $3310\text{ cm}^{-1}, 1657\text{ cm}^{-1}, 1601\text{ cm}^{-1}, 1578\text{ cm}^{-1}, 1454\text{ cm}^{-1}, 1289\text{ cm}^{-1}, 1205\text{ cm}^{-1}$

ESI-MS: gemessen 165.07 m/z; berechnet für  $[\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_2\text{S}]^{-1}$  165.0 m/z

HR-ESI-MS: gemessen 165.00184 m/z; berechnet für  $[\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_2\text{S}]^{-1}$  165.00102 m/z

MS (EI): 166 (100%)  $[\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2\text{S}]^+$

## 2.4.2.4 4,4'-Dimethoxythioindigo (V6)



Zu einer Lösung aus *n*-BuLi (5.9 mmol, 1.5 Äq.) in THF (20 ml) wurde bei -78 °C Diisopropylamin (1.4 ml, 9.8 mmol, 2.5 Äq.) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde auf -30 °C erwärmt und eine Stunde gerührt. In der Folge wurde die Temperatur wieder auf -78 °C gesenkt und *N,N*-Diethyl-2-methylsulfanyl-6-methoxybenzamid (**V10**) (1 g, 3.9 mmol, 1 Äq.) in 3 ml THF tropfenweise zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 30 min gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 2 h gerührt. Dann wurden 3 ml 1 M NaOH<sub>(aq)</sub>, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>3</sub>] (3.9 g, 11.7 mmol, 3 Äq.) und 20 ml Wasser hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der resultierende rote Niederschlag wurde abfiltriert, zunächst mit Wasser, dann mit Cyclohexan gewaschen. Nach Umkristallisieren aus Nitrobenzol ergab sich Verbindung (**V6**) als roter Feststoff (46%, 0.316 g, 0.9 mmol).

**C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>** (356.42 g·mol<sup>-1</sup>): ber. C 60.66, H 3.39; gef. C 60.6, H 3.2

**HR-ESI-MS**: gemessen 357.02498 m/z; berechnet für [C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 357.02509 m/z

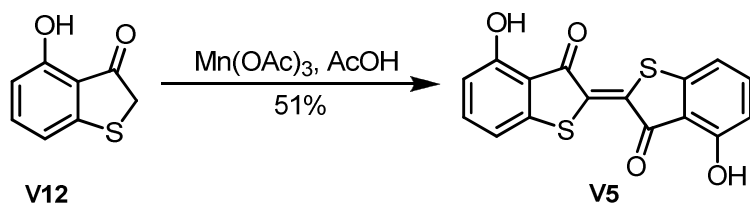
**ATR-FTIR**: 1643 cm<sup>-1</sup>, 1573 cm<sup>-1</sup>, 1472 cm<sup>-1</sup>, 1285 cm<sup>-1</sup>, 1224 cm<sup>-1</sup>

**UV-VIS**: λ<sub>max</sub> (lg ε) = 304 nm (4.08), 366 (3.59), 543.0 (4.32) [DMF]

λ<sub>max</sub> (lg ε) = 303 nm (4.11), 370 (3.65), 548 (4.37) [DMSO]

λ<sub>max</sub> (lg ε) = 303 nm (4.13), 366 (3.66), 550.0 (4.39) [CHCl<sub>3</sub>]

## 2.4.2.5 4,4'-Dihydroxythioindigo (V5)



2,3-Dihydro-4-hydroxybenzo[b]thiophen-3-on (**V12**) (330 mg, 1 Äq., 2 mmol) wurde in Essigsäure (45 ml) gelöst und Mn(OAc)<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O (980 g, 1.6 Äq., 3.2 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt und in der Folge 100 ml Wasser hinzugefügt. Der resultierende Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser, Essigsäure, 1M HCl<sub>(aq)</sub>, Methanol und Hexan gewaschen. Nach Umkristallisieren aus Xylol ergab sich Verbindung (**V5**) als dunkellila Feststoff (51%, 169 mg, 0.51 mmol).

**M<sub>w</sub>** (C<sub>16</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>) (328.36 g·mol<sup>-1</sup>): ber. C 58.52 , H 2.46; gef. C 58.3, H 2.6

**ATR-FTIR**: 3273 cm<sup>-1</sup>, 1662 cm<sup>-1</sup>, 1607 cm<sup>-1</sup>, 1583 cm<sup>-1</sup>, 1467 cm<sup>-1</sup>, 1291 cm<sup>-1</sup>, 1220 cm<sup>-1</sup>

**HR-ESI-MS**: gemessen 326.97803 m/z; berechnet für [C<sub>16</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>]<sup>-1</sup> 326.97853 m/z

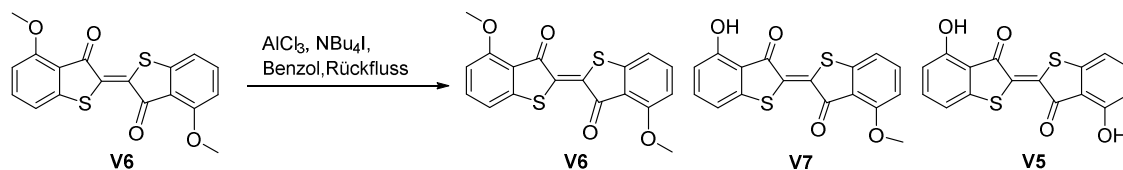
**MALDI-MS (9-AA)**: gemessen 327 m/z; berechnet für [C<sub>16</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>]<sup>-1</sup> 327.0 m/z

**UV-VIS**: λ<sub>max</sub> (lg ε) = 303 nm (4.05), 365 (3.67), 554 (4.01) [DMF]

λ<sub>max</sub> (lg ε) = 303 nm (4.06), 362 (3.65), 556 (4.05) [DMSO]

λ<sub>max</sub> (lg ε) = 313 nm (3.98), 378 (3.55), 578 (4.01) [CHCl<sub>3</sub>]

## 2.4.2.6 4-Methoxy-4'-hydroxythioindigo (V7)



4,4'-Dimethoxythioindigo (13 mg, 1 Äq., 0.04 mmol) wurde in Benzol (10 ml) gegeben und die resultierende Suspension unter Rückfluss erwärmt, bis sich der Farbstoff komplett gelöst hatte. Aluminiumchlorid (20 mg, 0.15 mmol, 3.8 Äq.) wurde hinzugegeben, für 15 min gerührt und Tetrabutylammoniumiodid (20 mg, 0.05 mmol, 1.3 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für weitere 15 min unter Rückfluss gerührt, dann langsam mit Wasser und HCl(aq) versetzt und die resultierende Suspension mit Chloroform extrahiert. Einengen der organischen Phase im Vakuum lieferte eine Mischung aus (V5), (V6) und (V7). Analytische Menge von (V7) wurden durch Dünnschichtchromatographie (DC-Platten: 20 x 20 cm) mittels Toluol, 1% Ethanol als Laufmittel isoliert.

**HR-ESI-MS:** gemessen 343.00927  $m/z$ ; berechnet für [C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>]<sup>1+</sup> 343.00933  $m/z$

**MALDI-MS (DHB):** gemessen 343  $m/z$ ; berechnet für [C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>]<sup>1+</sup> 343.0  $m/z$

**R<sub>f</sub>** (Toluol, 1% Ethanol) 0.3

**UV-Vis:**  $\lambda_{\max}$  = 566 nm [CHCl<sub>3</sub>]

$\lambda_{\max}$  = 554 nm [DMSO]

### 2.4.3 Charakterisierung der Thioindigoderivate

#### 2.4.3.1 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Die Thioindigoderivate wurden in den jeweiligen Lösungsmitteln für mehrere Stunden bei 50-60 °C erhitzt. Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten erfolgte über das Lambert-Beersche-Gesetz.

#### 2.4.3.2 Analyse einer möglichen Photoisomerisierung

Zur Analyse einer möglichen Photoisomerisierung der Thioindigoderivate wurden Lösungen (0.1 mM) der verschiedenen Farbstoffe in DMSO, DMF, Chloroform und Ben-

zol hergestellt. Die Proben wurden mit einer Laborlampe (Kindermann, 15 Watt, PF713E) für 2 h oder mit einem Projektor (Perkeo projector, Zett, 150 W) mit einem Gelbfilter (gemessender transmission cut-off < 466 nm) für 20 min bestrahlt. Vor und nach Bestrahlung wurden UV-VIS-Spektren angefertigt (Schichtdicke der Küvette 0.1 cm).

#### 2.4.3.3 Charakterisierung der Thioindigoderivate mittels Fluoreszenzspektroskopie

Es wurden 0.04 mM Lösungen von 4,4'-Dimethoxythioindigo, 4,4'-Dihydroxythioindigo und kommerziell erworbenes Thioindigo in Chloroform, Benzol, DMSO und DMF angesetzt und vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 525 nm. Von den Fluoreszenzspektren der Proben wurden die des reinen Lösungsmittels abgezogen.

#### 2.4.3.4 Berechnung der Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden nach Gleichung (4) durch Vergleich mit Rhodamin B in Ethanol bestimmt.

$$\Theta = \Theta_s \cdot \frac{F \cdot I_s \cdot n^2}{F_s \cdot I \cdot n_s^2} \quad (4)$$

$\Theta$  Fluoreszenzquantenausbeute

$\Theta_s$  Fluoreszenzquantenausbeute des Standards (Rhodamin B; 0.49)

$F$  Fläche unter der Kurve der Probe

$F_s$  Fläche unter der Kurve des Standards

$I$  Absorption der Probe

$I_s$  Absorption des Standards

$n$  Brechungsindex des Lösungsmittels der Probe

$n_s$  Brechungsindex des Lösungsmittels des Standards (Ethanol: 1.3638)

Es wurde eine Konzentration von  $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  verwendet. Die Anregungswellenlänge betrug 525 nm. Von den Fluoreszenzspektren der Proben wurden die der reinen Lösungsmittel abgezogen.

## 2.5 Peptidchemische Methoden

### 2.5.1 Festphasensynthese von Peptiden

Die Boc-Festphasenpeptidsynthese wurde manuell in einer handelsüblichen Glasfritte (D3) nach dem *in situ* Neutralisations- und Aktivierungsprotokoll von Schnölzer *et al.* (1992) durchgeführt. HBTU wurde als Kopplungsreagenz eingesetzt (Abbildung 2.1).

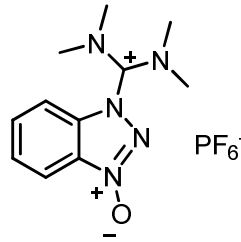


Abbildung 2.1: HBTU.

Tabelle 2.4 zeigt die verwendeten Aminosäuren. Die in den Klammern gezeigten Schutzgruppen beziehen sich auf die Seitenketten.

Tabelle 2.4: Eingesetzte Boc-geschützte Aminosäuren.

Aminosäure	Geschützte Aminosäure	Aminosäure	Geschützte Aminosäure
Ala	Boc-Ala-OH	Lys	Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH
Arg	Boc-Arg(Tos)-OH	Met	Boc-Met-OH
Asn	Boc-Asn(Xan)-OH	Phe	Boc-Phe-OH
Asp	Boc-Asp(OcHx)-OH	Pro	Boc-Pro-OH
Cys	Boc-Cys(Trt)-OH	Ser	Boc-Ser(Bzl)-OH
Gln	Boc-Gln-OH	Thr	Boc-Thr(Bzl)-OH
Glu	Boc-Glu(OcHx)-OH	Trp	Nicht verwendet
Gly	Boc-Gly-OH	Tyr	Boc-Tyr(2-Br-Z)-OH
His	Boc-His(3-Bom)-OH	Val	Boc-Val-OH
Ile	Boc-Ile-OH · 0.5 H <sub>2</sub> O	D-Ala	Boc-D-Ala-OH
Leu	Boc-Leu-OH · H <sub>2</sub> O	Thz	Boc-Thz-OH

Die manuell durchgeführte Synthese wurde in einer Glasfritte mit angeschlossener Pumpe im 0.2 mmol Maßstab (0.2 mmol, 1 Äq.) durchgeführt, wobei für jede Kopplung

ein zehnfacher Überschuss an Aminosäure eingesetzt wurde (2 mmol, 10 Äq.). Die zu synthetisierenden Peptide wurden nach der jeweiligen Sequenz vom C-Terminus zum N-Terminus nach folgendem Schema an das Harz gekoppelt:

Es wurde entweder Boc-L-Arg-(Tos)-Pam Harz, Boc-L-His(3-Bom)-Pam Harz oder Boc-L-Leu-Pam Harz (0.2 mmol, 1 Äq.) in einer Glasfritte vorgelegt und 2 h in DMF gequollen. Zu 2 mmol (10 Äq.) der entsprechenden geschützten Aminosäure wurden 3.8 ml einer 0.5 M HBTU Lösung (1.9 mmol, 9.8 Äq. HBTU) gegeben. Die Boc-Schutzgruppe wurde abgespalten, indem das Harz zweimal mit je 2 ml TFA versetzt, dies direkt wieder abgesaugt und dann das Harz zweimal für je 1 min mit etwa 3 ml TFA umgesetzt wurde. Gleichzeitig wurde die Aminosäure-HBTU-Lösung mit 1 ml DIPEA versetzt. Nachdem die TFA abgesaugt worden war, wurde das Harz 1 min mit DMF gewaschen und mit 1 ml der mit DIPEA versetzten Aminosäure-HBTU-Lösung umgesetzt. Diese wurde sofort danach wieder aus der Fritte abgesaugt. Nachdem der Rest (etwa 3.8 ml) hinzugefügt wurde, wurde der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde das Harz 1 min mit DMF gewaschen. Nun wurden 3.8 ml einer 0.5 M HBTU Lösung zu 2 mmol der nächsten geschützten Aminosäure gegeben und die in der Sequenz folgende Aminosäure an das Harz gekoppelt.

Bei der Durchführung einer Doppelkopplung wurde nach der Umsetzung des Harzes mit 2 mmol der geschützten Aminosäure nicht mit dem Waschen mit DMF und der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe fortgesetzt, sondern die Lösung abgesaugt und das Harz noch einmal mit 2 mmol aktivierter Aminosäure umgesetzt. Nach der fünfzehnminütigen Reaktion wurde dem Schema gemäß fortgefahren. Bei den Aminosäuren Thr und Arg wurde stets so vorgegangen. Nach der Kopplung von Gln und Asn wurde vor und nach der Entschützung der Boc-Schutzgruppe dieser Aminosäure zusätzlich 1 min mit DCM gewaschen. Nach Abschluss der Synthese wurde die Boc-Schutzgruppe der letzten Aminosäure gemäß obiger Vorschrift abgespalten, das Harz mit DCM gewaschen und danach über Nacht im Exikator getrocknet.

### 2.5.2 Darstellung der Leucin-Thioester

Die Leucin-Thioester wurden an einem Boc-L-Leu-Pam Harz nach einem modifizierten Protokoll nach Hackeng *et. al.* (1999) dargestellt.



### 2.5.3 Darstellung der Arginin-Tag-Thioester

Die Arginin-Tag-Thioester wurden an einem Boc-L-Arg-(Tos)-Pam Harz dargestellt, wobei 5 weitere Arginine mittels Doppelkopplungen an das Harz gekoppelt wurden. In der Folge wurde die N-terminale Boc-Schutzgruppe mittels TFA entfernt und der Peptid- $\alpha$ -COSCH<sub>2</sub>COArg<sub>6</sub> Thioester gemäß einem modifizierten Protokoll nach Johnson und Kent (2007) generiert.

### 2.5.4 Abspaltung der Peptide vom Harz

Zunächst wurde pro mg getrocknetes Harz ein  $\mu$ l flüssiges *p*-Kresol zugefügt. Danach wurde das Peptid mit 2 ml (im Falle einer Testabspaltung) oder mit 10 ml flüssigem HF für eine Stunde bei 0 °C vom Harz abgespalten. Das HF wurde im Vakuum entfernt, das Peptid mit Diethylether gefällt und gewaschen. Der resultierende Niederschlag wurde in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA versetzt, das Harz abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert. Im Falle einer Testabspaltung wurde das mit Diethylether gefällte Peptid in 300  $\mu$ l 70% Acetonitril, 30% Wasser, 0.1% TFA gelöst und in der Folge direkt mittels analytischer HPLC und ESI-MS analysiert.

### 2.5.5 Kaiser-Test

Der Kaiser-Test diente zum Nachweis von freien Aminogruppen und wurde in dieser Arbeit nach Sarin *et al.* (1981) durchgeführt.

### 2.5.6 Chloroform-Methanol-Fällung

Die Chloroform-Methanol-Fällung erfolgte nach Wessel und Flügge (1984).

## 2.5.7 Synthetisierte Peptide

### 2.5.7.1 Synthese und Aufreinigung von AVQEA-SL

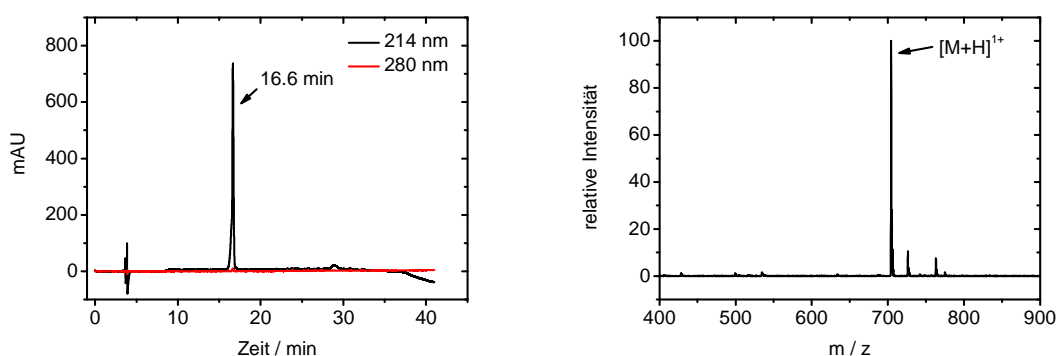
H-AVQEA-SL-OH

$M = 703.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Die manuelle Festphasensynthese von AVQEA-SL (**P1**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt (139 mg) wurde mittels HPLC mit einer C18-Säule (250 x 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) und einem Gradienten von 25% B zu 45% B in 40 min aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 46.4 mg ( $6.6\cdot 10^{-2}$  mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf den Syntheseansatz (0.2 mmol) einer Ausbeute von 33% entspricht. Abbildung 2.2 zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C18-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt.

**ESI-MS:**      Theoretisch  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  704.8;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  726.8

                  Gemessen  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  704.5;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  726.3



**Abbildung 2.2:** Analytisches HPLC-Chromatogramm (Gradient 1 und Eluentensystem 1) und ESI-MS von aufgereinigtem AVQEA-SL (**P1**).

## 2.5.7.2 Synthese und Aufreinigung von CVSAIL

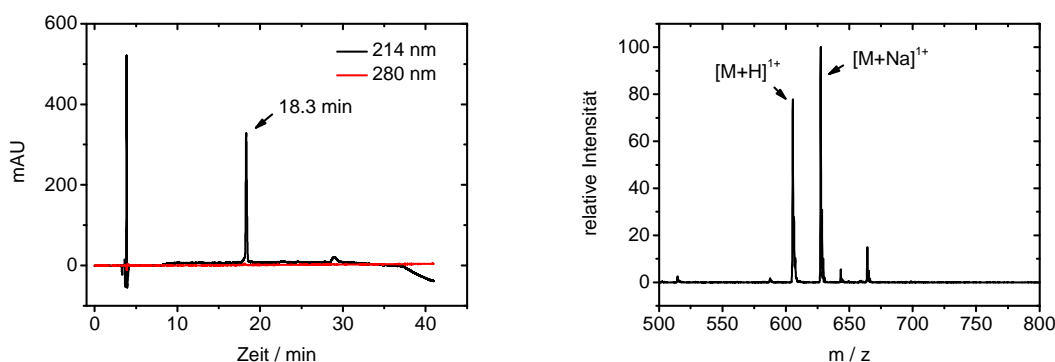
H-CVSAIL-OH

 $M = 604.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Die manuelle Festphasensynthese von CVSAIL (**P2**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt (102 mg) wurde mittels HPLC mit einer C18-Säule (250 x 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) und einem Gradienten von 5% B zu 65% B aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 65 mg ( $0.11 \cdot 10^{-3}$  mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf den Syntheseansatz (0.2 mmol) einer Ausbeute von 55% entspricht. Abbildung 2.3 zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C18-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt.

**ESI-MS:** Theoretisch  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  605.8;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  627.8

Gemessen  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  605.5;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  627.5



**Abbildung 2.3:** Analytisches HPLC-Chromatogramm (Gradient 1 und Eluentensystem 1) und ESI-MS von aufgereinigtem CVSAIL (**P2**).

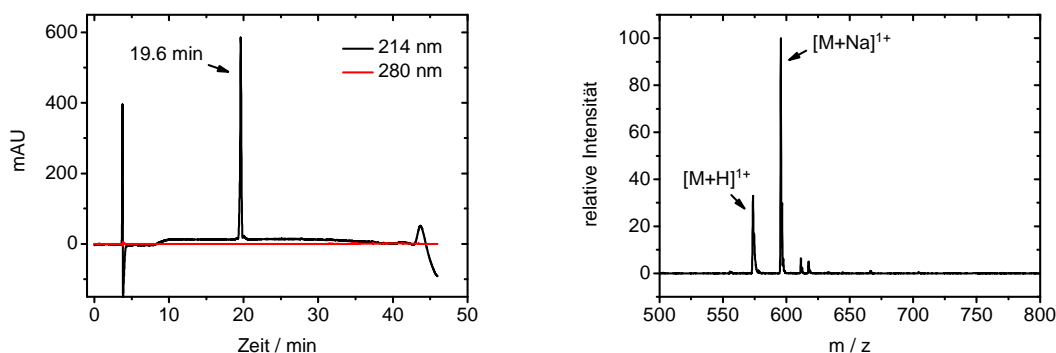
## 2.5.7.3 Synthese und Aufreinigung von AVSAIL

H-AVSAIL-OH

 $M = 572.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Die manuelle Festphasensynthese von AVSAIL (**P7**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt (71.8 mg) wurde mittels HPLC mit einer C18-Säule (250 x 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) und einem Gradienten von 5% B zu 45% B in 80 min aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 46.3 mg (0.08 mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf den Syntheseansatz (0.2 mmol) einer Ausbeute von 40% entspricht. Abbildung 2.4 zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C18-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt.

**ESI-MS:**      Theoretisch  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  573.7;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  595.7  
                  Gemessen  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  573.7;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  595.7



**Abbildung 2.4:** Analytisches HPLC-Chromatogramm (Gradient 1 und Eluentensystem 1) und ESI-MS von aufgereinigtem AVSAIL (**P7**).

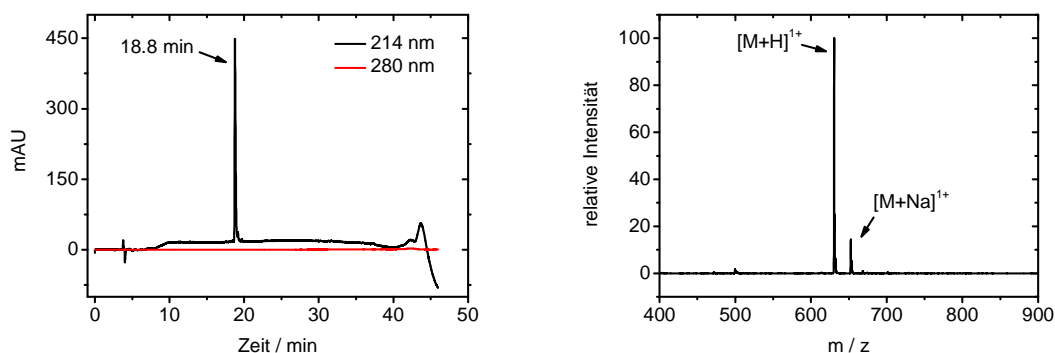
## 2.5.7.4 Synthese und Aufreinigung von KVSAIL

H-KVSAIL-OH

 $M = 629.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Die manuelle Festphasensynthese von KVSAIL (**P6**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt (113.3 mg) wurde mittels HPLC mit einer C18-Säule (250 x 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) und einem Gradienten von 5% B zu 45% B in 80 min aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 75.5 mg (0.12 mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf den Syntheseansatz (0.2 mmol) einer Ausbeute von 60% entspricht. Abbildung 2.5 zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C18-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt.

**ESI-MS:**      Theoretisch  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  630.8;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  652.8  
                    Gemessen  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  630.7;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  652.3



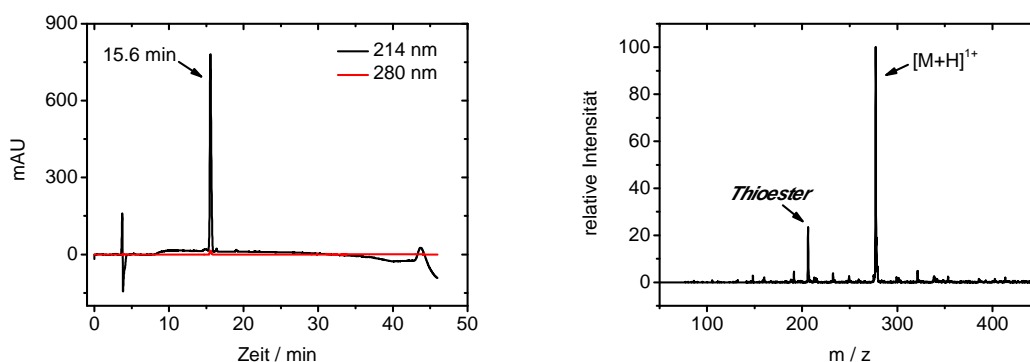
**Abbildung 2.5:** Analytisches HPLC-Chromatogramm (Gradient 1 und Eluentensystem 1) und ESI-MS von aufgereinigtem KVSAIL (**P6**).

## 2.5.7.5 Synthese und Aufreinigung von A-SL

H-A-SL-OH

 $M = 276.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Die manuelle Festphasensynthese von A-SL (**P11**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt (28.2 mg) wurde mittels HPLC mit einer C18-Säule (250 x 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) und einem Gradienten von 5% B zu 65% B in 60 min aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 12.7 mg ( $4.6\cdot 10^{-2}$  mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf den Syntheseansatz (0.2 mmol) einer Ausbeute von 23% entspricht. Abbildung 2.6 zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C18-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt.

ESI-MS: Theoretisch  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  227.4Gemessen  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  277.3

**Abbildung 2.6:** Analytisches HPLC-Chromatogramm (Gradient 1 und Eluentensystem 1) und ESI-MS von aufgereinigtem A-SL (**P11**).

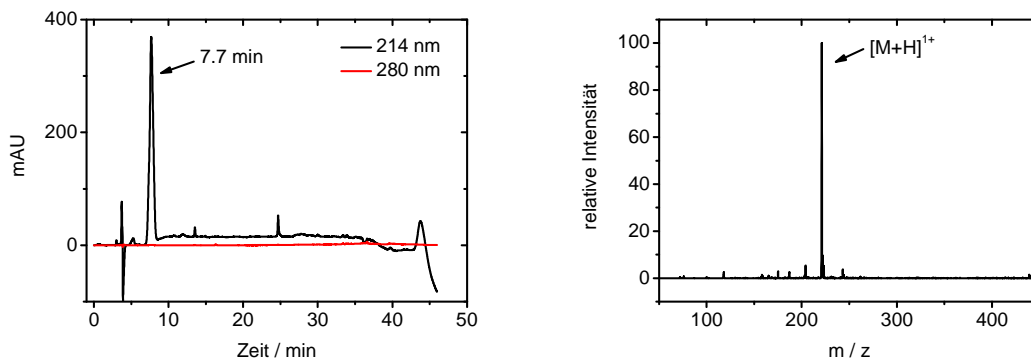
## 2.5.7.6 Synthese und Aufreinigung von CV

H-CV-OH

 $M = 220.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Die manuelle Festphasensynthese von CV (**P12**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt (36.8 mg) wurde mittels HPLC mit einer C18-Säule (250 x 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) und einem Gradienten von 5% B zu 75% B in 80 min aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 16.3 mg ( $7.4\cdot 10^{-2}$  mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf den Syntheseansatz (0.4 mmol) einer Ausbeute von 18.5% entspricht. Abbildung 2.7 zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C18-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt.

**ESI-MS:**      Theoretisch  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  221.3  
                    Gemessen  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  221.1



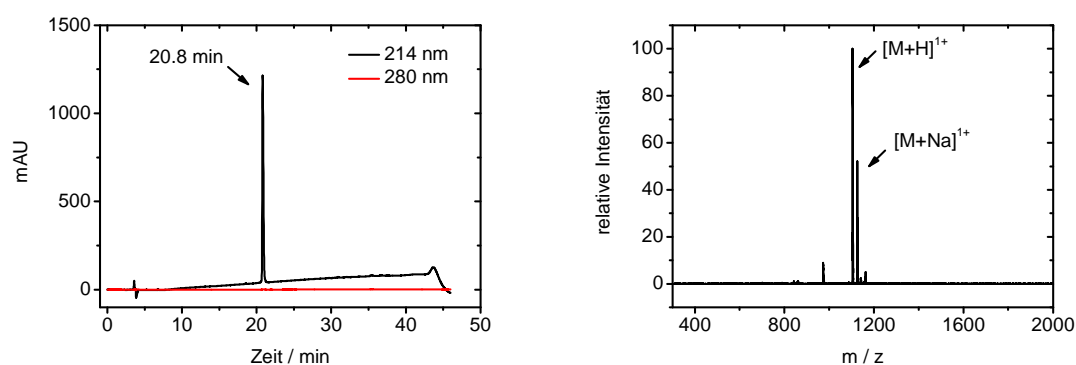
**Abbildung 2.7:** Analytisches HPLC-Chromatogramm (Gradient 1 und Eluentensystem 1) und ESI-MS von aufgereinigtem CV (**P12**).

## 2.5.7.7 Synthese und Aufreinigung von AVQEACVSAIL

H-AVQEACVSAIL-OH

 $M = 1103.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Die manuelle Festphasensynthese von AVQEACVSAIL (**P3**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Es ergaben sich insgesamt 135 mg Rohprodukt. Das Rohprodukt (61.2 mg) wurde in 33% (v/v) TFA, 66% (v/v) 6 M Gdn·HCl, 50 mM NaPi gelöst und mittels HPLC mit einer C18-Säule (250 x 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) und einem Gradienten von 10% B zu 80% B in 80 min aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 17.9 mg (0.016 mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf das eingesetzte Rohprodukt ( $\sim 0.09$  mmol) einer Ausbeute von 17.7% entspricht. Abbildung 2.8 zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C18-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt.

**ESI-MS:** Theoretisch  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  1104.3;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  1126.3Gemessen  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  1104.2;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  1125.9

**Abbildung 2.8:** Analytisches HPLC-Chromatogramm (Gradient 1 und Eluentensystem 1) und ESI-MS von aufgereinigtem AVQEACVSAIL (**P3**).

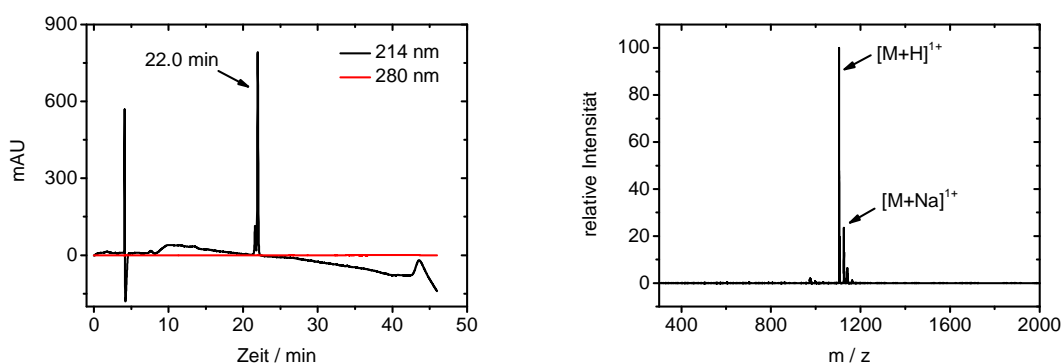


## 2.5.7.8 Synthese und Aufreinigung von AVQEaCVSAIL

H-AVQEaCVSAIL-OH

 $M = 1103.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Die manuelle Festphasensynthese von AVQEaCVSAIL (**P15**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Es ergaben sich 120.3 mg Rohprodukt. Das Rohprodukt (30.0 mg) wurde in 33% (v/v) TFA, 66% (v/v) 6 M Gdn·HCl, 50 mM NaPi gelöst und mittels HPLC mit einer C18-Säule (250 x 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) und einem Gradienten von 10% B zu 80% B in 80 min aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 15.7 mg (0.014 mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf das eingesetzte Rohprodukt ( $\sim 0.05$  mmol) einer Ausbeute von 28% entspricht. Abbildung 2.9 zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C18-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt.

ESI-MS: Theoretisch  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  1104.3;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  1126.3Gemessen  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  1104.2;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  1125.9

**Abbildung 2.9:** Analytisches HPLC-Chromatogramm (Gradient 1 und Eluentensystem 1) und ESI-MS von aufgereinigtem AVQEaCVSAIL (**P15**).

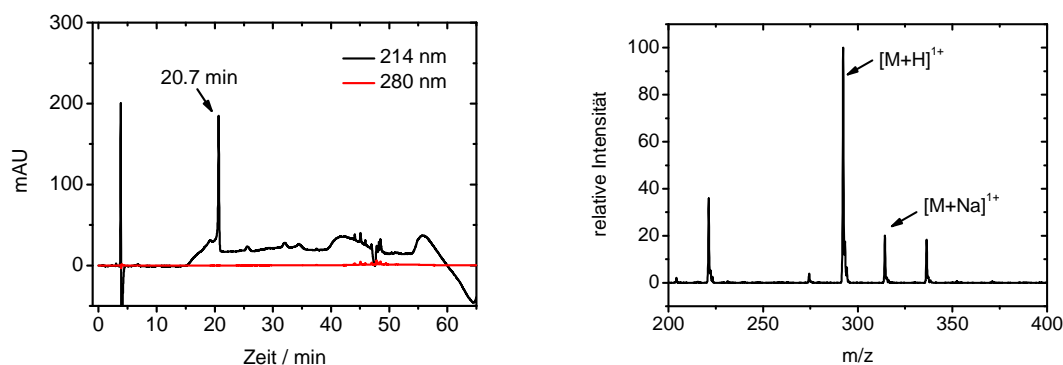
## 2.5.7.9 Synthese und Aufreinigung von ACV

H-ACV-OH

 $M = 291.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Die manuelle Festphasensynthese von ACV (**P13**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt (30.4 mg) wurde mittels HPLC mit einer C18-Säule (250 x 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) und einem Gradienten von 5% B zu 65% B aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 11.8 mg ( $4.0\cdot 10^{-2}$  mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf den Syntheseansatz (0.2 mmol) einer Ausbeute von 20.2% entspricht. Abbildung 2.10 zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C18-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt.

**ESI-MS:** Theoretisch  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  292.4;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  314.4  
Gemessen  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  292.3;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  314.3



**Abbildung 2.10:** Analytisches HPLC-Chromatogramm (Gradient 6 und Eluentensystem 1) und ESI-MS von aufgereinigtem ACV (**P13**).

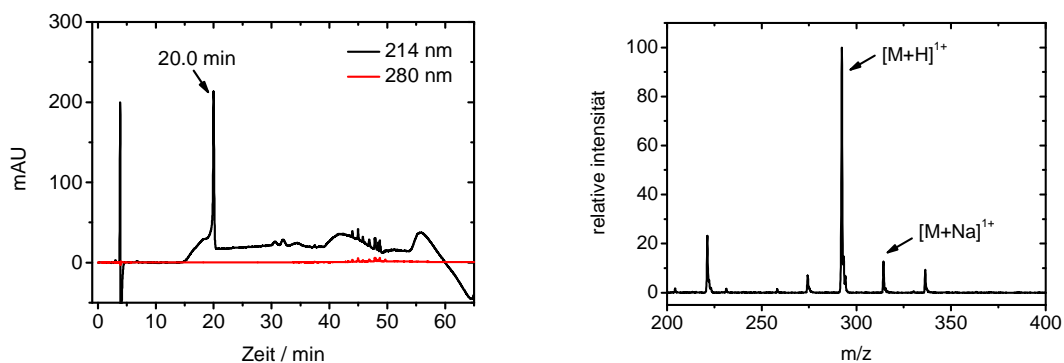
## 2.5.7.10 Synthese und Aufreinigung von aCV

H-aCV-OH

 $M = 291.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Die manuelle Festphasensynthese von aCV (**P14**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt (29.6 mg) wurde mittels HPLC mit einer C18-Säule (250 x 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) und einem Gradienten von 5% B zu 65% B in 60 min aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 11.7 mg ( $4.0\cdot 10^{-2}$  mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf den Syntheseansatz (0.2 mmol), einer Ausbeute von 20.1% entspricht. Abbildung 2.11 zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C18-Säule (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt.

**ESI-MS:**      Theoretisch  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  292.4;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  314.4  
                    Gemessen  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  292.3;  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  314.3



**Abbildung 2.11:** Analytisches HPLC-Chromatogramm (Gradient 6 und Eluentensystem 1) und ESI-MS von aufgereinigtem aCV (**P14**).

#### 2.5.7.11 Synthese und Aufreinigung von *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub>

H-CVSAILGLIILLGINLGLVAATLGGDTAASLSTLAAKASRMGDGDL DVELETRREH  
HHHHH-OH

M = 6349.2 g·mol<sup>-1</sup>

Die manuelle Festphasensynthese von *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> (**P18**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten. Um eine Nebenreaktion des N-terminalen Cysteins mit Formaldehyd, welches bei der HF-Abspaltung durch Entschützung der 3-Bom-Schutzgruppe des Histidins gebildet wurde, zu vermeiden, wurden entweder zur Abspaltung 30 Äquivalente Methoxyaminhydrochlorid hinzugegeben oder das Peptid vor der HPLC-Aufreinigung mit 6 M Gdn-HCl, 0.05% DDM, 50 mM NaPi, 200 mM Methoxyaminhydrochlorid, pH 4 versetzt und 18 h bei Raumtemperatur inkubiert (Kallen, 1971; Bang und Kent, 2005; Taichi *et. al.*, 2009). Das Rohprodukt (402 mg) wurde mittels HPLC mit einer Diphenyl-Säule (250 x 22 mm, 10 µm) und einem Gradienten von 40% B zu 80% B in 80 min aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 19 mg (3·10<sup>-3</sup> mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf den Syntheseansatz (0.2 mmol) einer Ausbeute von 1.5% entspricht. Abbildung 3.35 (a) zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und Abbildung 3.35 (b) das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer Diphenyl-Säule (250 x 4.6 mm, 5 µm) durchgeführt.

**ESI-MS:** Theoretisch [M+4H]<sup>4+</sup> 1588.3; [M+5H]<sup>5+</sup> 1270.8; [M+6H]<sup>6+</sup> 1059.2

Gemessen [M+4H]<sup>4+</sup> 1588.1; [M+5H]<sup>5+</sup> 1270.9; [M+6H]<sup>6+</sup> 1059.1

Theoretisch M = 6349.2 g·mol<sup>-1</sup>

Gemessen M = 6348.6 g·mol<sup>-1</sup>

2.5.7.12 *Synthese und Aufreinigung von NpHtrII 47Thz-59-SLeu*

H-ThzAATGDAAAVQEA-SL-OH

M = 1376.4 g·mol<sup>-1</sup>

Die manuelle Festphasensynthese von *NpHtrII 47THz-59-SLeu* (**P17**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 und in Sadek (2011) beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt (160 mg) wurde mittels HPLC mit einer C4-Säule (250 x 22 mm, 5 µm) und einem Gradienten von 15% B zu 35% B in 60 min aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 48 mg ( $3.5 \cdot 10^{-2}$  mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf den Synthesansatz (0.2 mmol) einer Ausbeute von 17% entspricht. Abbildung 3.34 (a) zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und Abbildung 3.34 (b) das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C4-Säule (250 x 4.6 mm, 5 µm) durchgeführt.

**ESI-MS:**       Theoretisch [M+H]<sup>1+</sup> 1377.4; [M+Na]<sup>1+</sup> 1399.4  
                  Gemessen [M+H]<sup>1+</sup> 1376.9; [M+Na]<sup>1+</sup> 1398.7

2.5.7.13 Synthese und Aufreinigung von *NpHtrII* 1-46-*SArg*<sub>6</sub>

H-MSLNVSRLLLPSRVRHSYTGKMGAVFIFVGALTVLFGAIAAYGEVTA-SRRRRRR-OH

M = 5926.0 g·mol<sup>-1</sup>

Die manuelle Festphasensynthese von *NpHtrII* 1-46-*SArg*<sub>6</sub> (**P16**) erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Nach Abschluss der Synthese wurde das Peptid vom Harz abgespalten sowie das resultierende Rohprodukt in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gelöst und lyophilisiert. Das Rohprodukt (441 mg) wurde mittels HPLC mit einer C4-Säule (250 x 22 mm, 5 µm) und einem Gradienten von 30% B zu 70% B in 80 min aufgereinigt, wobei Eluentensystem 1 verwendet wurde. Es konnten 7.6 mg (1.3·10<sup>-3</sup> mmol) des Peptides isoliert werden, was bezogen auf den Syntheseansatz (0.2 mmol) einer Ausbeute von 0.7 % entspricht. Abbildung 3.33 (a) zeigt das resultierende analytische HPLC-Chromatogramm und das Abbildung 3.33 (b) das ESI-Massenspektrum desselben. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C4-Säule (125 x 4.6 mm, 5 µm) durchgeführt.

**ESI-MS:** Theoretisch [M+4H]<sup>4+</sup> 1482.5; [M+5H]<sup>5+</sup> 1186.2; [M+6H]<sup>6+</sup> 988.7

Gemessen [M+4H]<sup>4+</sup> 1482.7; [M+5H]<sup>5+</sup> 1186.7; [M+6H]<sup>6+</sup> 989.3

Theoretisch M = 5926.0 g·mol<sup>-1</sup>

Gemessen M = 5926.8 g·mol<sup>-1</sup>

## 2.5.8 Durchführung der Ligationsexperimente

### *2.5.8.1 Durchführung der Ligationsexperimente: AVQEA-SL und CVSAIL*

Die lyophilisierten Peptide wurden in den entsprechenden organischen Lösungsmitteln (DMF, NMP, DMSO oder TFE) gelöst, so dass sich nach Zugabe aller Komponenten eine Endkonzentration von etwa 3.5 mM ergab, was einer Massenkonzentration von etwa 2 mg·ml<sup>-1</sup> für jedes Peptid entsprach. Zu diesen Lösungen wurden Thioladditive hinzugegeben. Diese wurden entweder aus höher konzentrierten Stammlösungen hinzupipettiert oder bei hohen Konzentrationen (z. B. 300 mM Thiophenol) direkt hinzugefügt. Die Base Triethylamin wurde aus einer 0.1 M Stammlösung hinzugegeben. Die Reaktionstemperatur betrug Raumtemperatur, 40 °C, 50 °C oder 60 °C. Zur Verfolgung der Reaktion wurden 3 µl Aliquots abgenommen und die Reaktionen durch 20 µL einer 50%igen Lösung von Acetonitril in Wasser (0.1% TFA) beendet. Nach Reduktion möglicher Disulfidbrücken durch die Zugabe von TCEP wurden die Proben mittels HPLC analysiert.

### *2.5.8.2 Durchführung der Ligationsexperimente: A-SL und CV*

Die lyophilisierten Peptide wurden in DMF oder in DMF mit Zugabe von Lithiumchlorid (Endkonzentration 180 mM) gelöst, so dass sich nach Zugabe aller Komponenten eine Endkonzentration von etwa 2 mg·ml<sup>-1</sup> für jedes Peptid ergab. Zu diesen Lösungen wurden Thioladditive hinzugegeben. Diese wurde entweder aus höher konzentrierten Stammlösungen hinzupipettiert oder bei hohen Konzentrationen (z. B. 300 mM Thiophenol) direkt hinzugefügt. Die Base Triethylamin wurde aus einer 100 mM Stammlösung hinzugegeben. Die Reaktionstemperatur betrug 40 °C. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Wasser (0.1% TFA) abgebrochen und das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Zugabe einer 50%igen Lösung von Acetonitril in Wasser (0.1% TFA) und Zugabe von TCEP wurden die Proben mittels HPLC analysiert.

### 2.5.8.3 Bestimmung des Ligationsausbeute: AVQEA-SL und CVSAIL

Die Mengen an Edukt, Arylthioester und Produkt wurden durch Integration der Peakflächen mittels 32 Karat Software (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) ermittelt. Da die Extinktionskoeffizienten der Arylthioester deutlich höher als die der Alkylthioester waren, wurden die Werte der Arylthioester durch einen empirisch bestimmten Faktor von 1.9 dividiert. Um die relative Menge jeder Komponente in der Reaktionslösung zu ermitteln, wurden die so korrigierten Peakflächen durch die Zahl der Peptidbindungen dividiert. Die relativen Anteile an der Reaktionsmischung ergaben sich durch Division der jeweiligen korrigierten Peakflächen durch die Summe der Flächen aus Edukten, Arylthioestern und Produkten. Zur Ermittlung vergleichbarer Reaktionsausbeuten wurde die Ausbeute auf das Edukt bezogen, welches im Unterschuss zugegeben wurde.

### 2.5.8.4 Ligationsvorschrift für transmembrane Peptide in Dimethylformamid

Die lyophilisierten Peptide wurden in einer Lösung aus Lithiumchlorid in DMF gelöst, so dass sich nach Zugabe aller Komponenten eine Lithiumchlorid-Konzentration von 0.18 M und eine Peptidkonzentration von jeweils 2 mg·ml<sup>-1</sup> einstellte (Gesamtpeptidkonzentration 4 mg·ml<sup>-1</sup>). Dann wurden Triethylamin und Thiophenol hinzugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 20 mM Triethylamin und 300 mM Thiophenol einstellte. Die Reaktionstemperatur betrug 40 °C. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Niederschlag zuerst mit Methanol, dann mit Wasser gewaschen, wobei die flüssige Phase durch Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge (14000 rpm, 15 min, Raumtemperatur) abgetrennt wurde. Nun wurde der Niederschlag entweder in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 35 mM TCEP, 0.1% TFA oder in 6 M Gdn·HCl, 0.05% DDM 100 mM NaPi, 35 mM TCEP, pH 2 aufgenommen und mittels HPLC aufgereinigt.

Sollte im Anschluss nach der Ligation eine Thz-Gruppe abgespalten werden, wurde der Niederschlag entweder in 50% Acetonitril, 50% Wasser, 70 mM TCEP, 200 mM Methoxyaminhydrochlorid, pH 3.5 oder in 6 M Gdn·HCl, 0.05% DDM 100 mM NaPi,



200 mM Methoxyaminhydrochlorid, pH 4 aufgenommen, über Nacht inkubiert und mittels HPLC aufgereinigt.

#### *2.5.8.5 Ligationsvorschrift für transmembrane Peptide in wässrigem Puffer*

Zunächst wurde eine wässrige Lösung mit pH 7.0 bestehend aus 6 M Gdn·HCl, 100 mM NaPi und DDM (0.05% oder 2%) angesetzt. Dieser Stammlösung wurde kurz vor Reaktionsbeginn 50 mM MPAA, sowie 20 mM TCEP hinzugefügt und der pH wieder auf 7 eingestellt. Dieser Ligationspuffer wurde zu den lyophilisierten Peptiden gegeben und die Ligation bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 18 bis 48 h wurde die Ligation durch die Zugabe von 3 M HCl<sub>(aq)</sub> (10 µl pro 200 µl Ligationslösung) und TCEP (20 mM) beendet und mittels HPLC aufgereinigt.

Sollte im Anschluss eine Thz-Gruppe abgespalten werden, wurde nach Ende der Ligation 200 mM Methoxyaminhydrochlorid hinzugegeben, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mittels HPLC aufgereinigt.

#### 2.5.9 In-Gel-Verdau

Zur Durchführung eines in-Gel-Verdaus wurden die zu analysieren Banden aus einem SDS-Gel geschnitten, zerkleinert, in 50 µl Acetonitril aufgenommen und 10 min inkubiert. Nun wurde das Acetonitril abpipettiert und die Gelstücke in einem Puffer bestehend aus 0.1 M Ammoniumcarbonat für 5 min inkubiert. Dann wurden 50 µl Acetonitril hinzugegeben und für 15 min inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und der Niederschlag mittels einer SpeedVac mindestens 30 min getrocknet. Dann wurde dieser mit 50 µl einer Lösung bestehend aus 10 mM DTT, 0.1 M Ammoniumcarbonat bei 56 °C für 45 min inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung wurden die Gelstücke mit 202 µl des Verdaupuffers (100 µl 0.1 M Ammoniumcarbonat, 20 µl 50 mM Calciumchlorid, 80 µl Wasser und 2 µl Trypsinlösung [0.025 mg Trypsin in 10 µl 1 mM HCl<sub>(aq)</sub>]) für 45 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, der Niederschlag mit 200 µl Verdaupuffer ohne Trypsin versetzt und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Dann wurde der Überstand durch Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge abgetrennt (1 min, 13000 rpm) und in einem separaten Reaktionsgefäß gesammelt. Zum Niederschlag wurden 20 µL einer Lösung bestehend aus 0.1 M Ammoniumcarbonat gegeben und für 15 min inkubiert. Dieser Überstand wurde mit dem vorherigen vereinigt. Zu dem verbleibenden Niederschlag wurden erneut 20 µl Acetonitril gegeben, 15 min inkubiert und der Überstand mit den anderen Überständen vereinigt. Die so isolierten Peptide wurden durch eine SpeedVac getrocknet und dann mittels HPLC-MS untersucht.

## 2.6 Proteinchemische Methoden

### 2.6.1 Plasmide und Bakterienstämme

Die verwendeten Expressionsvektoren wurden in einer vorherigen Arbeit hergestellt (Martell, 2008). Zur heterologen Genexpression wurden die *E. coli*-Stämme BL21(DE3) und BL21 verwendet.

### 2.6.2 Genexpression und Aufreinigung

#### *2.6.2.1 Expression und Aufreinigung von NpHtrII 1-94-MXE-His*

Die Expression von *NpHtrII* 1-94-MXE-His (**P23**) erfolgte analog publizierter Vorschriften (Hohenfeld *et al.*, 1999; Martell, 2008; Rzymann, 2011). Transformierte *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden bei 37 °C in LB-Medium (10 g·l<sup>-1</sup> Trypton, 5 g·l<sup>-1</sup> Hefe-Extrakt, 10 g·l<sup>-1</sup> Natriumchlorid, pH 7.2), welches 100 mg·l<sup>-1</sup> Ampicilin enthielt, wachsen gelassen. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0.8-1 wurde 0.5 mM oder 1 mM IPTG zum Medium hinzugegeben und die Kulturen für 4 h inkubiert. Nun wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5000 rpm, 20 °C, 20 min) und in Zellwaschpuffer (150 mM Natriumchlorid, 25 mM NaPi, 2 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Die in ZWP resuspendierten Zellen wurden mit einer Spatelspitze DNase versetzt und mittels eines Microfluidizers aufgeschlossen. Die Membranen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (45Ti oder 70Ti Rotor, 45000 rpm, 4 °C, 90 min) und anschließend in ca. 3-4 ml Puffer A<sub>Mem</sub> (2% DDM, 300 mM Natriumchlorid, 50 mM NaPi, pH 8) pro Gramm Membranpellet über Nacht bei 8 °C inkubiert. Nun wurden die Membranfraktion durch Zentrifugation (45Ti oder 70Ti Rotor, 45000 rpm, 4 °C, 90 min) abgetrennt und der das Protein enthaltende Überstand auf eine mit Puffer B<sub>Mem</sub> (0.05% DDM, 300 mM Natriumchlorid, 50 mM NaPi, pH 8) äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit etwa zehn Säulenvolumen des Puffers C<sub>Mem</sub> (0.05 % DDM, 300 mM Natriumchlorid, 50 mM NaPi, 30 mM Imidazol, pH 8) gewaschen und dann das Protein mit etwa vier Säulenvolumen Puffer D<sub>Mem</sub> (0.05% DDM, 300 mM Natriumchlorid, 50 mM NaPi, 200 mM Imidazol, pH 8) eluiert. Nach Dialyse gegen den Puffer B<sub>mem</sub> (Verhältnis von Proteinlösung zu Puffer mindestens 1:100) wur-

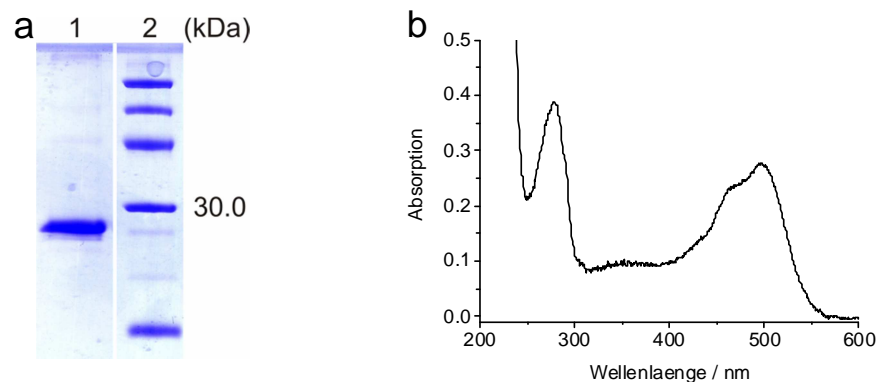
de das Protein in einer Ausbeute von ca. 3.5 mg·l<sup>-1</sup> Medium erhalten. Die analytischen Daten sind in Abbildung 3.45 gezeigt.

#### 2.6.2.2 Expression und Aufreinigung von GST-TEV-NpHtrII 95C-157

Transformierte *E. coli* BL21 Zellen wurden bei 37 °C in M9 Medium, welches 2 g·l<sup>-1</sup> <sup>13</sup>C-Glucose, 1 g·l<sup>-1</sup> <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl (oder 2 g·l<sup>-1</sup> <sup>12</sup>C-Glucose, 1 g·l<sup>-1</sup> <sup>14</sup>NH<sub>4</sub>Cl) und 100 mg·l<sup>-1</sup> Ampicillin enthielt, wachsen gelassen. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0.8-1 wurde 0.5 mM oder 1 mM IPTG zum Medium hinzugegeben und die Kulturen für 4 h inkubiert. Nun wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5000 rpm, 20 °C, 20 min) und in Zellwaschpuffer (150 mM Natriumchlorid, 25 mM NaPi, 2 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoffschockgefroren und bei -20 °C gelagert. Die in ZWP resuspendierten Zellen wurden mit einer Spatelspitze DNase versetzt und mittels eines Microfluidizers aufgeschlossen. Nun wurden die Membranfraktion durch Zentrifugation (45Ti oder 70Ti Rotor, 45000 rpm, 4 °C, 90 min) abgetrennt und der Überstand auf eine mit PBS-Puffer (137 mM Natriumchlorid, 2.7 mM Kaliumchlorid, 12 mM NaPi, pH 7.4) equilibrierte GSH-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit PBS-Puffer wurde das Protein mit 10 mM Gluthation in PBS-Puffer von der Säule eluiert. Das Eluat wurde mit einem Amicon Centrifugal Filter Device (10 kDa MWCO) konzentriert und gegen PBS-Puffer dialysiert. Für den TEV-Verdau wurden pro 50 mg GST-TEV-NpHtrII 95C-157 (**P25**) 1 mg TEV-Protease hinzugegeben. Darüber hinaus wurde der Lösung 1 mM DTT zugefügt. Der Verdau wurde mittels SDS-PAGE und analytischer HPLC (C4-Säule) verfolgt. Nach dem nahezu quantitativen Verdau wurde die Reaktionslösung zentrifugiert und ein sich bei der Reaktion gebildeter Niederschlag abgetrennt. Der Überstand wurde in der Folge mittels HPLC mit einer C4-Säule (250 x 22 mm, 5 µm), Eluentensystem 1 und einem Gradienten von 10% B nach 70% B in 70 min aufgereinigt. Ausgewählte Fraktionen wurden mittels ESI-MS und analytischer HPLC analysiert und Fraktionen, die das Produkt in hoher Reinheit enthielten, vereinigt, lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Das Peptid wurde mit einer Ausbeute von 3 mg pro Liter Medium erhalten. Die analytischen Daten sind in Abbildung 3.46 gezeigt.

### 2.6.2.3 Expression und Aufreinigung von Sensorischen Rhodopsin II

Die Überexpression von Sensorischen Rhodopsin II (**P22**) geschah analog zu Kapitel 2.6.2.1 und publizierter Vorschriften (Hohenfeld *et al.*, 1999; Martell *et al.*, 2008). Dabei wurden  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Kanamycin anstatt  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Ampicilin als Antibiotika eingesetzt. Lag das Verhältnis der Absorption bei 280 nm und der bei 498 nm nach der Nickel-NTA-Aufreinigung bei  $>2$  wurde das Protein darüber hinaus für drei Tage bei  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert (Gautier und Nietlispach, 2012). Dieses führte zum Ausfällen von Verunreinigungen, was zu einer Verringerung des Verhältnisses der Absorption bei 280 nm und der bei 498 nm auf 1.35 führte. Es ergab sich eine Ausbeute von 3 mg pro Liter Zellkultur, wobei die Konzentrationsbestimmung über die Absorption des Retinal-Chromophores erfolgte. Die analytischen Daten sind in Abbildung 2.12 gezeigt.



**Abbildung 2.12:** (a) SDS-PAGE des aufgereinigten SRIIs (**P22**). (1) SRII, (2) LMW-Marker. (b) UV-VIS-Spektrum des aufgereinigten SRII.

### 2.6.2.4 Expression und Aufreinigung von *NpHtrII* 1-157 und *NpHtrII* 1-114

Die Expression und Aufreinigung *NpHtrII* 1-157 und *NpHtrII* 1-114 geschah analog zu Kapitel 2.6.2.1 und publizierter Vorschriften (Hohenfeld *et al.*, 1999; Martell *et al.*, 2008). Dabei wurden  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Kanamycin anstatt  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Ampicilin als Antibiotika eingesetzt. Es ergab sich für *NpHtrII* 1-157 eine Ausbeute von 4.2 mg pro Liter Zellkultur und für *NpHtrII* 1-114 eine von 1 mg pro Liter. Die analytischen Daten sind in Abbildung 3.38 und 3.48 gezeigt.

### 2.6.3 Isolierung von Lipiden aus *Halobacterium salinarum*

*H. salinarum* Kulturen wurden in einem synthetischen Medium aufgezogen (Kates *et al.*, 1982) und nach einem Protokoll beschrieben in Gradmann *et al.* (2012) oder in Gradmann (2013) isoliert. Hierfür wurden 1 Liter Hauptkulturen mit 50 ml einer stationären Vorkultur angeimpft und etwa 7 Tage bei 120 rpm und 40 °C unter Lichteinstrahlung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (7000 rpm, 4 °C, 30 min) geerntet und mit Basalsalz (250 g·l<sup>-1</sup> Natriumchlorid, 20 g·l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 3 g·l<sup>-1</sup> Natriumcitrat, 2 g·l<sup>-1</sup> KCl) gewaschen. Das Zellpellet wurde in der Folge mit möglichst wenig Basalsalz resuspendiert, mit 3 mg DNase pro Liter Zellkultur versetzt und über Nacht bei 8 °C gegen 5 Liter Wasser dialysiert, wobei ein Dialyseschlauch mit einem MWCO von 14 kDa verwendet wurde. Das Dialysat wurde nun zentrifugiert (45Ti oder 70Ti Rotor, 45000 rpm, 4 °C, 30 min) und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde in möglichst wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. In der Folge wurde das Lyophilisat in einen Teebeutel gegeben und die Lipide über Nacht unter einer Argonatmosphäre in einem braunen 1 Liter Rundkolben mittels 800 ml Chloroform, Methanol (1:1) extrahiert.

Das Lösemittelgemisch wurde nun komplett am Rotationsverdampfer bei 30 °C eingengt und der in so wenig wie möglich Chloroform, Methanol (1:1) gelöste Rückstand auf eine mit Laufmittel 1 [Diethylether:Petrolether (85:15)] äquilibrierte Kieselgelsäule aufgetragen. Die Säule wurde mit Laufmittel 1 gewaschen, um die unpolaren Bestandteile zu eluieren. Im Anschluss daran wurde mit etwa einem Säulenvolumen Laufmittel 2 [Chloroform:Ethanol (2:1), 1% Wasser, 1% Ameisensäure] gewaschen und die Lipide abschließend mit Laufmittel 3 [Chloroform:Ethanol (1:1), 10% Wasser, 10% Ameisensäure] eluiert. Die Kontrolle des Durchflusses erfolgte bei allen Schritten mittels Dünnschichtchromatographie in Laufmittel 2 und mit Molybdätophosphorsäure-Tauchlösung (10% Lösung in Ethanol) als Reagenz zur Entwicklung.

Geeignete Fraktionen wurden vereint und am Rotationsverdampfer bei 30 °C eingengt. Um mögliche Proteinverunreinigungen abzutrennen, wurde der Rückstand in 50% Chloroform, 50% Methanol gelöst und zentrifugiert (5000 rpm, 10 min, Raumtemperatur). Nach Einengen des Lösungsmittels und erneutem Lösen in 50% Chloroform, 50% Methanol wurde der Vorgang so lange wiederholt, bis kein Ausfallen von Verun-

reinigungen mehr beobachtet werden konnte bzw. die Abwesenheit von Proteinverunreinigungen mittels SDS-PAGE nachgewiesen wurde. Es wurde nun so viel Puffer (50 mM NaPi, pH 8) zugegeben, dass sich eine Lipid-Konzentration von 2 mg·ml<sup>-1</sup> einstellte. Dann wurde die Probe mittels Ultraschall homogenisiert und bei -80 °C gelagert.

#### 2.6.4 Durchführung und Aufreinigung der Ligation mit anschließender Rückfaltung

Die Ligation zwischen *NpHtrII* 1-94-MXE-His (**P23**) und *NpHtrII* 95C-157 (**P26a** oder **P26b**) wurde in Ligationspuffer (0.05% DDM, 50 mM NaPi, 300 mM Natriumchlorid, 200 mM MESNA, pH 8) bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei die Konzentration des *NpHtrII* 1-94-MXE-His etwa 12 µM betrug. Die Generierung des Thioesters *NpHtrII* 1-94-SMESNA (**P24**) erfolgte in situ. Nach zwei Tagen wurde die Ligationlösung mittels HPLC mit einer C4-Säule (Grace, VYDAC, 250 x 10 mm, 5 µm) und einem Ameisensäure (Puffer A: 60% Ameisensäure, 40% Wasser)/Isopropanol (Puffer B) Gradienten (5% B nach 80% B in 60 min, Fluss 2.5 ml·min<sup>-1</sup>) aufgereinigt (Eluentensystem 4). Der Peak, der dem Ligationprodukt zugeordnet wurde, wurde gesammelt und einem zweifachen Überschuss an TFE zugefügt. Mittels einer SpeedVac wurde das Lösungsmittel vorsichtig verdampft und nach und nach gegen TFE ersetzt. So wurde eine konzentrierte Lösung von *NpHtrII* 1-157 (**P27a** oder **P27b**) in TFE erhalten, welche in der Folge mit der zehnfachen Menge an Faltungspuffer verdünnt wurde (0.5% DDM, 150 mM Natriumchlorid, 25 mM NaPi, pH 8). Nach Inkubation über Nacht und Dialyse gegen die hundertfache Menge an Dialysepuffer (150 mM Natriumchlorid, 25 mM NaPi, pH 8) in einer Dialysekassette (10 kDa molecular weight cut-off) wurde das Ligationprodukt in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (14000 rpm, 8 °C, 15 min) und damit ein kleines weißes Pellet, welches ausgefallenes *NpHtrII* 1-157 (**P27a** oder **P27b**) enthielt, abgetrennt.

#### 2.6.5 Rekonstitution in Proteoliposome aus *Halobacterium salinarum*

Wegen der hohen DDM-Konzentration im Faltungspuffer (0.5 % DDM) war eine direkte Rekonstitution des Komplexes aus semisynthetischen *NpHtrII* 1-157 (**P27b**) und SRII (**P22**) in die Proteoliposome nicht möglich. Daher wurde ein Pufferaustausch über eine

Ni-NTA Aufreinigung des Komplexes durchgeführt (das verwendete SR<sub>II</sub> besaß einen C-terminalen His-Tag) und so die DDM-Konzentration auf 0.05% herabgesetzt. Um den Komplex zu bilden, wurden zunächst das semisynthetische *Np*HtrII 1-157 und das SR<sub>II</sub> in äquimolaren Mengen über Nacht bei 8 °C inkubiert. In der Folge wurde die Lösung auf eine mit B<sub>mem</sub> (300 mM Natriumchlorid, 50 mM NaPi, pH 8, 0.05% DDM) äquilibrierte Ni-NTA Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer C<sub>mem</sub> (300 mM Natriumchlorid, 50 mM NaPi, pH 8, 0.05% DDM, 30 mM Imidazol) gewaschen. Dann wurde der SR<sub>II</sub>/*Np*HtrII 1-157-Komplex mit Puffer D<sub>mem</sub> (300 mM Natriumchlorid, 50 mM NaPi, pH 8, 0.05% DDM, 200 mM Imidazol) eluiert und gegen den Puffer B<sub>mem</sub> dialysiert. Nun wurde ein Lipidextrakt aus *Halobacterium salinarum* (es wurde pro 1 mg Protein-Komplex 1 mg Lipid eingesetzt) und Natriumchlorid (Endkonzentration 1 M) hinzugefügt und für 30 min bei 8 °C inkubiert. Dann wurden Detergens-absorbierende Biobeads hinzugefügt und über Nacht bei 8 °C inkubiert. Durch Filtration über Glaswolle und Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (15.000 rpm, 4 °C, 15 min) wurde ein oranges Pellet erhalten. Nach fünfmaligem Waschen mit einem Tris-Puffer (10 mM Tris, 150 mM Natriumchlorid, pH 8) wurde der rekonstituierte Komplex im gleichen Puffer resuspendiert.



## 2.7 Biophysikalische Methoden

### 2.7.1 CD-Spektroskopie

Die Aufnahme von CD-Spektren wurde an einem J-815 CD-Spektrometer der Firma Jasco (Tokyo, Japan) durchgeführt. Dabei betragen die Proteinkonzentrationen etwa  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  in  $150 \text{ mM}$  Natriumchlorid,  $25 \text{ mM}$  NaPi,  $0.05\%$  bis  $0.5\%$  (w/v) DDM, pH 8. Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur in Quarzküvetten mit Schichtdicken von  $0.1 \text{ cm}$  gemessen und um die Pufferbeiträge korrigiert. Die aufgenommenen CD-Spektren wurden nach Gleichung (5) in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure transformiert (Kelly *et al.*, 2005).

$$[\Theta]_{mrw,\lambda} = \frac{M \cdot \Theta_{\lambda}}{(N-1) \cdot 10 \cdot d \cdot c} \quad (5)$$

$[\Theta]_{mrw,\lambda}$  = mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure [ $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ]

$\Theta_{\lambda}$  = Gemessene Elliptizität [Grad]

$M$  = Molekulare Masse des Peptides [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]

$N$  = Zahl der Aminosäuren

$c$  = Konzentration [ $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]

$d$  = Schichtdicke der Küvette [cm]

### 2.7.2 Optisch erzeugte Thermophorese

Die optisch erzeugte Thermophorese (*engl. Microscale Thermophoresis*) ist eine Methode zur Ermittlung von Bindungsaffinitäten zwischen Proteinen, DNA, RNA und chemischen Verbindungen mit geringer molekularer Masse. Für die Grundlagen dieser Technik sei auf folgende Übersichtsartikel verwiesen (Jerabek-Willemsen *et al.* 2011; Seidel *et al.* 2013). In dieser Arbeit wurden die Messungen an einem Monolith NT.115 der Firma NanoTemper Technologies GmbH (München, Deutschland) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Messung wurde ein Bindungspartner mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Hierzu wurden die kommerziell erworbenen Kits „Blue NHS“ oder „Green NHS“ der Firma NanoTemper Technologies GmbH verwendet, bei denen Aminogruppen im Protein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Dabei wurde die Mar-

kierungsreaktion gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. In der Folge wurde durch die Messung eines UV-VIS-Spektrums die Konzentration des markierten Proteins ermittelt, sowie die Effizienz der Markierung abgeschätzt. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde bei Verwendung des Kits „Blue NHS“ ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{493\text{nm}} \sim 70000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und bei Verwendung des Kits „Green NHS“ ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{557\text{nm}} \sim 150000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  angenommen.

Nun wurde eine Verdünnungsreihe des nicht markierten Bindungspartners präpariert und eine konstante Menge des markierten Bindungspartners hinzugegeben. Nach Durchführung des Experimentes wurden die Daten mittels der Software NT Analysis der Firma NanoTemper Technologies GmbH ausgewertet und die  $K_d$ -Werte bestimmt. Dabei geschah die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes bei Verwendung des Kits „Blue NHS“ bei einer Wellenlänge von 460-480 nm und die Detektion bei einer Wellenlänge von 510-530 nm. Bei Verwendung des Kits „Green NHS“ erfolgte die Anregung bei einer Wellenlänge von 540-580 nm und die Detektion bei einer Wellenlänge von 580-620 nm.

### 2.7.3 Blaue-Native-Gelelektrophorese

Die Blaue-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) wurde mit einem X Cell Sure Lock Mini Cell System der Firma Invitrogen (jetzt Life Technologies, Carlsbad, USA) durchgeführt. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein diskontinuierliches System mit einem 4%-16%igem Gradientengel (Typ: NativePAGE, 4-16% BisTris Gels) von Invitrogen verwendet. Als Marker diente der NativeMarker™ Unstained Protein Standard von Invitrogen. Der Anodenpuffer bestand aus 50 mM BisTris, pH 7 (vorgekühlt); der Kathodenpuffer aus 50 mM Tricin, 15 mM BisTris, 0.02% Coomassie Serva Blue G, pH 7 (gefiltert und vorgekühlt). Die Proben wurden mit 10  $\mu\text{l}$  4 X Probenpuffer aufgefüllt (ebenfalls von Invitrogen bezogen). Nach Auftragung der Proteine wurden diese bei 1 mA über Nacht bei 8 °C aufgetrennt. In der Folge wurde das Gel in eine Fixierlösung (40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure in Wasser) überführt, kurz aufgekocht und 15 min inkubiert. Nun wurde es in eine Entfärbelösung (10% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Ethanol in Wasser) gebracht und entfärbt.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Synthese und Charakterisierung von 4,4'-Dihydroxythioindigo

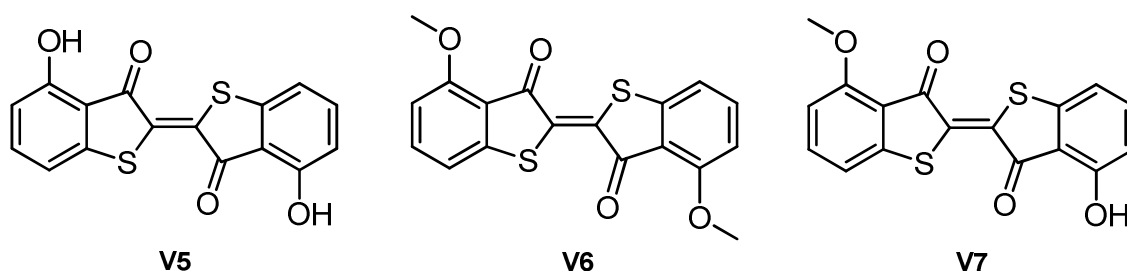
Indigo (**V1**) ist einer der ältesten organischen Farbstoffe, der schon seit Jahrtausenden zum Färben von Textilien genutzt wird (Steingruber, 2004; Welsch, 2006). Nach der Bestimmung der Struktur und Entwicklung von verschiedenen chemischen Synthesen Ende des 19. Jahrhunderts wird Indigo heutzutage immer noch industriell produziert (Baeyer und Emmerling, 1870; Übersicht in Schmidt, 1997). Grund hierfür sind seine charakteristische Farbe und seine hohe Photostabilität, welche es zu einem wertvollem Färbemittel machen. Darüber hinaus machen diese Eigenschaften Indigo auch für moderne Anwendungen nutzbar. So wurde kurzlich ein ambipolarer organischer Feldeffekttransistor auf Indigobasis dargestellt (Irimia-Vladu *et al.*, 2011). Derivate wie das Hemithioindigo (HTI) erweisen sich als vielversprechende Schalter/Sensoren auf dem Gebiet der Optogenetik (Fehrentz *et al.*, 2011) und sind als photoschaltbare Verbindungen in Peptide eingebaut und charakterisiert worden (Regner *et al.*, 2012).

Die photochemischen Eigenschaften von Indigo (**V1**) haben seit Beginn des letzten Jahrhunderts das Interesse vieler Forschungsgruppen hervorgerufen. Durch theoretische Untersuchungen mittels LCAO-MS-Rechnungen (lineare Kombination von Atomorbitalen, *engl. linear combination of atomic orbitals*) konnte der Basis-Chromophor (**V2**) der Indigo-Farbstoffe identifiziert werden (Abbildung 3.1; Klessinger und Lüttke, 1963), wobei diese Resultate durch eine chemische Synthese experimentell bestätigt werden konnten (Lüttke *et al.*, 1966).



gen zeigten ebenfalls eine schnelle Innere Umwandlung (*engl. internal conversion*, „IC“) über einen intramolekularen Protonentransfer (Yamazaki *et al.*, 2011).

Sofern tatsächlich ein Protonentransfer für die herausragende Photostabilität von Indigo verantwortlich ist, sollte ein Thioindigo-Derivat mit einer Hydroxygruppe in Nachbarschaft zur Carboxygruppe indigoartige Eigenschaften zeigen. Daher sollte in diesem Projekt eine Synthese für das 4,4'-Dihydroxythioindigo (**V5**) vorgestellt und diese Substanz charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte das 4,4'-Dimethoxythioindigo (**V6**) dargestellt werden, um dessen Eigenschaften mit dem des 4,4'-Dihydroxythioindigos vergleichen zu können. 4,4'-Dihydroxythioindigo war zum Beginn dieses Forschungsprojektes noch unbekannt. Das 4,4'-Dimethoxythioindigo wurde bereits in vorherigen Arbeiten synthetisiert (Friedlaender, 1916). Um zu testen, ob ein Protonentransfer im angeregten Zustand innerhalb einer einzelnen Hemithioindigohälfte die Photostabilität erhöht, wurde darüber hinaus das 4-Methoxy-4'-Hydroxythioindigo (**V7**) dargestellt und analysiert.

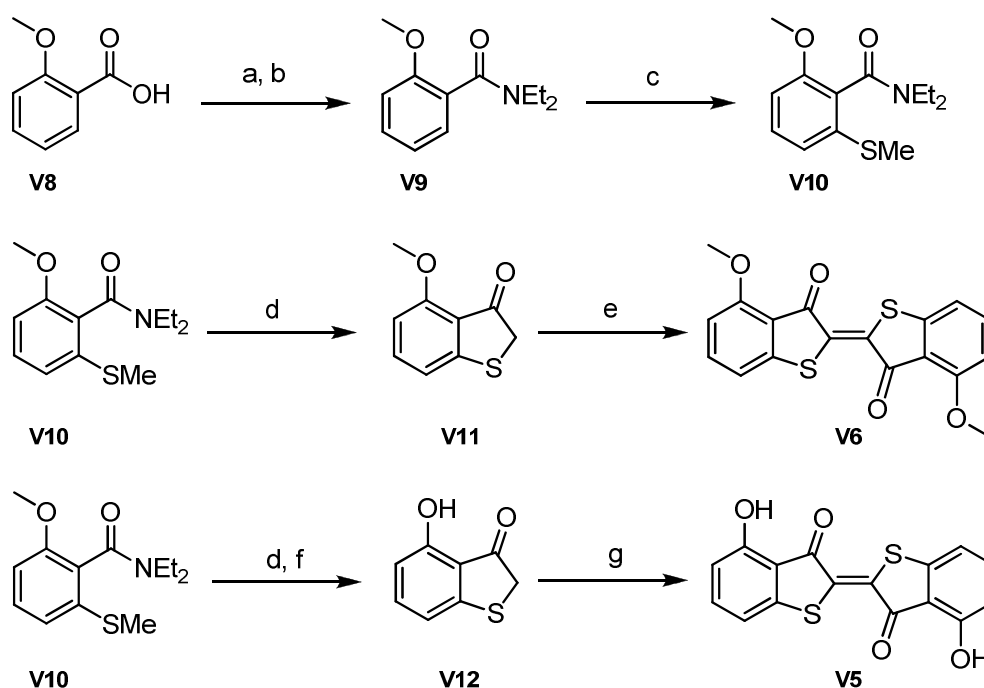


**Abbildung 3.2:** Strukturen von 4,4'-Dihydroxythioindigo (**V5**), 4,4'-Dimethoxythioindigo (**V6**) und 4-Methoxy-4'-Hydroxythioindigo (**V7**).

### 3.1.1 Synthesestrategie

Ausgangsverbindung der angewandten Synthesestrategie (Abbildung 3.3) ist die kommerziell erhältliche 2-Methoxybenzoesäure (**V8**), welche über ein Carbonsäurechlorid in das 2-Methoxybenzamid (**V9**) überführt wurde (Wang *et al.*, 1995). Dieses wurde nach einem von Mukherjee *et al.* publizierten Protokoll durch Lithiierung in *ortho*-Stellung zum Amid in das *N,N*-Diethyl-2-methylsulfanyl-6-methoxybenzamid (**V10**) umgewandelt (Mukherjee und De, 2002; Mukherjee *et al.* 2003). Deprotonierung von Verbindung (**V10**) mit LDA und eine folgende intramolekulare Zyklisierung lieferten Thioindoxyl (**V11**). Dieses wurde direkt mittels Kaliumhexacyanidoferrat(III) ohne

Aufarbeitung zum 4,4'-Dimethoxythioindigo (**V6**) oxidiert (Friedlaender, 1916). Zur Darstellung des 4,4'-Dihydroxythioindigo (**V5**) wurde Verbindung (**V10**) in einer Eintopfreaktion in das Thioindoxyl (**V12**) umgewandelt (Konieczny *et al.*, 2006). Oxidation dieser Verbindung mit Mangan(III)acetat lieferte das 4,4'-Dihydroxythioindigo (**V5**) (Dümeland, 2002). Durch Anwendung dieser Synthesestrategie konnte 4,4'-Dihydroxythioindigo (**V5**) in einer Ausbeute von 25% und 4,4'-Dimethoxythioindigo (**V6**) in einer Ausbeute von 30% dargestellt werden. Das 4-Methoxy-4'-Hydroxythioindigo (**V7**) wurde in analytischen Mengen aus dem 4,4'-Dimethoxythioindigo (**V6**) durch eine Methyletherspaltung synthetisiert (Konieczny *et al.*, 2006).



**Abbildung 3.3:** Synthese von 4,4'-Dimethoxythioindigo (**V6**) und 4,4'-Dihydroxythioindigo (**V5**). a)  $\text{SOCl}_2$ , cat DMF; b)  $\text{Et}_2\text{NH}$ , THF, 78% (2 Stufen); c) *sec*-BuLi, TMEDA, THF, Me-S-S-Me,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 85%; d) *n*-BuLi, Diisopropylamin,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ ; e)  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$ ,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 46% (2 Stufen); f)  $\text{AlCl}_3$ , Tetrabutylammoniumiodid,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 74% (2 Stufen); g)  $\text{Mn}(\text{OAc})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , AcOH, 51%.

### 3.1.2 Charakterisierung der Thioindigoderivate

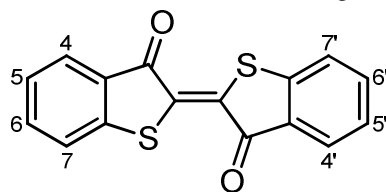
Die Verbindungen (**V5**) und (**V6**) zeigten die für indigoide Verbindungen typische Schwerlöslichkeit in allen gängigen Lösungsmitteln. Von den gebräuchlichen Lösungsmitteln waren nur die polar-aprotischen Lösungsmittel DMF und DMSO in der Lage die Farbstoffe bei Raumtemperatur in einer Konzentration von ungefähr  $0.2\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $\sim 6 \cdot 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) zu lösen. In Chloroform lösten sich die Verbindungen in einer Konzen-

tration von etwa  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $\sim 3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). In Acetonitril waren die Verbindungen praktisch nicht löslich (Konzentration  $< 5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $\sim 0.02 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

### 3.1.2.1 Extinktionskoeffizienten

Die Extinktionskoeffizienten und die langwelligen Absorptionsmaxima von 4,4'-Dihydroxythioindigo und 4,4'-Dimethoxythioindigo wurden gemäß Kapitel 2.4.3.1 bestimmt. Tabelle 3.1 stellt die für Verbindung (V5), (V6) und (V7) ermittelten Werte anderen in der Literatur bekannten Thioindigoderivaten gegenüber. Es ist zu erkennen, dass diese eine vergleichbare Größe besitzen, wobei der Extinktionskoeffizient des 4,4'-Dimethoxythioindigos (V6) den größten Wert der hier dokumentierten Auswahl an Verbindungen annimmt.

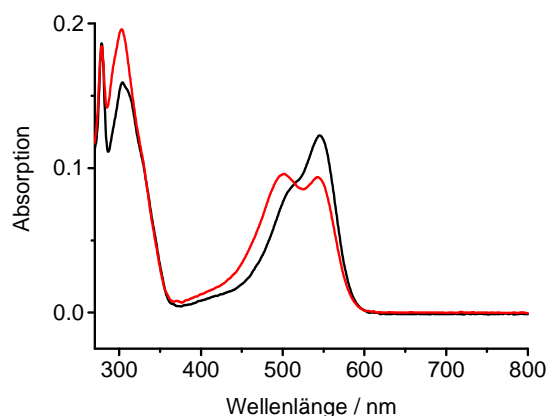
**Tabelle 3.1:** Absorptionsmaximum und Extinktionskoeffizient ausgewählter Thioindigoderivate.



Position und Substituent	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ( $\lg \epsilon$ )	Lösungsmittel	Quelle
– (V3)	543 (4.21)	Benzol	Hauke und Paetzold, 1978
– (V3)	545 (4.09)	Chloroform	Dittmann <i>et al.</i> , 2014a
4,4'-OH (V5)	578 (4.01)	Chloroform	Dittmann <i>et al.</i> , 2014a
4,4'-OCH <sub>3</sub> (V6)	550 (4.39)	Chloroform	Dittmann <i>et al.</i> , 2014a
4-OCH <sub>3</sub> , 4'-OH (V7)	566 (-)	Chloroform	Dittmann <i>et al.</i> , 2014a
5,5'-OH (V13)	592 (3.83)	DMSO	Dümeland, 2002
5,5'-OCH <sub>3</sub> , 6,6'-OH (V14)	526 (3.61)	DMSO	Dümeland, 2002
6,6'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (V15)	517 (4.16)	Benzol	Hauke und Paetzold, 1978
4,4',7,7'-CH <sub>3</sub> (V16)	553 (4.24)	Benzol	Kirsch und Wyman, 1977
6,6'-Cl, 4,4'-CH <sub>3</sub> (V17)	537 (4.31)	Benzol	Kirsch und Wyman, 1977
Indigo (V1)	604 (4.09)	Chloroform	Brode <i>et al.</i> 1954

### 3.1.2.2 Analyse einer möglichen Photoisomerisierung

Thioindigo und viele seiner Derivate isomerisieren nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge des langwelligeren Absorptionsmaximums um die zentrale Doppelbindung des Moleküls (Wyman und Brode, 1951; Abbildung 3.1). Eine solche Photoisomerisierung äußert sich im UV-VIS-Spektrum in einer Verringerung der Absorption des *trans*-Isomers und durch die Entstehung einer neuen Absorptionsbande, welche auf das *cis*-Isomer zurückgeht. Die Absorption des *cis*-Isomers erscheint im Vergleich zum *trans*-Isomer bei kleineren Wellenlängen (Thioindigo in Benzol; (V3)  $\lambda_{\max, \text{trans}} = 543 \text{ nm}$ ; (V4)  $\lambda_{\max, \text{cis}} = 484 \text{ nm}$ ; Haucke und Paetzold, 1978). Abhängig von den Bestrahlungsbedingungen entsteht ein Gemisch aus *trans*- und *cis*-Isomer, wobei sich prinzipiell die Anteile und das theoretische Absorptionsmaximum des reinen *cis*-Isomers berechnen lassen (Wyman und Brode, 1951). Abbildung 3.4 zeigt ein im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenes Spektrum von Thioindigo in Chloroform vor und nach Bestrahlung.



**Abbildung 3.4:** UV-VIS-Spektrum von Thioindigo (V3) vor (schwarze Kurve) und nach (rote Kurve) zweistündiger Bestrahlung mittels einer Lampe mit Gelbfilter (Kindermann, 15 Watt, PF713E, Konzentration  $\sim 0.1 \text{ mM}$ ; Weglänge  $0.1 \text{ cm}$ ).

Um eine mögliche Photoisomerisierung der Thioindigoderivate nachzuweisen, wurden in diesem Forschungsprojekt ebenfalls Analysen mittels UV-VIS-Spektroskopie durchgeführt. Hierzu wurden Lösungen in einer Konzentration von  $\sim 0.1 \text{ mM}$  in DMSO, DMF, Benzol und Chloroform angefertigt. Die Proben wurden mit einer Laborlampe (Kindermann, 15 Watt, PF713E) für 2 h oder mit einem Projektor (Perkeo projector, Zett, 150 W) mit einem Gelbfilter (gemessener transmission cut-off  $< 466 \text{ nm}$ ) für 20 min bestrahlt. Vor und nach Bestrahlung wurden UV-VIS-Spektren angefertigt,



wobei die Ergebnisse in Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3 dargestellt sind. Die erhaltenen Spektren sind im Anhang A1 dokumentiert.

**Tabelle 3.2:** Photoisomerisierung von Indigofarbstoffen in verschiedenen Lösungsmitteln (Dittmann *et al.*, 2014a).

	DMSO	DMF	CHCl <sub>3</sub>	Benzol
Thioindigo (V3)	–	–	+	+
4,4'-Dimethoxythioindigo (V6)	+	+	–	+
4,4'-Dihydroxythioindigo (V5)	–	–	–	–
Indigo (V1)	–	–	–	–
4-Methoxy-4'-Hydroxythioindigo (V7)	–	n.u.	–	n.u.

+ Photoisomerisierung *trans* → *cis*  
 – Keine Photoisomerisierung *trans* → *cis*  
 n.u. nicht untersucht

Indigo und Thioindigo wurden zum Vergleich als gut charakterisierte Referenzsubstanzen vermessen. Die *trans-cis* Isomerisierung von Thioindigo wurde bereits in zahlreichen Arbeiten untersucht (z. B. in Wyman und Brode, 1951; Blanc und Ross, 1968; Grellmann und Hentzschel, 1978). Diese Experimente wurden vorwiegend in Chloroform, Benzol oder Toluol durchgeführt, wobei auch in der vorliegenden Arbeit eine Isomerisierung in Chloroform und Benzol beobachtet wurde. In DMF oder DMSO kam es unter den angewendeten Bestrahlungsbedingungen zu keiner Isomerisierung. Ein Vergleich mit Literaturdaten konnte nicht vorgenommen werden, da keine veröffentlichten Studien zur Isomerisierung von Thioindigo in DMF oder DMSO vorliegen. Daher kann keine Erklärung für die nicht beobachtete Isomerisierung in DMSO und DMF gegeben werden. Der Farbstoff Indigo wurde zu Vergleichszwecken vermessen, da eine *trans-cis*-Isomerisierung dieser Substanz bisher nicht beobachtet wurde (Brode W.R. *et al.* 1954; Wyman 1971; Haucke und Paetzold, 1978), wobei auch in dieser Arbeit keine Isomerisierung beobachtet werden konnte.

Die Einführung der Methoxy-Gruppe in 4,4'-Position (V6) lieferte einen Farbstoff, der ebenfalls wie Thioindigo die Fähigkeit zur *trans-cis*-Isomerisierung besaß. Das 4,4'-Dihydroxythioindigo zeigte in keinem getesteten Lösungsmittel eine *trans-cis*-Isomerisierung. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass durch Einführung der Hydroxy-

gruppe in Nachbarschaft der Carboxygruppe ein Indigo-Analogon erzeugt wurde, das wie Indigo ebenfalls keine Photoisomerisierung zeigt.

Darüber hinaus wurde getestet, ob die *trans-cis*-Isomerisierung von Thioindigo und 4,4'-Dimethoxythioindigo durch Zugabe von 100 Äquivalenten Essigsäure oder Trifluoressigsäure verhindert werden kann. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Tabelle 3.3 dokumentiert.

**Tabelle 3.3:** Photoisomerisierung von Indigofarbstoffen in verschiedenen Lösungsmitteln (Dittmann *et al.*, 2014a).

	CHCl <sub>3</sub>	Benzol	CHCl <sub>3</sub>	Benzol
	10 mM Essigsäure	10 mM Essigsäure	10 mM TFA	10 mM TFA
Thioindigo (V3)	+	+	-	-
4,4'-Dimethoxythioindigo (V6)	n.u.	+	n.u.	-

+ Photoisomerisierung *trans* → *cis*  
 - Keine Photoisomerisierung *trans* → *cis*  
 n.u. nicht untersucht

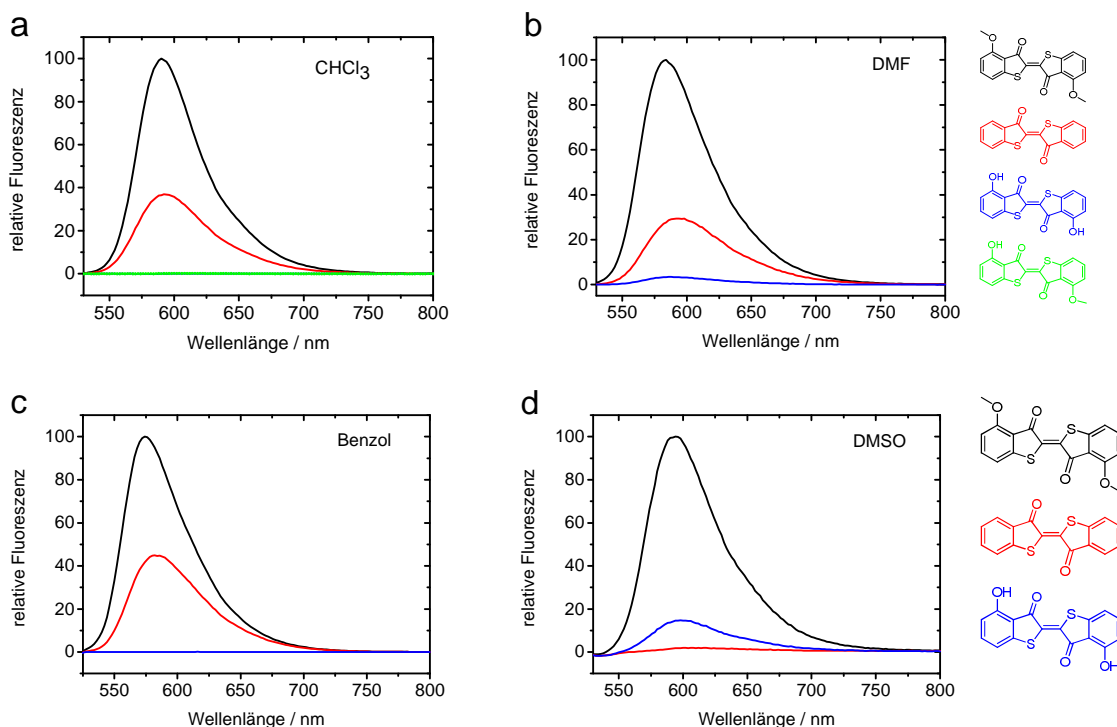
In Tabelle 3.3 ist zu erkennen, dass die Zugabe von Trifluoressigsäure die Isomerisierung unterdrückt, nicht aber die Zugabe von Essigsäure.

### 3.1.2.3 Fluoreszenzmissionsspektren

Die besondere Photostabilität von Indigo drückt sich neben einer ausbleibenden *trans-cis*-Isomerisierung in einer nur sehr schwach ausgeprägten Fluoreszenz dieses Moleküls aus. So besitzt Indigo in Benzol eine Fluoreszenzquantenausbeute von nur  $2.8 \cdot 10^{-3}$  (Hauke und Paetzold, 1978). Daher sollte ein Thioindigo-Derivat mit Hydroxygruppen in 4,4'-Position, sofern es indigoartige Eigenschaften besitzt, eine im Vergleich zum Thioindigo oder zum 4,4'-Dimethoxythioindigo deutlich verringerte Fluoreszenz aufweisen. Die gleichen Ausführungen gelten auch für das 4-Methoxy-4'-Hydroxythioindigo.

Um diesen Sachverhalt zu testen, wurden von Thioindigo, 4,4'-Dimethoxythioindigo und 4,4'-Dihydroxythioindigo Fluoreszenzmissionsspektren in den Lösungsmitteln Chloroform, DMF, Benzol und DMSO angefertigt (Abbildung 3.5). Diese wurden auf

das Fluoreszenzmaximum von 4,4'-Dimethoxythioindigo in den jeweiligen Lösungsmitteln normiert.



**Abbildung 3.5:** Fluoreszenzemissionsspektren von Thioindigoderivaten in Chloroform (a), in DMF (b), in Benzol (c) oder in DMSO (d). Schwarze Kurve: 4,4'-Dimethoxythioindigo (V6). Rote Kurve: Thioindigo (V3). Blaue Kurve: 4,4'-Dihydroxythioindigo (V5). Grüne Kurve: 4-Methoxy-4'-Hydroxythioindigo (V7) (Anregungswellenlänge: 525 nm; Konzentration  $\sim 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Die Spektren wurden auf das Fluoreszenzmaximum von 4,4'-Dimethoxythioindigo (V6) in den jeweiligen Lösungsmitteln normiert.

In den Lösungsmitteln Chloroform und Benzol ist im Maßstab dieser Abbildung keine Fluoreszenz des 4,4'-Dihydroxythioindigos zu beobachten (Abbildung 3.5 (a) und (c)). Darüber hinaus ist die Fluoreszenzintensität in DMF geringer als die des 4,4'-Dimethoxythioindigos und die des Thioindigos. In DMSO ist die Fluoreszenz des 4,4'-Dihydroxythioindigos geringer als die des 4,4'-Dimethoxythioindigo. Die Fluoreszenz des Thioindigos scheint in dem Lösungsmittel DMSO größtenteils gelöscht. Das 4-Methoxy-4'-Hydroxythioindigo zeigt im Maßstab der Abbildung 3.5 (a) keine Fluoreszenz, wobei dies dem Verhalten des 4,4'-Dihydroxythioindigos entspricht. Um quantitative Daten zu erhalten, wurden die Fluoreszenzquantenausbeute von 4,4'-Dihydroxythioindigo, 4,4'-Dimethoxythioindigo und Thioindigo in Chloroform und DMF durch Vergleich mit Rhodamin B als Referenzsubstanz bestimmt (Tabelle 3.4; siehe Kapitel 2.4.3.4).

**Tabelle 3.4:** Fluoreszenzquantenausbeuten in DMF und CHCl<sub>3</sub>.

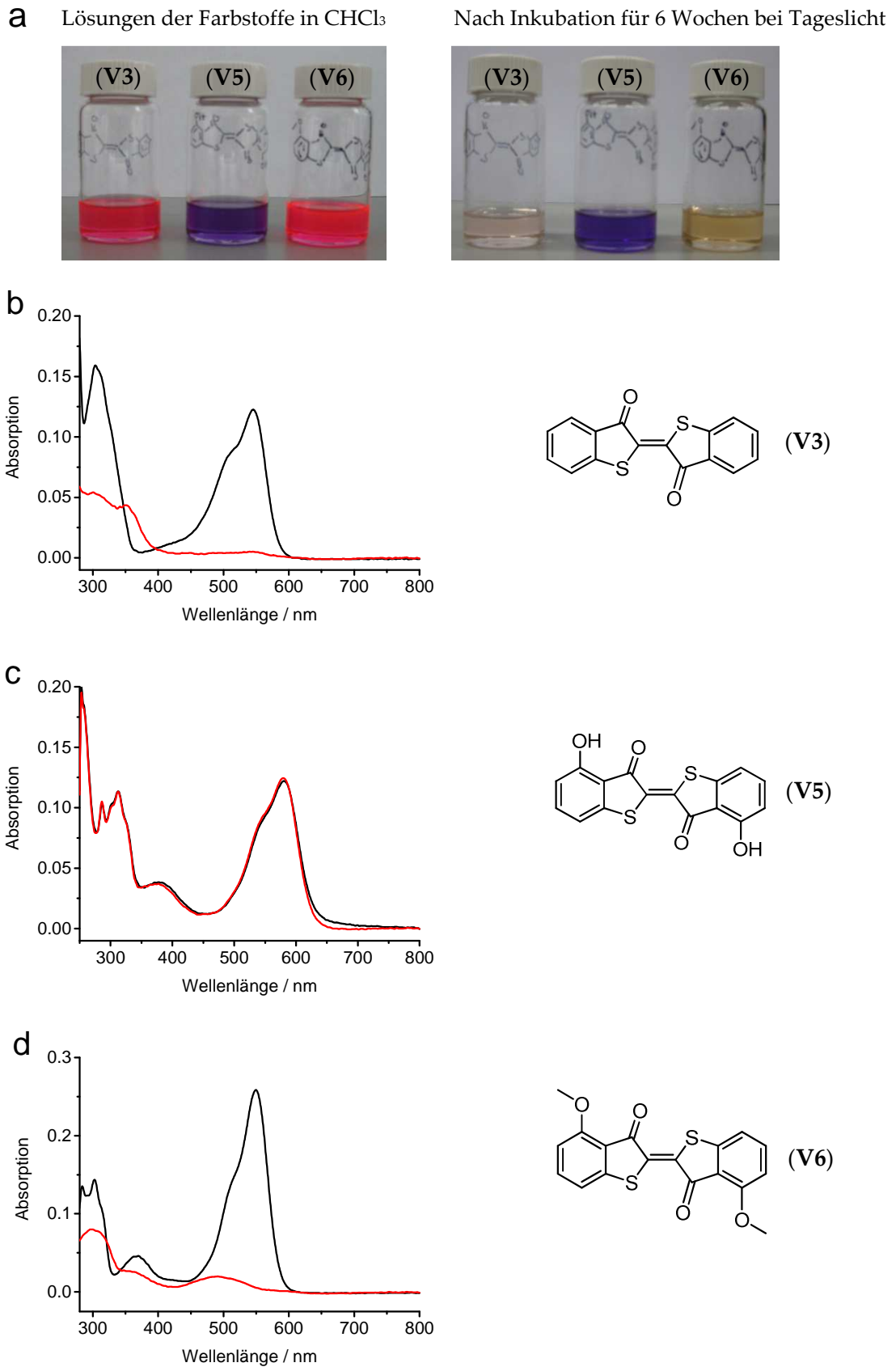
Fluoreszenzquantenausbeuten	DMF	CHCl <sub>3</sub>
4,4'-Dimethoxythioindigo ( <b>V6</b> )	0.68	0.97
4,4'-Dihydroxythioindigo ( <b>V5</b> )	0.05	< 0.01
Thioindigo ( <b>V3</b> )	0.45	0.70

Die Fluoreszenzquantenausbeute von 4,4'-Dihydroxythioindigo ist in beiden Lösungsmitteln im Vergleich zum 4,4'-Dimethoxythioindigo und zum Thioindigo reduziert. In dem Lösungsmittel Chloroform ist diese kleiner als 0.01. In dem polar-aprotischen Lösungsmittel DMF nimmt diese einen Wert von 0.05 an. Eine Erklärung für diesen im Vergleich zum Chloroform höheren Wert, könnte in der Fähigkeit des DMF als Wasserstoffbrücken-Akzeptor zu wirken, begründet sein. Dieses könnte mit den Hydroxygruppen des 4,4'-Dihydroxythioindigo wechselwirken und so Einfluss auf den Deaktivierungsmechanismus nehmen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Einführung der Hydroxygruppe in Nachbarschaft der Carboxygruppe des Thioindigos eine Verbindung erzeugt wurde, die im Vergleich zum 4,4'-Dimethoxythioindigo oder zum Thioindigo, eine deutlich kleinere Fluoreszenzquantenausbeuten aufweist.

#### 3.1.2.4 Photostabilität

Um die Photostabilität von 4,4'-Dihydroxythioindigo zu testen, wurden die Substanzen (**V3**), (**V5**) und (**V6**) in Chloroform für sechs Wochen bei Tageslicht inkubiert. Vor und nach Inkubation wurden UV-VIS-Spektren gemessen (Abbildung 3.6). Thioindigo und 4,4'-Dimethoxythioindigo sind nach dieser Zeit nahezu komplett zerfallen, wohingegen das 4,4'-Dihydroxythioindigo noch annähernd in der derselben Konzentration vorhanden ist wie zu Beginn des Versuches. Das 4,4'-Dihydroxythioindigo (**V5**) besitzt demnach in Chloroform eine deutlich höhere Photostabilität als die Verbindungen (**V3**) und (**V6**).



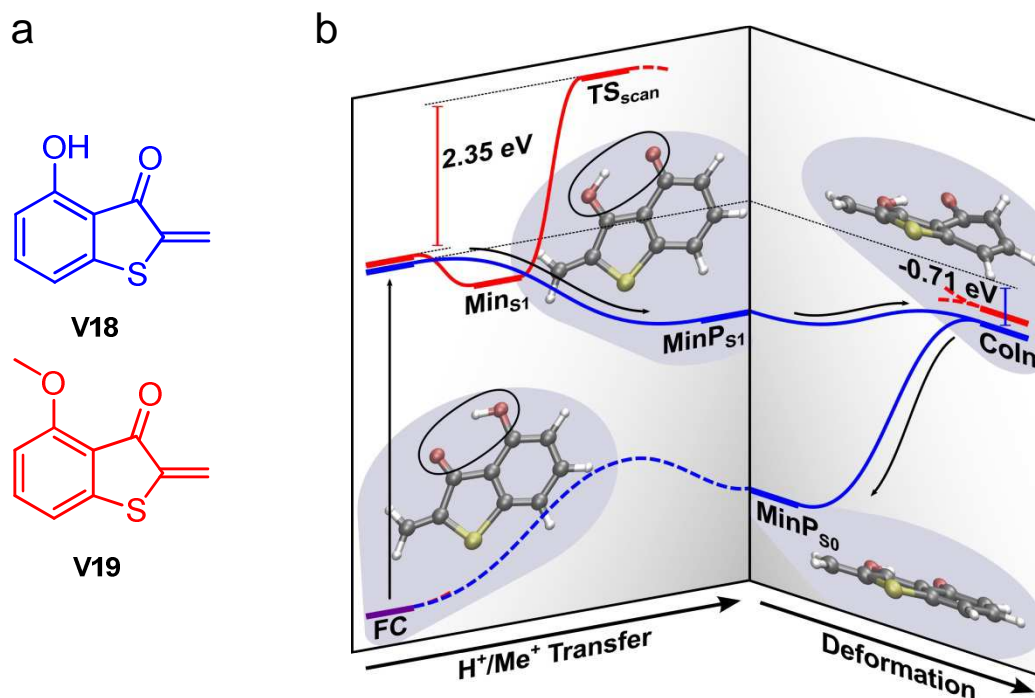
**Abbildung 3.6:** Thioindigoderivate vor und nach sechswöchiger Inkubation bei Tageslicht. (a) Foto der Lösungen. (b), (c) und (d) Absorptionsspektren vor (schwarze Kurve) und nach (rote Kurve) sechswöchiger Inkubation bei Tageslicht (Konzentration  $\sim 0.1$  mM; Schichtdicke der Küvette 0.1 cm).

#### 3.1.2.5 Zeitaufgelöste Spektroskopie und quanten-chemische Rechnungen

Zur weiteren Charakterisierung der Verbindungen (**V5**) und (**V6**) wurden, im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Zinth, von Franziska Graupner und Benjamin Maerz (alle Ludwig-Maximilians-Universität München) zeitabhängige Messungen der Absorption und Fluoreszenzemission in einer Zeitskala von Pikosekunden durchgeführt. Hierdurch konnten die Lebensdauern der angeregten Zustände des 4,4'-Dimethoxythioindigos und des 4,4'-Dihydroxythioindigos zu 11 ns bzw. 50 ps bestimmt werden (Dittmann *et al.*, 2014a). Dies bedeutet, dass die Lebensdauer des angeregten Zustandes des 4,4'-Dihydroxythioindigo einen 200-fach kleineren Wert aufweist, als die des 4,4'-Dimethoxythioindigo.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass sich die Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren der ersten angeregten Zustände der Verbindungen (**V5**) und (**V6**) stark ähnelten, so dass die Lebensdauern der angeregten Zustände den Hauptunterschied darstellen. Folglich sollte der erste Übergang aus dem Franck-Codon-Bereich zu ähnlichen Zwischenstufen führen. Im Folgenden sollte ein Protonentransfer in Verbindung (**V5**) den Übergang aus dem S1-Zustand in den Grundzustand vermitteln. Im Falle des 4,4'-Dimethoxythioindigos verhindert die Methylgruppe diesen Reaktionspfad und der Übergang zum Grundzustand geschieht hauptsächlich durch Fluoreszenz. Die lange Lebenszeit des S1-Zustandes steigert möglicherweise auch die Bedeutung anderer, destruktiver Abbau-Routen.

Um diese qualitativen Interpretationen zu untermauern, wurden in einem weiteren Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Professor Regina de Vivie-Riedle von Sven Oesterling (beide Ludwig-Maximilians-Universität München) quanten-chemische Rechnungen an den Modellverbindungen (**V18**) und (**V19**) durchgeführt. Bei diesen wurde eine Hälfte des Thioindigogerüsts durch eine CH<sub>2</sub> Gruppe ersetzt.



**Abbildung 3.7:** (a) Für die quanten-chemischen Rechnungen eingesetzte Modellverbindungen. (b) Besondere Punkte der Potentialhyperfläche im Grund- und Angeregten Zustand bei Photoreaktion der Modellverbindungen (V18) und (V19). Der Prozess ist durch zwei Koordinaten dargestellt. Einerseits ein Protonen- und Methylkationtransfer; andererseits eine Bewegung aus der Molekülebene des Phenylringes (Abbildung übernommen aus Dittmann *et al.*, 2014a).

Bei den Simulationen wurde für beide Moleküle ein konischer Übergang zum elektronischen Grundzustand gefunden (Abbildung 3.7). Um diesen zu erreichen, müssen die Verbindungen einen Protonentransfer (V18) bzw. einen Methyltransfer (V19) und eine Bewegung aus der Molekülebene durchlaufen. Dabei erfolgt der Protonentransfer im Modellsystem (V18) barrierefrei. Im kompletten 4,4'-Dihydroxythioindigo sollte nur eine kleine energetische Barriere vorhanden sein. Der Methylkationtransfer kann wegen einer sehr großen Barriere nicht ablaufen, was zu einer langen Lebensdauer des angeregten Zustandes und einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute von Verbindung (V6) führt.

– Zusammenfassung Kapitel 3.1 –

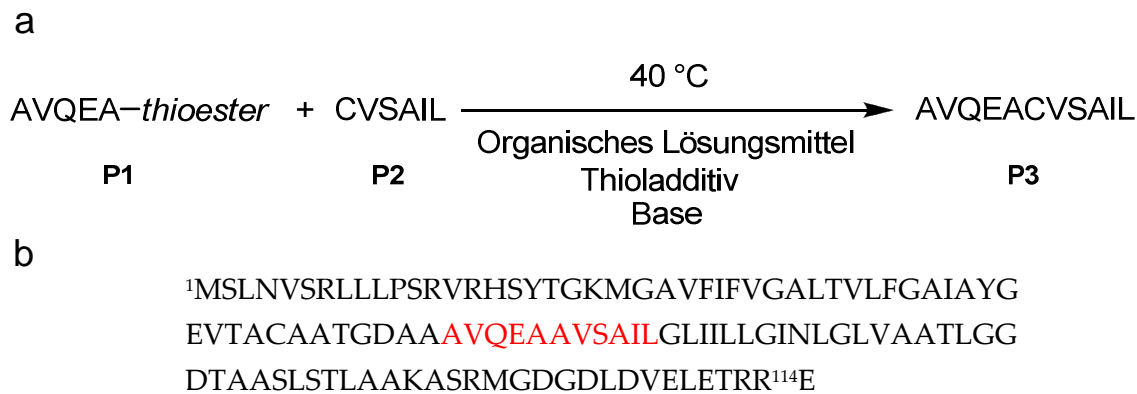
In diesem Kapitel wurden mechanistische Untersuchungen zur Photoisomerisierung des Thioindigos – des Grundchromophors des bereits in Peptide eingebauten HTI-Photoschalters – durchgeführt. Eine zentrale Fragestellung lautete, ob ein Protonentransfer im Hemithioindigo-Teil ausreichend ist, um eine hohe Photostabilität zu gewährleisten. Zum Test dieser Hypothese wurde eine chemische Synthese der Farbstoffe 4,4'-Dihydroxythioindigo und 4,4'-Dimethoxythioindigo mit einer Gesamtausbeute von 25% bzw. 30% entwickelt. Während 4,4'-Dimethoxythioindigo eine ausgeprägte Fluoreszenz und eine *trans-cis*-Isomerisierung zeigte, bewirkte die Einführung der Hydroxygruppe in 4,4'-Position eine Deaktivierung des Moleküls. 4,4'-Dihydroxythioindigo zeigte in allen getesteten Lösungsmitteln keine *trans-cis*-Isomerisierung. Die gemessene Fluoreszenz in Emissionsspektren war im Vergleich zu Thioindigo und 4,4'-Dimethoxythioindigo verringert. In Chloroform wurde für 4,4'-Dimethoxythioindigo eine Fluoreszenzquantenausbeute von 0.97, für 4,4'-Dihydroxythioindigo eine von < 0.01 festgestellt. Zur weiteren Charakterisierung der Verbindungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Zinth (Ludwig-Maximilians-Universität München) zeitabhängige Messungen der Absorption und Fluoreszenzemission in einer Auflösung von Pikosekunden durchgeführt. Hierdurch konnten die Lebensdauern der angeregten Zustände des 4,4'-Dimethoxythioindigos und des 4,4'-Dihydroxythioindigos zu 11 ns bzw. 50 ps bestimmt werden. Da sich 4,4'-Dihydroxyindigo und 4,4'-Dimethoxythioindigo nur durch die Substituenten an Position 4,4' unterscheiden, ist ein Protonentransfer im angeregten Zustand, ebenso wie bei Indigo und bei vielen UV-Stabilisatoren (Kramer, 1990; McGarry *et al.*, 1997), für die Deaktivierung des Moleküls verantwortlich. Unterstützt wird diese Aussage durch die Eigenschaften des ebenfalls synthetisierten 4-Methoxy-4'-Hydroxythioindigos (V7). Dieses weist in einer Lösung in Chloroform – in Analogie zum 4,4'-Dihydroxythioindigo – eine nur geringe Fluoreszenzintensität auf. Darüber hinaus konnte keine *trans-cis*-Isomerisierung nachgewiesen werden. Nach Durchführung der mechanistischen Untersuchungen zur Photoisomerisierung des Thioindigos sollen in den nächsten Kapiteln die methodischen Voraussetzungen für den Einbau eines Photoschalters in das Transducerprotein *NpHtrII* etabliert werden.



### 3.2 Native Chemische Ligation in Dimethylformamid

Die NCL von transmembranen Peptiden ist auf Grund der schlechten Löslichkeit von hydrophoben Peptiden mit großen Schwierigkeiten behaftet. Durch den Zusatz von Detergenzien, Lipiden oder chaotropen Ionen zu wässrigen Puffersystemen wurde versucht diese Peptide zu lösen und so eine NCL zu ermöglichen (Übersicht in Olschewski und Becker, 2008; Shen *et al.*, 2011). Trotz vereinzelter Erfolge existiert zurzeit keine allgemeingültige Methode für die Ligation transmembraner Peptide. Da sich transmembrane Peptide in bestimmten organischen Lösungsmitteln lösen (Johnson und Kent, 2006b), werden in dieser Arbeit systematische Studien zur Durchführung einer NCL in organischen Lösungsmitteln durchgeführt.

Zur Analyse verschiedener Reaktionsszenarien wurden die in Abbildung 3.8 (a) gezeigten Modellpeptide mittels Boc-Festphasenpeptidsynthese synthetisiert und über HPLC aufgereinigt. Die Sequenzen der Peptide stammten aus der Membrandomäne des archaebakteriellen Transducerproteins *NpHtrII* (Abbildung 3.8 (b)) und erlauben eine potentielle Ligationsstelle für die Synthese der kompletten Membrandomäne zu testen (siehe Kapitel 3.3). Das Peptid AVQEA-SL (**P1**; **S** bezeichnet den verwendeten Thioester -SCH<sub>2</sub>CO-) umfasst dabei die Aminosäuren 55 bis 59 und das Peptid CVSAIL (**P2**) die Aminosäuren 60 bis 65, welche das N-terminale Ende der zweiten transmembranen Helix bilden. Zunächst wurden vier organische Lösungsmittel getestet, ob eine NCL in ihnen durchgeführt werden kann: DMF, NMP, DMSO und TFE. Hierbei stellen DMF, NMP und DMSO polar-aprotische Lösungsmittel dar, welche dafür bekannt sind transmembrane Peptide solubilisieren zu können (Johnson und Kent, 2006b). TFE wurde als Cosolvens in NCL eingesetzt (Kochendoerfer *et al.*, 1999).



**Abbildung 3.8:** (a) NCL in organischen Lösungsmitteln (Thioester =  $\sim\text{SCH}_2\text{COLeu}$ ). Die Reaktionen wurden in vier organischen Lösungsmitteln durchgeführt (DMF, NMP, DMSO und TFE). Benzylmercaptan, Thiophenol oder MPAA wurden als Thioladditive verwendet; Triethylamin als Base (Dittmann *et al.*, 2010). (b) Die 114 Aminosäuren umfassende Membrandomäne des Transducerproteins *NpHtrII* (Seidel *et al.*, 1995). Die Sequenz der Modellpeptide ist in rot hervorgehoben. Da die native Sequenz kein Cystein beinhaltet, wurde ein Cystein anstelle des Alanin-Restes 60 eingefügt.

In wässrigem Milieu wird die NCL in der Regel bei pH 6 bis 8 durchgeführt, da hierdurch die Nukleophilie des N-terminalen Cysteins am C-terminalen Peptides gegenüber geringeren pH-Werten erhöht wird. Um die Nukleophilie des N-terminalen Cysteins in organischen Lösungsmitteln zu erhöhen, wurde in der Folge die Base Triethylamin eingesetzt. Darüber hinaus wurden – in Analogie zur NCL in wässriger Lösung – im Überschuss Thioladditive hinzugegeben. Dies hatte zum Ziel den im Peptid AVQEA-SL vorhandenen Alkylthioester in einen Arylthioester umzuwandeln, welcher eine höhere Reaktivität besitzt (Dawson *et al.*, 1994; Johnson und Kent, 2006a). Hierfür wurden Thiophenol oder MPAA ausgewählt. Thiophenol alleine oder in Kombination mit Benzylmercaptan werden standardmäßig als Thioladditive eingesetzt (Hackeng *et. al.*, 1999). MPAA besitzt eine vergleichbare Reaktivität (Johnson und Kent, 2006a), ist darüber hinaus geruchsneutral und wurde in den letzten Jahren als Thioladditiv eingesetzt (z. B.: Torbeev and Kent, 2007; Durek *et al.*, 2007; Wintermann und Engelbrecht, 2013).

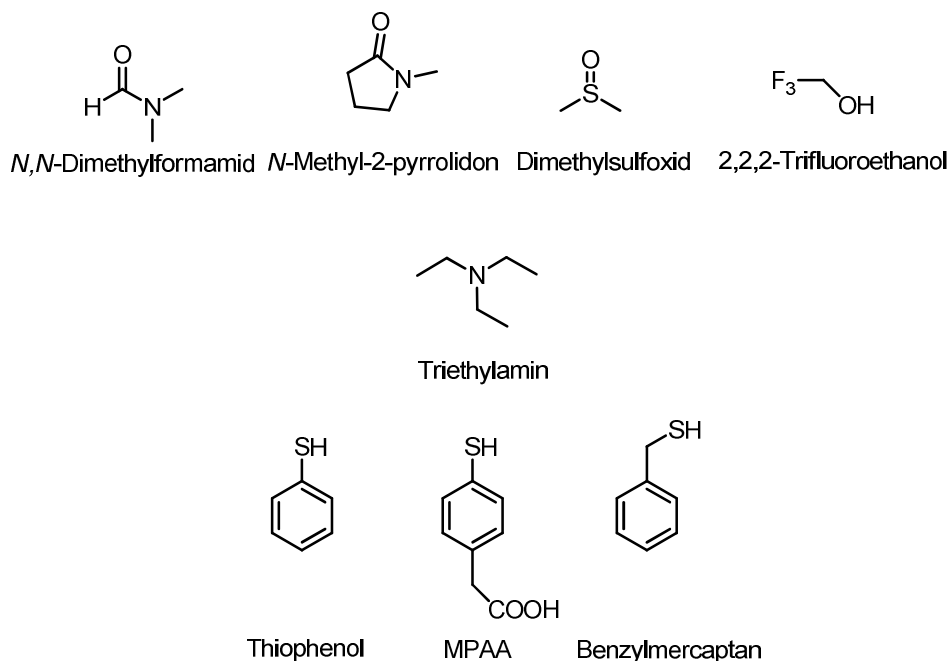
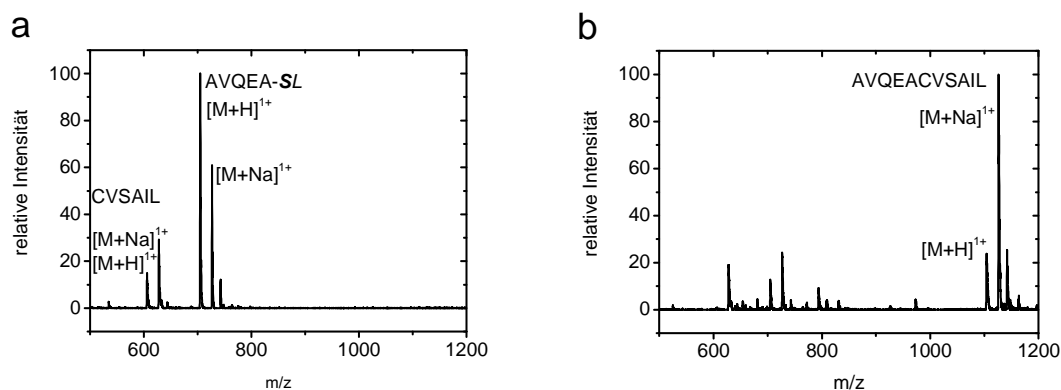


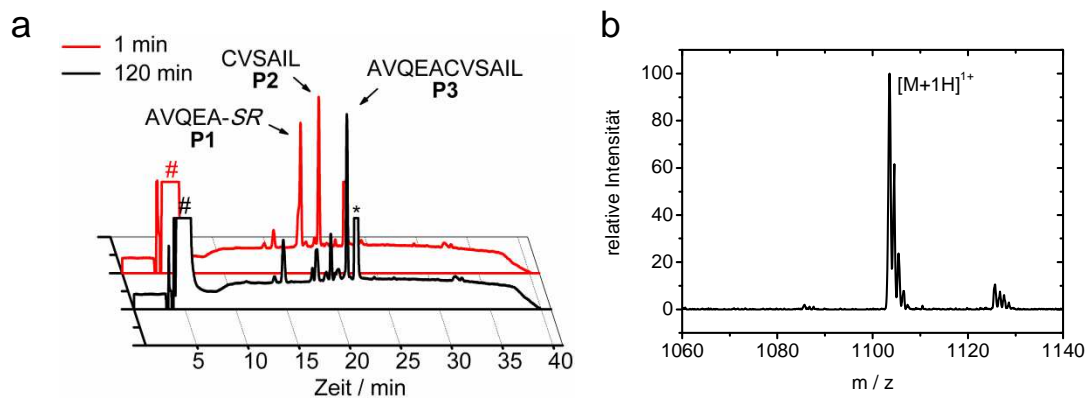
Abbildung 3.9: Reagenzien und Lösungsmittel.

Zunächst wurden verschiedene Reaktionsszenarien untersucht, indem die Peptide in den jeweiligen Lösungsmitteln gelöst und mittels ESI-MS, d. h. ohne vorherige Aufreinigung, auf die Bildung des Ligationsproduktes hin analysiert wurden. Ohne Zugabe von Triethylamin wurde in allen Lösungsmitteln kein Ligationsprodukt nachgewiesen. Daraufhin wurden den Reaktionsansätzen sowohl 20 mM TEA als auch 20 mM MPAA hinzugegeben. Abbildung 3.10 (a) zeigt die Reaktion in DMF vor Reaktionsbeginn. Man beobachtet Peaks bei  $m/z$ -Werten von 605.8, 627.9, 704.8 bzw. 726.7, welche jeweils den Peptiden und deren Natriumaddukten zugeordnet werden können. Nach einer Reaktionszeit von 120 min wurde je ein Peak bei 1104.1  $m/z$  bzw. 1126.1  $m/z$  beobachtet, was dem erwarteten  $m/z$ -Wert des protonierten Ligationsproduktes (**P3**) bzw. dem des Natriumadduktes entspricht (Abbildung 3.10 (b)). Analoge Beobachtungen konnten bei den Ligationsansätzen in den anderen drei Lösungsmitteln festgestellt werden.



**Abbildung 3.10:** NCL in DMF (20 mM TEA, 20 mM MPAA, 40 °C). (a) ESI-MS vor Reaktionsbeginn. (b) ESI-MS nach einer Reaktionszeit von 120 min.

Daraufhin wurden die Ligationsansätze mittels HPLC untersucht, um die Ligationsausbeute zu quantifizieren. Abbildung 3.11 (a) zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm der Ligation in DMF nach einer Reaktionszeit von 1 bzw. 120 min. Hierzu wurde eine C18-Säule und Gradient 1 verwendet (siehe Kapitel 2.3.3.1). Nach 1 min erkennt man zwei charakteristische Peaks bei 17.5 und 19.3 min, die den Edukten zugeordnet werden konnten. Nach 120 min sinkt deren Intensität deutlich und ein neuer Peak bei 20.9 min erscheint. Dieser wurde mittels ESI-MS analysiert und dem Ligationsprodukt (**P3**) zugeordnet (Abbildung 3.11 (b)).



**Abbildung 3.11:** (a) HPLC-Analyse der Ligation nach 1 min (rote Kurve) und nach 120 min (schwarze Kurve) ( $R = \sim \text{CH}_2\text{COLeu}$ ; Reaktionsbedingungen: Konzentration der Peptide 3.5 mM, 20 mM Triethylamin und 20 mM MPAA in DMF, 40 °C). Die Peaks, welche vom DMF (#) und MPAA (\*) herrührten, wurden verkürzt dargestellt. Es wurden eine C18-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 1 verwendet. Die Absorptionmessung erfolgte bei 214 nm. (b) ESI-MS des Peaks bei 20.9 min ( $[\text{M}+\text{H}]^+$  theoretisch, monoisotopisch: 1103.6;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  gemessen: 1103.5) (Dittmann *et al.* 2010).

Tabelle 3.5 fasst die Ergebnisse der Ansätze in den verschiedenen Lösungsmitteln zusammen. Die Ausbeuten wurden durch Integration der Peakflächen ermittelt, wobei die Berechnung in Kapitel 2.5.8.3 beschrieben ist.

**Tabelle 3.5:** Ligation in organischen Lösungsmitteln. Alle Ligationen wurden bei 40 °C durchgeführt. Konzentration der Peptide: 3.5 mM.

Lösungsmittel	Base	Thioladditiv	Ausbeute
DMF	20 mM TEA	20 mM MPAA	59%
NMP	20 mM TEA	20 mM MPAA	42%
DMSO	20 mM TEA	20 mM MPAA	25%
TFE	20 mM TEA	20 mM MPAA	6%

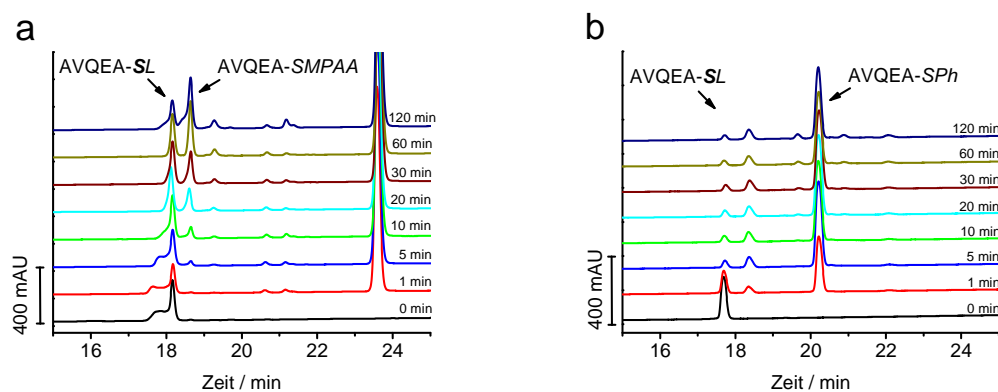
Die Ergebnisse zeigen, dass die NCL erfolgreich in den untersuchten Lösungsmitteln durchgeführt werden konnte. Die Ausbeute in DMF betrug nach 2 h 59%, was bedeutet, dass die NCL schnell und mit einer guten Ausbeute abgelaufen ist. Die Ausbeute in NMP nahm einen vergleichbaren Wert von 43% an. Die geringe Ausbeute in TFE kann mit der Acidität des Lösungsmittels erklärt werden, welche möglicherweise dazu führt, dass der S → N Acylshift bzw. die Umesterung zum Arylthioester nicht effektiv ablaufen.

Für weitergehende Untersuchungen wurde Dimethylformamid als Lösungsmittel ausgewählt, da es sowohl die höchsten Ausbeuten lieferte, als auch einen im Vergleich zum NMP deutlich geringeren Siedepunkt (Siedepunkt DMF: 153 °C; NMP: 204 °C; RÖMPP Online, abgerufen am 20.11.2013) besitzt. Dies ist für die der Ligation nachfolgende HPLC-Aufreinigung bedeutsam. Für präparative Aufreinigungen müssen nach einem Ligationsexperiment größere Mengen eines organischen Lösungsmittels entfernt werden, da größere Mengen an DMF, NMP oder DMSO die HPLC-Aufreinigung stören.

### 3.2.1 Untersuchung der Thioester-Umesterung

In Abschnitt 3.2 wurde die Zugabe von MPAA damit begründet, dass hierdurch eine Umesterung vom Alkylthioester zum Arylthioester erfolgen soll. Um diese Um-

terung nachzuweisen und zu quantifizieren, wurde das N-terminale Peptid AVQEA-SL sowohl mit 20 mM TEA, 20 mM MPAA als auch mit 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol inkubiert und der Verlauf der Reaktion mittels analytischer HPLC verfolgt. Die neu entstehenden Peaks bei 18.6 (Abbildung 3.12 (a)) und 20.2 min (Abbildung 3.12 (b)) wurden gesammelt, mittels ESI-MS analysiert und den Umesterungsprodukten AVQEA-SMPAA (P4) bzw. AVQEA-SPh (P5) zugeordnet.



**Abbildung 3.12:** Umesterung von AVQEA-SL (P1) in DMF. (a) 20 mM TEA, 20 mM MPAA, 40 °C. (b) 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, 40 °C. Die Konzentration von AVQEA-SL betrug 3.5 mM. Es wurden eine C18-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 1 verwendet. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 214 nm.

Bei einer Umesterung mittels 20 mM TEA, 20 mM MPAA beobachtet man nach einer Reaktionszeit von 2 h ein Verhältnis von Alkylthioester zum Arylthioester von etwa 1:1 (zur Bestimmung der Ausbeute siehe Kapitel 2.5.8.3). Der Extinktionskoeffizient des Arylthioesters AVQEA-SPh bei 214 nm ist dabei um einen empirisch bestimmten Faktor 1.9 größer als der des Alkylthioesters AVQEA-SL, daher wurden die aus den Chromatogrammen erhaltenen Flächen um diesen Betrag korrigiert. Aus Abbildung 3.12 (b) ist abzuleiten, dass die Umesterung mittels 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol nach 10 min mit einer Ausbeute von 85% abgelaufen ist. Grund für den Unterschied ist die abweichende Konzentration des Thioladditivs. Werden 20 mM MPAA eingesetzt, entspricht dies etwa einem 6-fachen Überschuss Thioladditiv zu Peptid; bei 300 mM etwa einem 86-fachen Überschuss. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der durchgeführten Messreihe belegen, dass eine Umesterung zum Arylthioester unter den untersuchten Bedingungen erfolgt.

### 3.2.2 Mechanistische Untersuchungen

Um den Einfluss von Basenkonzentration, Temperatur und Thioladditiven auf die Effizienz der NCL in DMF zu quantifizieren, wurden die in Tabelle 3.6 dokumentierten Ligationen mit den Peptiden AVQEA-SL und CVAIL durchgeführt und die Ausbeute nach einer Reaktionszeit von 2 h mittels HPLC bestimmt.

Bei Erhöhung der Basenkonzentration auf 80 mM wird bei einer Ligation mit 300 mM Thiophenol im Rahmen der Messgenauigkeit ( $\pm 3\%$ ) kein Einfluss festgestellt (64% Ausbeute bei 80 mM und 65% bei 20 mM), bei einer Ligation mit 20 mM MPAA wird eine Verringerung der Ausbeute (26% Ausbeute bei 80 mM und 59% bei 20 mM) festgestellt. Bei dem Einsatz von 1 mM TEA wird eine Ausbeute von  $< 1\%$  festgestellt; sowohl bei einer Ligation mit 20 mM MPAA als auch bei einer Ligation mit 300 mM Thiophenol.

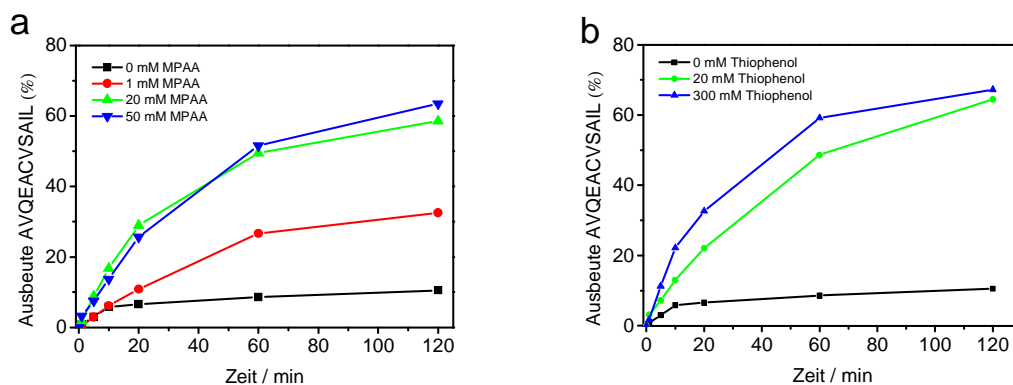
Bei Erhöhung der Reaktionstemperatur wird bei einer Ligation mit 300 mM, 20 mM TEA im Rahmen der Messgenauigkeit ( $\pm 3\%$ ) keine Veränderung beobachtet (67% Ausbeute bei Raumtemperatur und 65% bei 40 °C). Bei einer Ligation mit 20 mM MPAA und 20 mM TEA hingegen kommt es zu einer Verringerung der Ausbeute auf 40% bei Raumtemperatur im Vergleich zu 59% bei 40 °C.

**Tabelle 3.6:** Untersuchung des Einflusses von Basenkonzentration, Temperatur und Thioladditiven.

Reaktionsbedingungen	Ausbeute nach 2 h	Bildung eines Niederschlages
3.5 mM von jedem Peptid 80 mM Triethylamin 300 mM Thiophenol 40 °C	64%	Ja
3.5 mM von jedem Peptid 80 mM Triethylamin 20 mM MPAA 40 °C	26%	Ja
3.5 mM von jedem Peptid 20 mM Triethylamin 300 mM Thiophenol 40 °C	65	Ja
3.5 mM von jedem Peptid 20 mM Triethylamin 20 mM MPAA 40°C	59%	Ja
3.5 mM von jedem Peptid 1 mM Triethylamin 300 mM Thiophenol 40 °C	<1%	Nein
3.5 mM von jedem Peptid 1 mM Triethylamin 20 mM MPAA 40 °C	<1%	Nein
3.5 mM von jedem Peptid 20 mM Triethylamin 300 mM Thiophenol RT	67%	Ja
3.5 mM von jedem Peptid 20 mM Triethylamin 20 mM MPAA RT	40%	Ja
3.5 mM von jedem Peptid 20 mM Triethylamin 50 mM MPAA 40 °C	63%	Ja
3.5 mM von jedem Peptid 20 mM Triethylamin 1 mM MPAA 40 °C	33%	Ja
3.5 mM von jedem Peptid 20 mM Triethylamin 20 mM Thiophenol 40 °C	64%	Ja
3.5 mM von jedem Peptid 20 mM Triethylamin 40 °C	11%	Ja



Um den Einfluss der Thiolkonzentration auf die Effizienz der NCL in DMF zu ermitteln, wurden verschiedene Ligationen durchgeführt und zu ausgewählten Zeitpunkten mittels HPLC analysiert (Abbildung 3.13). Die Berechnung der Ausbeute des Ligationproduktes AVQEACVSAIL wurde, wie in Kapitel 2.5.8.3 beschrieben, durchgeführt.



**Abbildung 3.13:** Analyse der Ligation zwischen AVQEA-SL (**P1**) und CVAIL (**P2**). Dargestellt ist die Ausbeute an AVQEACVSAIL (**P3**) in Prozent in Abhängigkeit der Reaktionszeit und der Konzentration an MPAA (a) bzw. Thiophenol (b). Reaktionsbedingungen: 20 mM Triethylamin in DMF, 40 °C. Die Peptidkonzentration betrug in allen Experimenten 3.5 mM.

Es lässt sich feststellen, dass bei Zugabe von 20 mM MPAA oder 20 mM Thiophenol die Ausbeute nach 2 h unabhängig vom eingesetzten Arylthiol etwa 60% beträgt. Die Ausbeute kann durch Erhöhung der Thiolkonzentration nicht mehr wesentlich gesteigert werden. Ohne die Zugabe eines Thioladditivs wird nach 2 h eine Ausbeute von 11% erhalten. Dieser Unterschied macht deutlich, dass für eine effiziente Ligation ein Thioladditiv, wie zum Beispiel MPAA oder Thiophenol, benötigt wird.

Da die Ausbeute der NCL durch Zugabe der Arylthiole deutlich erhöht wird, sollte bei einem Ligationsexperiment zunächst die Umwandlung des C-terminalen Alkylthioesters in ein Arylthioester erfolgen und im nächsten Schritt der nukleophile Angriff des N-terminalen Cysteins auf den aktivierten Thioester. Unterstützt wird diese Vermutung durch die durchgeführten Untersuchungen zur Umesterung des Peptides AVQEA-SL zum AVQEA-SPh (Kapitel 3.2.1). Die Umersterung wurde ohne Zugabe des C-terminalen Peptides mittels HPLC verfolgt (Abbildung 3.12 (b)), wobei gezeigt wurde, dass bei Verwendung von 300 mM Thiophenol eine nahezu vollständige Umes-

terung innerhalb von 10 min erfolgt. Dies bedeutet, dass unter den Bedingungen der NCL nahezu das gesamte Thioester-tragende Peptid als Arylthioester vorliegt.

Diese Beobachtungen lassen eine Analogie zur NCL im wässrigen Milieu erkennen. Dort werden ebenfalls im Überschuss Thioladditive hinzugegeben. So soll einerseits ein Alkylthioester in einen reaktiveren Arylthioester umgewandelt werden und andererseits die im Peptid vorhandenen Cysteine in einer reduzierten Form erhalten werden.

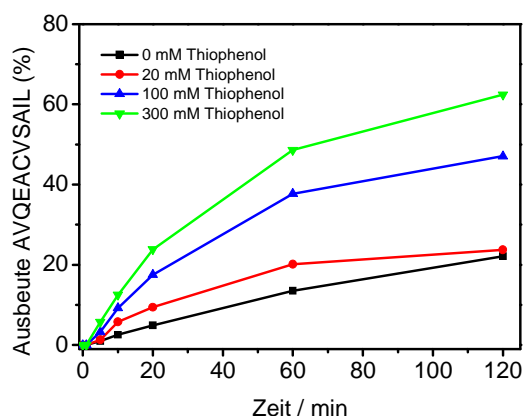
#### 3.2.3 Untersuchung von Additiven

Im Laufe der Ligationen wurde die Bildung eines Niederschlages beobachtet (Tabelle 3.6). Dieser bestand vorwiegend aus dem Ligationsprodukt AVQEACVSAIL und aus verbliebenen Edukten, wobei nach einer Inkubationszeit von 12 h nahezu alle Komponenten als unlösliches Präzipitat vorlagen. Für eine potenzielle Anwendung der NCL in DMF an transmembranen Peptiden sind aber Ligationsbedingungen wünschenswert, bei denen die Edukte möglichst lange in Lösung bleiben. Um dies zu ermöglichen, wurden verschiedene Additive getestet:  $\alpha$ -Cyclodextrin, Lithiumchlorid und Natriumtrifluoracetat. Cyclodextrine sind dafür bekannt, die Löslichkeit hydrophober Verbindungen zu erhöhen (Mannila *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Lithiumchlorid zu einer drastischen Erhöhung der Löslichkeit von Peptiden in organischen Lösungsmitteln führt (Seebach *et al.*, 1989; Robey, 2000). Trifluoressigsäure erleichtert die Auflösung von Protein- oder Peptid-Aggregaten (Sagné *et al.*, 1996).

Wurde 1% (w/v)  $\alpha$ -Cyclodextrin zu der Ligation zwischen AVQEA-SL und CVSAIL gegeben, konnte die Bildung des Niederschlages nicht vermieden oder verringert werden. Die Ligationausbeute blieb unbeeinträchtigt. Durch den Zusatz von 170 mM Natriumtrifluoracetat hingegen konnte die Bildung des Niederschlages verringert werden, wobei die Ligationausbeute auf 1% sank. Durch die Erhöhung der Peptidkonzentration von 3.5 mM auf 14 mM konnte die Ausbeute wiederum auf 11% gesteigert werden.

Die größte Auswirkung hatte die Zugabe von Lithiumchlorid zur Reaktionslösung. Hierbei war der Effekt konzentrationsabhängig. Eine Lithiumkonzentration von 180 mM (etwa 2.6 Lithiumionen pro Peptidbindung) gestattete eine Ligation der beiden Peptide, wenn diese jeweils in einer Konzentration von 3.5 mM eingesetzt wurden. Hierbei wurde über den Zeitraum von Tagen keine Ausfällung der Edukte oder des Produktes AVQEACVSAIL beobachtet. Eine Konzentration von 90 mM Lithiumchlorid (etwa 1.3 Lithiumionen pro Peptidbindung) hingegen konnte das Ausfallen der Komponenten nicht vollständig verhindern. Bei einer Konzentration von 2 M (etwa 29 Lithiumionen pro Peptidbindung) Lithiumchlorid konnte keine Bildung des Ligationsproduktes mehr beobachtet werden; bei 0.5 M (etwa 7 Lithiumionen pro Peptidbindung) betrug die Ausbeute 4%. Interessanterweise hatte die Zugabe von Lithiumchlorid auch Auswirkungen auf das einzusetzende Thioladditiv. Bei Verwendung von 180 mM Lithiumchlorid war nur die Nutzung von 300 mM Thiophenol als Thioladditiv zweckmäßig, wobei Ausbeuten von 62% erreicht werden konnten, was etwa dem Wert ohne Lithiumchlorid entspricht (siehe Tabelle 3.6). Bei Verwendung von 20 mM MPAA oder 6% einer 1:1 Mischung von Benzylmercaptan und Thiophenol konnte die Bildung des Produktes nach 2 h jeweils nur in einer Ausbeute von unter 15% beobachtet werden.

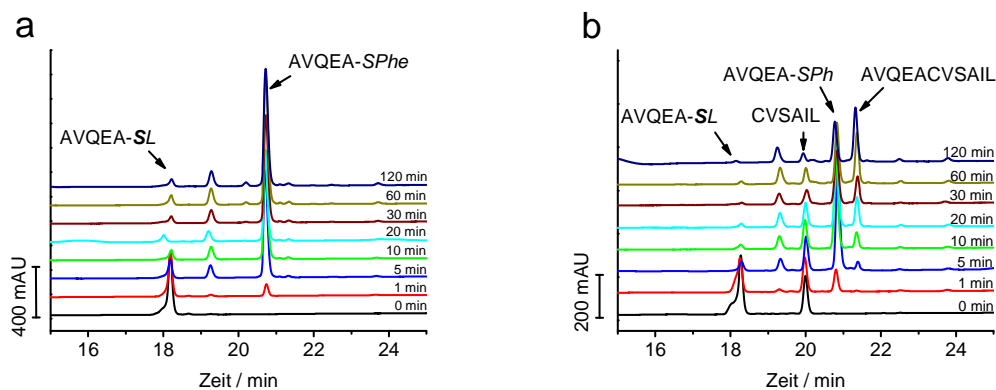
Um den Einfluss der Thiolkonzentration auf die Effizienz der NCL in DMF bei einer Lithiumchloridkonzentration von 180 mM zu ermitteln, wurden die in Abbildung 3.14 gezeigten Ligationen durchgeführt und diese nach ausgewählten Zeiten mittels HPLC analysiert. Die Berechnung der Ausbeute des Ligationsproduktes AVQEACVSAIL wurde, wie in Kapitel 2.5.8.3 beschrieben, durchgeführt.



**Abbildung 3.14:** Analyse der Ligation zwischen AVQEA-SL (P1) und CVAIL (P2). Dargestellt ist die Ausbeute an AVQEACVSAIL (P3) in Prozent in Abhängigkeit der Reaktionszeit und der Thiophenolkonzentration. Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM Triethylamin in DMF, 40 °C. Die Peptidkonzentration betrug in allen Experimenten 3.5 mM.

Man erkennt, dass bei Zugabe von 180 mM Lithiumchlorid eine hohe Thiophenolkonzentration für eine effiziente Ligation notwendig ist. Im Gegensatz zu den Ligationsbedingungen ohne Lithiumchlorid ergibt sich bei einer Thiophenol-Konzentration von 20 mM eine Ausbeute von nur 24% anstatt 64% (ohne 180 mM Lithiumchlorid; siehe Abbildung 3.13 (b)). Bei einer Thiophenolkonzentration von 300 mM wird bei Zugabe von 180 mM Lithiumchlorid eine Ausbeute von 62% erhalten, wobei die ohne Lithiumchlorid zu 65% bestimmt wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in der Folge bei Experimenten mit Zugabe von 180 mM Lithiumchlorid immer eine Thiophenol-Konzentration von 300 mM verwendet.

Nachdem eine Lithiumchloridkonzentration von 180 mM und eine Thiophenolkonzentration von 300 mM als zweckmäßig ermittelt wurden, um sowohl die Peptide in Lösung zu halten als auch eine effiziente Ligation zu gestatten, wurde der Reaktionsverlauf der Umesterung von AVQEA-SL zu AVQEA-SPh und die Ligation zwischen AVQEA-SL und CVSAIL zu ausgewählten Zeitpunkten mittels HPLC analysiert (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15:** Umesterung und Ligation mit Zugabe von 180 mM Lithiumchlorid. (Reaktionsbedingungen: Konzentration der Peptide 3.5 mM, 20 mM Triethylamin, 300 mM Thiophenol und 180 mM Lithiumchlorid in DMF, 40 °C). (a) Analyse der Umesterung von AVQEA-SL (P1). (b) Analyse der Ligation von AVQEA-SL (P1) und CVSAIL (P2). Es wurden eine C18 Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 1 verwendet. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 214 nm. Bei dem Peak um 19.3 min handelt es sich um SL, welches durch die Umesterung mit Thiophenol freigesetzt wurde.

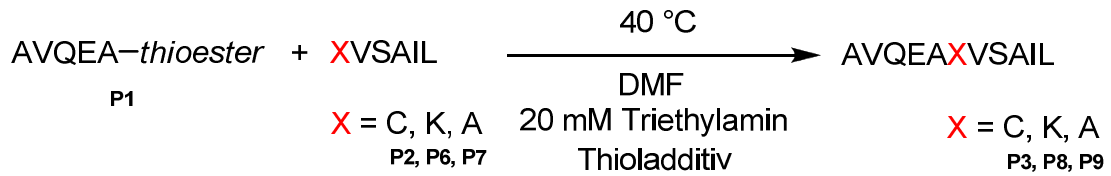
Aus diesen Experimenten geht hervor, dass die Umesterung in annähernd 10 min abgeschlossen ist (Abbildung 3.15 (a)) und analog der Umesterung ohne Lithiumchloridzusatz verläuft (siehe Abbildung 3.12 (b)). Die Analyse der Ligation zwischen AVQEA-SL und CVSAIL lässt erkennen, dass die Umesterung ebenfalls nach etwa 10 min abgeschlossen ist. Es wird die Bildung eines neuen Peaks bei 21.3 min beobachtet, der mittels ESI-MS dem Ligationsprodukt AVQEA-CVSAIL zugeordnet werden konnte. Nach 2 h wird das Ligationsprodukt in einer Ausbeute von 62% gebildet. Durch Analyse der Peaks in Abbildung 3.15 (b) mittels ESI-MS konnte die Entstehung von Nebenprodukten aufgrund des Lithiumchloridzusatzes ausgeschlossen werden, da neben den Edukten und Produkten keine weiteren Peaks mehr auftraten.

Der Effekt des Lithiumchlorids auf die Löslichkeit des Ligationsproduktes und die bei einer NCL zu erzielenden Ausbeute kann nicht mit Sicherheit erklärt werden. Verschiedene Forschungsergebnisse zeigen allerdings, dass Lithiumchlorid die Konformation von gelösten, komplexierten Peptiden massiv verändert, wobei Lithiumionen Komplexe mit den Sauerstoffatomen von Amid-Bindungen eingehen (Rao *et al.*, 1977). Durch NMR-Untersuchungen des 11 Aminosäuren enthaltenen zyklischen Peptides Cyclosporin in D<sub>8</sub>-THF konnte gezeigt werden, dass Lithiumionen die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen hemmen und ungewöhnliche Konformationen des Pep-

tid-Rückgrates (*engl. backbone*) fördern (Kessler *et al.*, 1990; Thaler, 1991; Koeck *et al.*, 1992). So traten in  $^1\text{H-NMR}$ -Experimenten massive Veränderungen der chemischen Verschiebungen der NH-Protonen auf, wobei eine Tieffeldverschiebung von 6.5-8 ppm zu 7.5-9.5 ppm beobachtet wurde und die Veränderungen im Spektrum vorwiegend auf diesen Bereich konzentriert waren. Durch Bestimmung von intramolekularen Abständen mittels NOE-Experimenten (*engl. nuclear Overhauser effect, NOE*) konnte darüber hinaus belegt werden, dass es sich nicht nur um einen Effekt der Solvenspolaritätserhöhung handelt, sondern um Konformationsänderungen. In neueren theoretische Studien wurden ebenfalls die großen Auswirkungen der Komplexierung durch Lithiumionen auf die Konformationen des Peptid-Rückgrates (*engl. Backbone*) und auf vorhandene Wasserstoffbrückenbindungen von Peptiden betont (Baldauf *et al.*, 2013). Daher scheint es plausibel, dass der Zusatz von Lithiumchlorid zu der Ligationslösung in DMF die Ausbildung intermolekularer Wechselwirkungen, wie z.B. Wasserstoffbrücken, hemmt und so eine Aggregation der Peptide verhindert. Die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit des Löslichkeitssteigernden Effektes lässt darauf schließen, dass dazu mindestens 2 bis 2.6 Lithiumionen pro Peptidbindung benötigt werden. Bei einem zu großen Überschuss an Lithiumionen hingegen sinkt die Ausbeute drastisch.

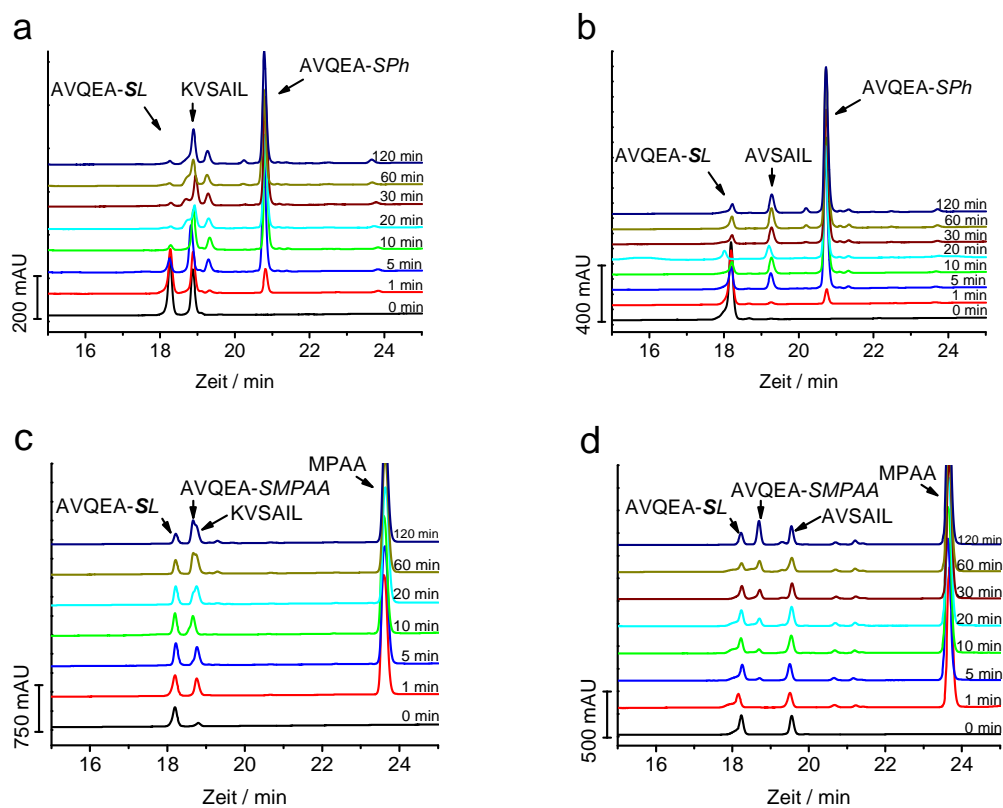
#### 3.2.4 Mögliche Nebenreaktionen: Reaktion mit nukleophilen Gruppen

Um zu testen, ob nukleophile Aminogruppen direkt mit Thioester-tragenden Peptiden reagieren, wurden zwei Peptide, welche kein N-terminales Cystein besaßen, mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt und mit dem Peptid AVQEA-SL (**P1**) inkubiert. Diese Peptide wiesen entweder ein N-terminales Lysin (KVSAIL; **P6**) oder ein N-terminales Alanin (AVSAIL; **P7**) auf. Eine Reaktion mit KVSAIL oder AVSAIL mit AVQEA-SL könnte zu den möglichen Produkten (**P8**) und (**P9**) führen, wobei auch die  $\epsilon$ -Aminogruppe von KVSAIL mit AVQEA-SL reagieren könnte (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16:** Untersuchung zur Chemo Selektivität der NCL in DMF (Thioester =  $\sim\text{SCH}_2\text{COLeu}$ ). Nebenreaktionen der Guanidiniumgruppe von Arginin sind nicht gezeigt; genauso wie das mögliche Additionsprodukt von AVQEA-SL an ein weiteres AVQEA-SL.

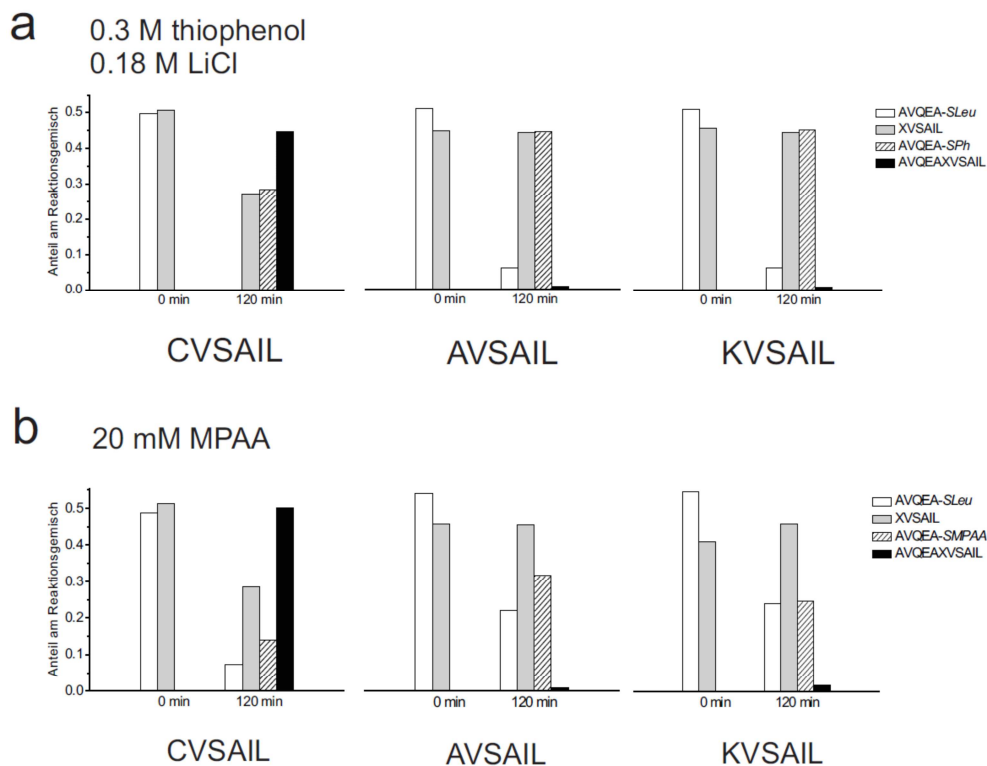
Die verschiedenen Reaktionen wurden entweder in DMF mit 180 mM Lithiumchlorid, 300 mM Thiophenol, 20 mM, TEA bei 40 °C oder in DMF mit 20 mM MPAA, 20 mM TEA bei 40 °C durchgeführt. Proben der Reaktionen wurden zu ausgewählten Zeitpunkten genommen, die Reaktion mit 50% Acetonitril, 50% Wasser, 0.1% TFA gestoppt und mittels HPLC analysiert (Abbildung 3.17).



**Abbildung 3.17:** Chemo Selektivität der NCL in DMF. (a) AVQEA-SL (P1) und KVSAIL (P6). (b) AVQEA-SL (P1) und AVSAIL (P7). Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol in DMF, 40 °C. (c) AVQEA-SL (P1) und KVSAIL (P6). (d) AVQEA-SL (P1) und AVSAIL (P7). Reaktionsbedingungen: 20 mM TEA, 20 mM MPAA in DMF, 40 °C. Es wurden eine C18-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 1 verwendet. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 214 nm.

Hierbei wird die Bildung des Umesterungsproduktes AVQEA-*SPh* (**P5**, Peak bei 20.8 min) beobachtet (Abbildung 3.17 (a) und (b)). Der zeitliche Verlauf entspricht der Umesterung ohne zugegebenes Peptid KVSAIL, AVSAIL oder CSAIL (Abbildung 3.15 (a)). In Analogie dazu erkennt man die Bildung des Umesterungsproduktes AVQEA-SMPAA (**P4**; Peak bei 18.7 min; Abbildung 3.17 (c) und (d)). Der zeitliche Verlauf entspricht wiederum der Umesterung ohne zugegebenes Peptid KVSAIL, AVSAIL oder CSAIL (Abbildung 3.12 (a)). Das Dimerisierungsprodukt von AVQEA-SL an ein weiteres AVQEA-SL wurde in keinem HPLC-Chromatogramm nachgewiesen. Allerdings zeigte eine Analyse der Reaktionslösung mittels ESI-MS diese Masse in einer äußerst geringen Intensität. Darüber hinaus änderte sich die Fläche der Peaks der Peptide KVSAIL bzw. AVSAIL kaum. In den Chromatogrammen in Abbildung 3.17 sind im Maßstab dieser Abbildung keine Peaks der möglichen Nebenprodukte AVQEA-KVSAIL (**P8**) bzw. AVQEAAVSAIL (**P9**) zu beobachten. Durch HPLC-Läufe mit flacheren Gradienten konnten solche mit geringer Intensität detektiert werden. Um quantitative Ergebnisse zu erhalten, wurden der relative Anteil am Reaktionsgemisch durch Integration der Peakflächen gemäß Kapitel 2.5.8.3 bestimmt und mit denen der Ligationen in Abbildung 3.15 (b) und in Abbildung 3.11 verglichen (Abbildung 3.18).



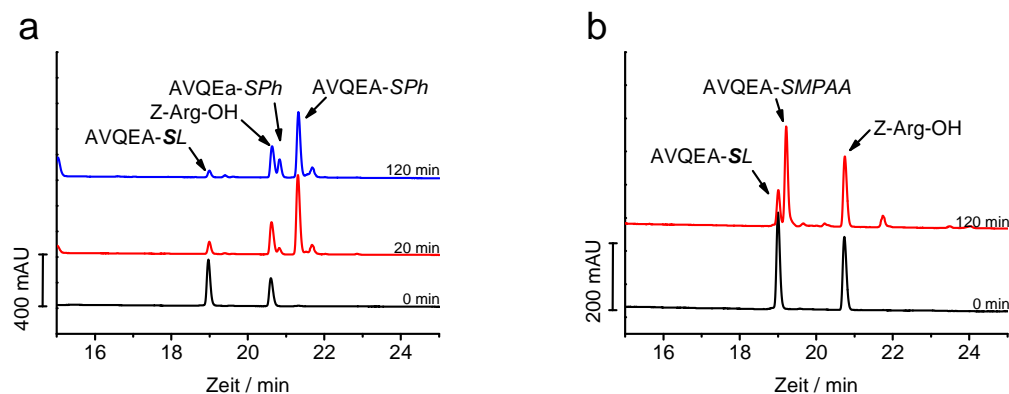


**Abbildung 3.18:** NCL in DMF. Dargestellt sind die relativen Anteile der Komponenten an dem Reaktionsgemisch. Ihre Summe ist auf eins normiert. (a) Reaktionsbedingungen: 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, 180 mM Lithiumchlorid in DMF. (b) Reaktionsbedingungen: 20 mM TEA, 20 mM MPAA in DMF. (*SLeu* = SCH<sub>2</sub>COLeu; X = Cys (**P2**), Ala (**P7**), oder Lys (**P6**)). Der relative Anteil am Reaktionsgemisch von AVQEA-CVSAIL (**P3**) betrug (46 ± 3)%. (Bestimmt für drei unabhängig durchgeführte Ligationsexperimente; Dittmann *et. al.*, 2012).

Es zeigte sich, dass in beiden untersuchten Systemen nur geringe Mengen des Thioesters (< 2%) mit primären Aminen reagierten. Andererseits ist die Reaktion mit einem N-terminalen Cystein deutlich begünstigt, so dass der relative Anteil des Ligationproduktes AVQEACVSAIL am Reaktionsgemisch nach 2 h etwa 50% betrug und mögliche Nebenprodukte nicht beobachtet wurden (Nachweisgrenze < 1%). Die Umwandlung von AVQEA-SL in die entsprechenden Arylthioester konnte in allen Experimenten beobachtet werden. Diese Ergebnisse bedeuten, dass Aminogruppen nur im äußerst geringen Maße mit den aktivierten Thioester-tragenden Peptiden reagieren. In Gegenwart eines N-terminalen Cysteins ist die NCL deutlich begünstigt, so dass keine Nebenprodukte auftreten.

In weiteren Experimenten wurde die Guanidinium-Gruppe von Arginin als möglicher Reaktionspartner getestet. Dazu wurde kommerziell erworbenes Z-geschütztes Argi-

nin eingesetzt, welches mit dem N-terminalen Peptid AVQEA-SL inkubiert wurde. Dabei wurden ebenfalls die zwei in Abbildung 3.17 und 3.18 untersuchten Ligationssysteme getestet.



**Abbildung 3.19:** Mögliche Reaktion von AVQEA-SL (**P1**) mit Z-Arg-OH. (a) Reaktionsbedingungen: 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, 180 mM Lithiumchlorid in DMF, 40 °C. (b) Reaktionsbedingungen: 20 mM TEA, 20 mM MPAA in DMF, 40 °C. Der Peak bei 21.7 min stellt SL dar. Es wurden eine C18-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 1 verwendet. Die Absorptionmessung erfolgte bei 214 nm.

Es wurde die Umesterung von AVQEA-SL zum jeweiligen Arylthioester beobachtet (Abbildung 3.19 (a) und (b)). Nach einer Reaktionszeit von 120 min ist die Entstehung eines zusätzlichen Peaks bei 20.8 min (gemessen  $m/z$  609.4) zu erkennen, welcher nach Analyse mittels ESI-MS der gleichen Masse zugeordnet werden konnte wie der Peak des Umesterungsproduktes AVQEA-SPh (**P5**) (21.3 min, gemessen  $m/z$  609.2; Abbildung 3.19 (a)). Das Vorhandensein von zwei Peaks mit identischen Massen deutet auf eine mögliche Epimerisierung des Peptides hin. Daher wurde dieser Peak dem Epimer AVQEA-SL (**P10**) zugeordnet. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Intensitäten der vom Z-Arg-OH herrührenden Peaks nicht abgenommen haben. Darüber hinaus konnte kein Peak im Chromatogramm einem möglichen Additionsprodukt zugeordnet werden. Dies zeigt, dass auch die Guanidiniumgruppe des Arginins unter den Versuchsbedingungen inert gegen eine Reaktion mit dem C-terminalen Thioester-tragenden Peptid ist.

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, dass die NCL in DMF chemoselektiv verläuft. Daher besteht keine Notwendigkeit für den Einsatz zusätzlicher Seitenschutzgruppen.

### 3.2.5 Mögliche Nebenreaktionen: Epimerisierung

Eine weitere mögliche Nebenreaktion der NCL in DMF besteht in der Epimerisierung des N-terminalen Thioester-tragenden Peptides. Durch den bei der NCL in DMF ablaufenden Thioesteraustausch vom Alkylthioester zum Arylthioester wird der pKa der Thioester-benachbarten C-H Bindung verringert. In Gegenwart einer Base – z. B. TEA – könnte eine Epimerisierung des N-terminalen Thioester-tragenden Peptides auftreten.

Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden die zwei in Kapitel 3.2.4 untersuchten Ligationsbedingungen zur Synthese eines Tripeptides eingesetzt. Das N-terminale Edukt war A-SL (**P11**) und das C-terminale das Dipeptid CV (**P12**). Die möglichen Reaktionsprodukte ACV (**P13**) oder aCV (**P14**) wurden mittels Festphasenpeptidsynthese dargestellt und konnten mit einer C18-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 6 getrennt werden (Abbildung 3.21 (I)). Abbildung 3.20 verdeutlicht das experimentelle Vorgehen.

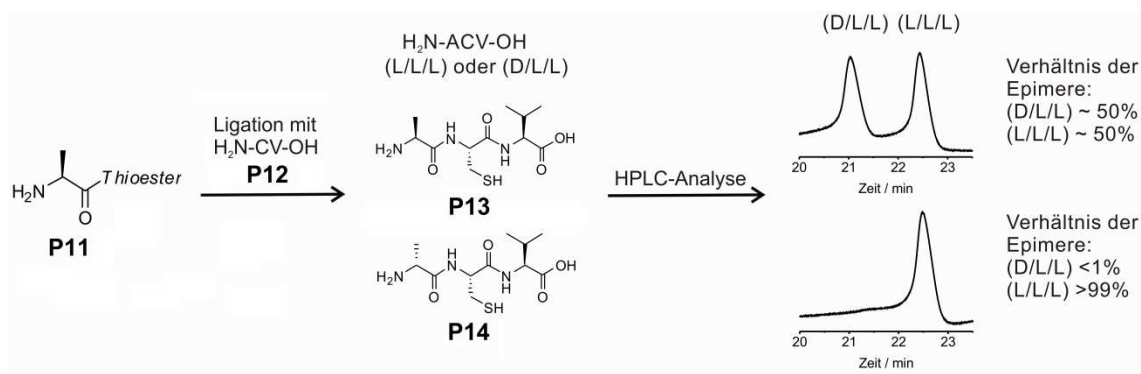
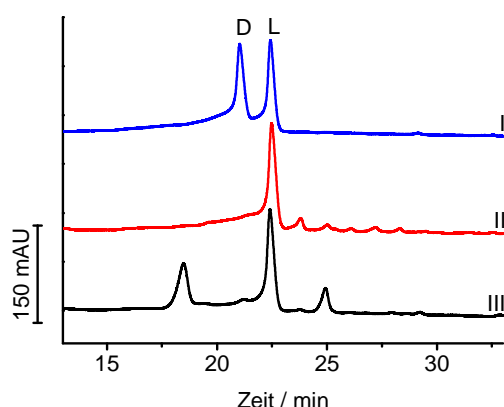


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung des Epimerisierungstestes.



**Abbildung 3.21:** Epimerisierung während der NCL in DMF untersucht durch die Synthese des Tripeptides ACV. (I) aCV (**P14**) und ACV (**P13**) synthetisiert mittels Festphasenpeptidsynthese; (II) NCL in DMF mit 20 mM TEA, 20 mM MPAA, 40 °C; (III) NCL in DMF mit 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, 180 mM Lithiumchlorid, 40 °C. Die Peaks bei 17.5 und 25 min wurden mittels ESI-MS analysiert, wobei keine Massen nachgewiesen werden konnten. Das Peptid ACV ist mit L markiert und Peptid aCV mit D. Für die HPLC-Analyse wurde eine C18-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 6 verwendet. Die Absorptionmessung erfolgte bei 214 nm (Dittmann *et. al.*, 2012).

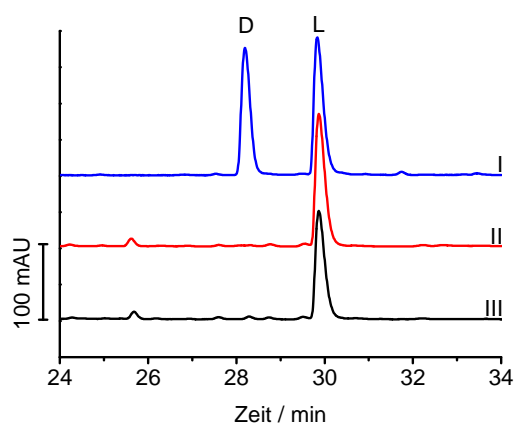
Während der Reaktion von A-SL mit CV wurde kein D-Epimer gebildet (Abbildung 3.21). Um herauszufinden, ob der Thioester A-SL unter den Versuchsbedingungen überhaupt zur Epimerisierung neigt, wurde A-SL 2 h in den jeweiligen Ligationsbedingungen inkubiert und in der Folge mit dem Peptid CV umgesetzt. Die Reaktion wurde nach eine Stunde durch die Zugabe von Wasser, 0.1% TFA gestoppt. Nach Entfernung des organischen Lösungsmittels im Vakuum wurde die Reaktion mittels HPLC analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

**Tabelle 3.7:** Epimerisierung während der NCL in DMF untersucht durch die Synthese des Tripeptides ACV. TEA (20 mM TEA) wurde in allen Experimenten als Base verwendet (Dittmann *et. al.*, 2012).

Reaktionsbedingungen	ACV ( <b>P13</b> )	aCV ( <b>P14</b> )
20 mM MPAA	97%	3%
20 mM Thiophenol	97%	3%
20 mM Thiophenol / 0.18 M LiCl	89%	11%
0.3 M Thiophenol	64%	36%
0.3 M Thiophenol / 0.3 M Benzylmercaptan	56%	44%
0.3 M Thiophenol / 0.18 M LiCl	53%	47%

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass nur geringe Mengen an D-Epimer gebildet werden, sofern die Konzentration des Thioladditivs 20 mM nicht überschreitet. Höhere Konzentrationen (300 mM Thiophenol oder 300 mM Thiophenol plus 300 mM Benzylmercaptan) führen zu einer signifikanten Zunahme der Menge des D-Epimers. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte in dem hohen Überschuss an Thioladditiv liegen. Dieses führt, wie in Abbildung 3.12 (b) und 3.15 (a) gezeigt, zu einer schnellen und nahezu vollständigen Umesterung zum Arylthiol, was genug Zeit für eine Racemisierung lässt. Die Arylthioester scheinen unter diesen Bedingungen anfällig gegen eine Racemisierung zu sein, da der pKa der Thioester-benachbarten C-H Bindung im Vergleich zu einem Alkylthioester verringert ist. Allerdings kann diese Nebenreaktion durch Verringerung der Thiolkonzentration oder durch simultanes Zugeben beider Reaktanten vermieden werden.

Um zu ermitteln, ob diese Ergebnisse auch auf die Peptide AVQEA-SL (**P1**) und CVSAIL (**P2**) übertragbar sind, wurden die Referenzpeptide AVQEACVSAIL (**P3**) und AVQEA CVSAIL (**P15**) mittels Festphasenpeptidsynthese dargestellt. Diese Epimere konnten durch HPLC auf einer C18-Säule mit einer Phosphat/Acetonitril-haltigen mobilen Phase getrennt werden (Abbildung 3.22).

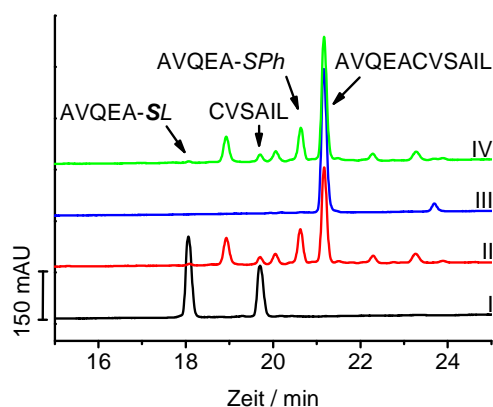


**Abbildung 3.22:** Untersuchung der Epimerisierung der NCL in DMF durch Synthese von AVQEA-CVSAIL. (I) AVQEA CVSAIL (**P15**) und AVQEA CVSAIL (**P3**) dargestellt durch Festphasenpeptidsynthese. Das all L-Peptid ist mit L markiert und das D-Ala5 Epimer mit D. (II) NCL von AVQEA-SL (**P1**) und CVSAIL (**P2**) (Reaktionsbedingungen: 20 mM MPAA, 20 mM TEA in DMF, 40 °C, 2 h). (III) NCL von AVQEA-SL (**P1**) und CVSAIL (**P2**) (Reaktionsbedingungen: 300 mM Thiophenol, 20 mM TEA, 180 mM Lithiumchlorid in DMF, 40 °C, 2 h). Die Peptide wurden mittels HPLC auf einer C18 Säule getrennt. Es wurden Eluentensystem 2 und Gradient 4 verwendet. Die Absorptionmessung erfolgte bei 214 nm (Dittmann *et. al.*, 2012).

Nach Durchführung der Ligationen von AVQEA-SL mit CVSAIL mit Hilfe beider Ligationssysteme wurden die Reaktionslösungen nach einer Reaktionszeit von 2 h mittels HPLC analysiert (Abbildung 3.22 (II) und (III)). Hierbei wurde für beide untersuchten Ligationssysteme nur ein Peak beobachtet, welcher die Retentionszeit des all L-Peptides besaß. Dies belegt, dass im Rahmen der Nachweisgrenze (~1%) ausschließlich L-Epimer gebildet wurde. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen folgt, dass unter den Bedingungen der Modelligationen keine Epimerisierung des C-terminalen Thioester-tragenden Peptides auftritt.

### 3.2.6 Untersuchungen bei erhöhter Temperatur

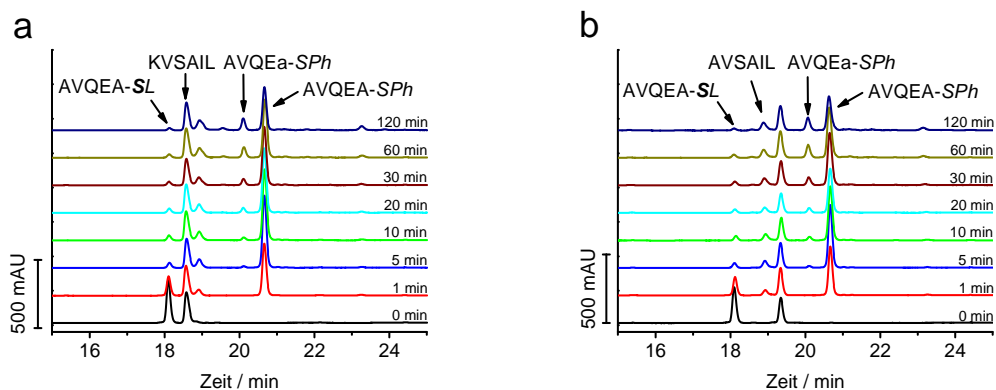
Um zu untersuchen, ob die NCL auch bei höheren Temperaturen chemoselektiv und ohne Epimerisierung des C-terminalen Thioesters abläuft, wurden die Modellpeptide AVQEA-SL und CVSAIL mittels 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol in DMF bei einer Temperatur von 60 °C zur Reaktion gebracht.



**Abbildung 3.23:** Ligation bei 60 °C. Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol in DMF, 60 °C (I) Vor Zugabe von Base und Thioladditiv. (II) Ligation nach 2 h. (III) Mittels Festphasenpeptidsynthese dargestelltes AVQEACVSAIL (**P3**). (IV) Koinjektion einer Probe der Ligation nach 2 h und mittels Festphasenpeptidsynthese dargestellten AVQEACVSAIL (**P3**). Es wurden eine C18-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 1 verwendet. Die Absorptionmessung erfolgte bei 214 nm.

Abbildung 3.23 zeigt die erhaltenen Chromatogramme, welche die Bildung des Ligationproduktes AVQEACVSAIL dokumentieren. Dabei wurde eine Ausbeute von 70% erhalten. Um zu ermitteln, ob die Ligation bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C chemoselektiv abläuft, wurde wie beschrieben (Kapitel 3.2.4) vorgegangen. Die mittels

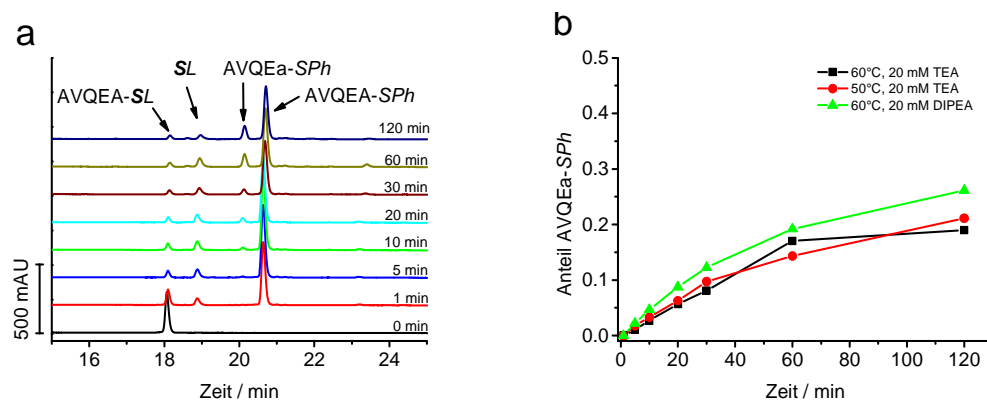
Festphasenpeptidsynthese dargestellten Peptide KVSAIL und AVSAIL wurden mit dem Peptid AVQEA-SL inkubiert und dies mittels HPLC analysiert.



**Abbildung 3.24:** Chemoselektivität der NCL in DMF bei 60 °C. (a) AVQEA-SL (P1) und KVSAIL (P6). (b) AVQEA-SL (P1) und AVSAIL (P7). Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol in DMF, 60 °C. Es wurden eine C18-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 1 verwendet. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 214 nm.

Die Reaktion von AVQEA-SL mit KVSAIL ist in Abbildung 3.24 (a) dargestellt, die mit AVSAIL in Abbildung 3.24 (b). Man beobachtet in beiden Chromatogrammen die Bildung des Umesterungsproduktes AVQEA-SPh (Peak bei 20.7 min). Darüber hinaus ändert sich die Intensität der Peaks der Peptide KVSAIL bzw. AVSAIL kaum. In den Chromatogrammen in Abbildung 3.24 sind in Analogie zu Abbildung 3.17 keine Peaks der möglichen Nebenprodukte AVQEAKVSAIL bzw. AVQEA AVSAIL zu beobachten. Dies bedeutet, dass keine Reaktion zwischen den Peptiden KVSAIL/AVSAIL und dem Peptid AVQEA-SL stattfindet. Ein Unterschied zur der Reaktion bei 40 °C ist die Bildung eines neuen Peaks bei 20.1 min, bei gleichzeitiger Verringerung der Intensität des Peaks des Umesterungsproduktes bei 20.7 min. Beide Peaks wurden mittels ESI-MS analysiert und der Masse des Umesterungsproduktes AVQEA-SPh zugeordnet. Das Vorhandensein von zwei Peaks mit identischen Massen deutet auf eine mögliche Epimerisierung des Peptides hin. Daher wurde dieser Peak dem Epimer AVQEA-SPh zugeordnet. Dieses Ergebnis impliziert, dass die erhöhte Reaktionstemperatur eine Epimerisierung des Thioesters AVQEA-SPh verursacht. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurde die Umesterung des Peptides AVQEA-SL unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Beispielfhaft sind in Abbildung 3.25 (a) die erhaltenen Chromatogramme der Umesterung bei 50 °C aufgeführt. Abbildung 3.25 (b) zeigt die Epi-

merisierung des Thioesters unter verschiedenen Reaktionsbedingungen. Hierzu wurde die Fläche der Peaks von AVQEa-SP<sub>h</sub> und AVQEA-SP<sub>h</sub> in den jeweiligen Chromatogrammen bestimmt und der relative Anteil von AVQEa-SP<sub>h</sub> gegen die Reaktionszeit aufgetragen.



**Abbildung 3.25:** Umesterung von AVQEA-SL (P1). Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol in DMF. (a) Reaktionstemperatur 50 °C. Es wurden eine C18-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 1 verwendet. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 214 nm. (b) Darstellung des relativen Anteils der Peakfläche von AVQEa-SP<sub>h</sub> (P10) an der Summe der Peakflächen von AVQEa-SP<sub>h</sub> (P10) und AVQEA-SP<sub>h</sub> (P5) in Abhängigkeit der Reaktionszeit.

Aus Abbildung 3.25 geht hervor, dass eine Reaktionstemperatur von  $\geq 50$  °C eine Epimerisierung des Peptides AVQEA-SP<sub>h</sub> induziert. Dieser Vorgang kann bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C auch nicht durch Verwendung einer sterisch anspruchsvollen Base wie DIPEA vermieden werden. In allen drei untersuchten Bedingungen sind nach einer Reaktionszeit von 2 h etwa 20% des Thioesters epimerisiert. Die Untersuchungen zur Chemo Selektivität und Epimerisierung bei erhöhter Temperatur zeigten, dass die Ligation der Modellpeptide AVQEA-SL und CVSAIL bei 60 °C chemo selektiv abläuft, es aber zu einer Epimerisierung des C-terminalen Thioesters kommt. Reaktionstemperaturen von  $> 40$  °C können folglich nur dann eingesetzt werden, wenn eine teilweise Epimerisierung für eine mögliche Anwendung tolerierbar ist oder wenn das Thioester-tragende Peptid ein C-terminales Glycin aufweist.

### 3.2.7 Anwendung der NCL in DMF auf weitere Ligationen

In den vorherigen Kapiteln wurde herausgestellt, dass die NCL in DMF eine schnelle und effiziente Ligation der Modellpeptide AVQEA-SL und CVSAIL ermöglichte. Darüber hinaus ist diese Reaktion bis 40 °C chemo selektiv und verläuft ohne Epimerisierung



ung des C-terminalen Thioesters. Nun sollte ermittelt werden, ob die entwickelten Ligationsbedingungen auch auf andere Peptide übertragen werden können (Tabelle 3.8). Es wurde in allen Fällen eine Lithiumchloridkonzentration von 180 mM verwendet und jedes Peptid in einer Konzentration von 2 mg·ml<sup>-1</sup> eingesetzt. Als Peptide wurden Fragmente des archaebakteriellen Transducerproteins HtrII eingesetzt. Diese wurden sowohl mittels Festphasenpeptidsynthese als auch in einem Fall (**P26a**; *NpHtrII* 95C-157) mittels rekombinanter Genexpression hergestellt. Auf die Ligationsversuche mit Peptiden, die eine komplette transmembrane Helix enthielten (*NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> (**P18**) und *NpHtrII* 1-46-S(Arg)<sub>6</sub> (**P16**)), wird ebenfalls in Kapitel 3.3 eingegangen.

**Tabelle 3.8:** Ausbeuten verschiedener Ligationen. Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, 40 °C in DMF. Die molekularen Massen wurden mittels ESI-MS oder LCMS bestimmt. Die Ausbeuten wurden durch HPLC ermittelt.

Edukte der NCL	Ligations- produkt	Theor. M (g/mol)	Exp. M (g/mol)	Ausbeute	Bildung eines Niederschlages
AVQEA-SL ( <b>P1</b> ) CVSAIL ( <b>P2</b> )	<b>P3</b>	1102.7	1102.5	62%	Nein
<i>NpHtrII</i> 47Thz-59-SLeu ( <b>P17</b> ) CVSAIL ( <b>P2</b> )	<b>P30</b>	1776.0	1775.5	80%	Nein
AVQEA-SL ( <b>P1</b> ) <i>NpHtrII</i> 95C-157 ( <b>P26a</b> )	<b>P31</b>	7676.3	7676.0	83%*	Nein
<i>NpHtrII</i> 47Thz-59-SLeu ( <b>P17</b> ) <i>NpHtrII</i> 95C-157 ( <b>P26a</b> )	<b>P32</b>	8349.0	8350.5	79%	Nein
AVQEA-SL ( <b>P1</b> ) <i>NpHtrII</i> 60C-114-His <sub>6</sub> ( <b>P18</b> )	<b>P33</b>	6847.8	6848.2	62%	Nein
<i>NpHtrII</i> 47Thz-59-SLeu ( <b>P17</b> ) <i>NpHtrII</i> 60C-114-His <sub>6</sub> ( <b>P18</b> )	<b>P34</b>	7520.5	7520.0	59%	Nein
<i>NpHtrII</i> 1-46-S(Arg) <sub>6</sub> ( <b>P16</b> ) CVSAIL ( <b>P2</b> )	<b>P35</b>	5501.6	5504**	n.u.	Nein

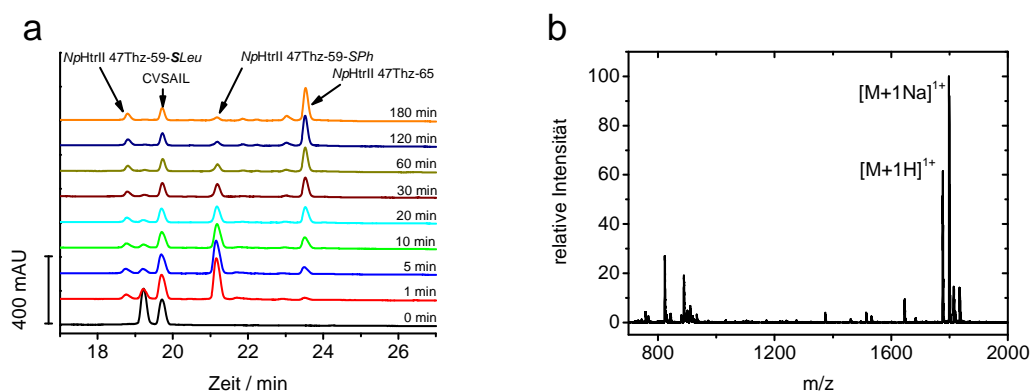
\*Die Ausbeute wurde mittels LCMS abgeschätzt.

\*\*Die molekulare Masse des Rohproduktes wurde mittels MALDI-MS bestimmt.

n.u. nicht untersucht

3.2.7.1 Ligation zwischen *NpHtrII* 47Thz-59-SLeu und CVSAIL

Das Peptid *NpHtrII* 47Thz-59-SLeu (**P17**) umfasst die Aminosäuren 48 bis 59 des archaebakteriellen Transducerproteins HtrII. Darüber hinaus besitzt es ein N-terminales Thiazolidin (Thz), welches ein geschütztes Cystein darstellt. Die erhaltenen HPLC-Chromatogramme zu verschiedenen Zeitpunkten zeigen (Abbildung 3.26 (a)), dass zunächst die Umesterung von *NpHtrII* 47Thz-59-SLeu zu *NpHtrII* 47Thz-59-SPh (**P36**) erfolgt. Mit fortschreitender Reaktionszeit entsteht ein Peak bei 23.5 min, der mittels ESI-MS dem Reaktionsprodukt *NpHtrII* 47Thz-59-65 (**P30**) zugeordnet wurde (Abbildung 3.26 (b)). Die Reaktion war nach 2 h beendet und es resultierte eine Ausbeute von 80%.

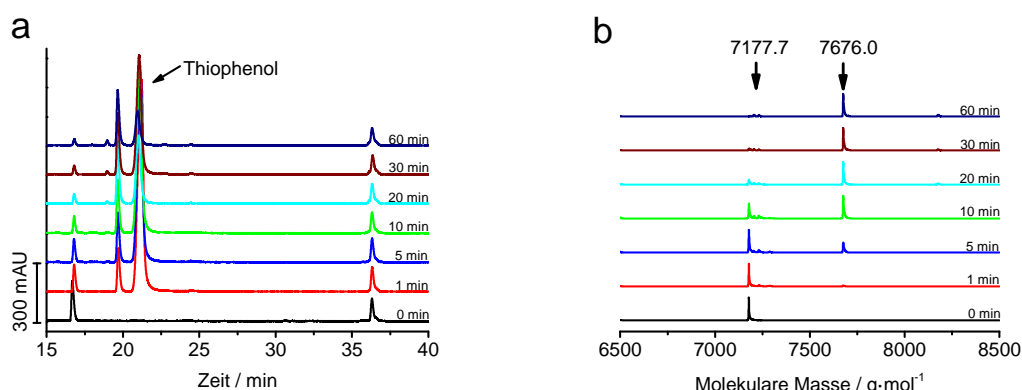


**Abbildung 3.26:** Ligation von *NpHtrII* 47Thz-59-SLeu (**P17**) mit CVSAIL (**P2**). Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, 40 °C in DMF. (a) HPLC-Chromatogramme der Ligation zu verschiedenen Zeitpunkten. Es wurden eine C18-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 1 verwendet. Die Absorptionmessung erfolgte bei 214 nm. (b) ESI-MS des Peaks bei 23.5 min. (**P30**)  $[M+H]^{1+}$  theoretisch: 1777.0;  $[M+H]^{1+}$  gemessen: 1776.8.

3.2.7.2 Ligation zwischen AVQEA-SL und *NpHtrII* 95C-157

Das Peptid *NpHtrII* 95C-157 (**P26a**) umfasst die Aminosäuren 96 bis 157 des HtrII. Darüber hinaus besitzt es ein N-terminales Cystein, welches strukturelle Voraussetzung für eine NCL ist. Zunächst ist die Umesterung von AVQEA-SL (**P1**) zu AVQEA-SPh (**P5**) zu beobachten (Abbildung 3.27 (a)). Weiterhin ist zu Reaktionsbeginn ein Peak bei 36.3 min zu erkennen, welcher dem *NpHtrII* 95C-157 zugeordnet wurde. Eine Analyse dieses Peaks mittels ESI-MS bei fortschreitender Reaktionszeit beweist eine Ligation, welche nach etwa 30 min abgeschlossen ist (Abbildung 3.27 (b)). Durch Vergleich der

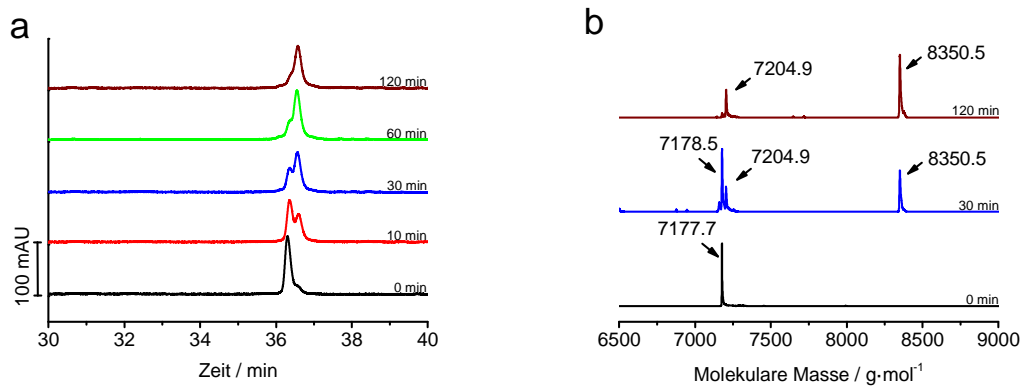
Peakintensitäten von Edukt (**P26a**) und Produkt (**P31**) in Abbildung 3.27 (b) wurde eine Ausbeute von etwa 83% bestimmt.



**Abbildung 3.27:** Ligation von AVQEA-SL (**P1**) mit *NpHtrII* 95C-157 (**P26a**). Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, 40 °C in DMF. (a) HPLC-Chromatogramme der Ligation zu verschiedenen Zeitpunkten. Es wurden eine C4-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 7 verwendet. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 214 nm. (b) ESI-MS der Peaks bei 36.3 min. Theoretische molekulare Masse des Ligationsproduktes (**P31**): 7676.3 g·mol<sup>-1</sup>; gemessene molekulare Masse: 7676.0 g·mol<sup>-1</sup>.

### 3.2.7.3 Ligation zwischen *NpHtrII* 47Thz-59-SLeu und *NpHtrII* 95C-157

Die HPLC-Chromatogramme zeigen bei fortschreitender Reaktionszeit die Bildung eines neuen Peaks bei 36.6 min (Abbildung 3.28 (a)). Im Massenspektrum ist nach 120 min kein Edukt mehr zu detektieren, sondern das Produkt mit der erwarteten Masse des Ligationsproduktes (**P32**) (Abbildung 3.28 (b)). Folglich findet die Ligation statt und ist nach etwa 120 min abgeschlossen. Allerdings wurde ein Nebenprodukt mit einer Masse von 7204.9 g·mol<sup>-1</sup> detektiert, was der Eduktmasse plus einer zusätzlichen Masse von 27.2 g·mol<sup>-1</sup> entspricht. Eine eindeutige Zuordnung zu einer Modifikation konnte nicht erfolgen. Da der Peak des Nebenproduktes sich nicht vollständig von dem des Produktes abtrennen ließ, wurde die Reaktionsausbeute aus den HPLC-Chromatogrammen auf 79% abgeschätzt.

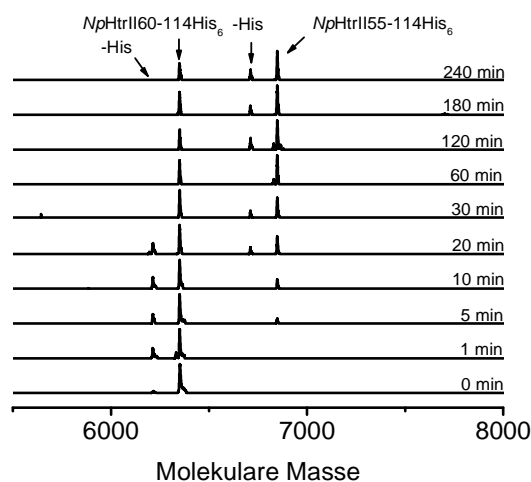


**Abbildung 3.28:** Ligation von *NpHtrII* 47Thz-59-*SLeu* (**P17**) mit *NpHtrII* 95C-157 (**P26a**). Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, 40 °C in DMF. (a) HPLC-Chromatogramme der Ligation zu verschiedenen Zeitpunkten. Es wurde eine C4-Säule, Eluentensystem 1 und Gradient 7 verwendet. Die Absorptionmessung erfolgte bei 214 nm. (b) ESI-MS des Peaks bei 36.6 min. Theoretische molekulare Masse des Ligationsproduktes (**P32**): 8349.0 g·mol<sup>-1</sup>; gemessene molekulare Masse: 8350.5 g·mol<sup>-1</sup>.

#### 3.2.7.4 Ligation zwischen AVQEA-SL und *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub>

Um zu untersuchen, ob auch Peptide mit einer transmembranen Helix in einer NCL in DMF eingesetzt werden können, wurden in der Folge Ligationen zwischen den Peptiden AVQEA-SL (**P1**) mit *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> (**P18**), *NpHtrII* 47Thz-59-*SLeu* (**P17**) mit *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> (**P18**), und *NpHtrII* 1-46-*SArg*<sub>6</sub> (**P16**) mit CVSAIL (**P2**) durchgeführt. Das Peptid *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> umfasst dabei die zweite transmembrane Helix des Transducerproteins *NpHtrII*. *NpHtrII* 1-46-*SArg*<sub>6</sub> beinhaltet die erste transmembrane Helix. Diese Peptide sind darüber hinaus die Schlüsselkomponenten bei der Synthese der kompletten Membrandomäne *NpHtrII* 1-114. Deren Design, Aufreinigung und Analytik werden daher gesondert in Kapitel 3.3 diskutiert.

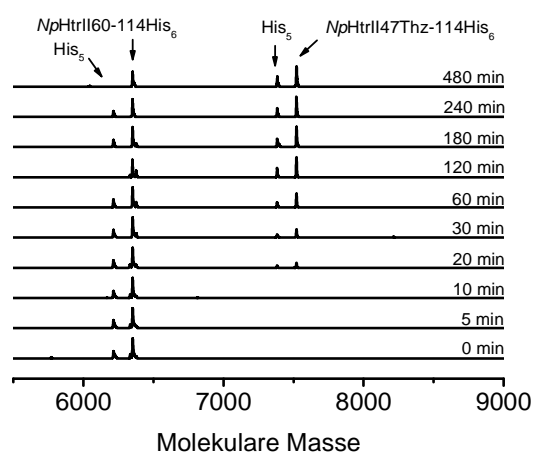
Die Ligation zwischen AVQEA-SL (**P1**) mit *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> (**P18**) wurde mittels LCMS verfolgt, wobei die erhaltenen dekonvolvierten Massenspektren in Abbildung 3.29 dokumentiert sind. Unter diesen Bedingungen ist die Bildung des Reaktionsproduktes *NpHtrII* 55-114-His<sub>6</sub> (**P33**) zu beobachten, wobei nach einer Reaktionszeit von 4 h kein weiterer Reaktionsfortschritt beobachtet wurde.



**Abbildung 3.29:** Ligation von AVQEA-SL (**P1**) mit *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> (**P18**). Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, 40 °C in DMF. LCMS Analysen der Ligation zu verschiedenen Zeitpunkten. Theoretische molekulare Masse des Ligationsproduktes (**P33**): 6847.8 g·mol<sup>-1</sup>; gemessene molekulare Masse: 6848.2 g·mol<sup>-1</sup>. Der Peak bei 6710.6 g·mol<sup>-1</sup> kann dem *NpHtrII* 55-114-His<sub>6</sub> anstatt dem *NpHtrII* 55-114His<sub>6</sub> zugeordnet werden. Grund hierfür ist eine nicht quantitative Histidin-Kupplung während der Festphasenpeptidsynthese von *NpHtrII* 60C-114His<sub>6</sub>.

#### 3.2.7.5 Ligation zwischen *NpHtrII* 47Thz-59-SLeu und *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub>

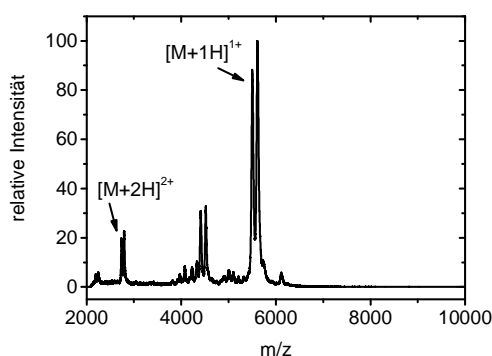
Die Reaktion zwischen *NpHtrII* 47Thz-59-SLeu (**P17**) und *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> (**P18**) wurde mittels LCMS verfolgt (Abbildung 3.30). Es ist die Bildung des Reaktionsproduktes *NpHtrII* 47Thz-114-His<sub>6</sub> (**P34**) zu erkennen, wobei nach einer Reaktionszeit von 4 h kein weiterer Reaktionsfortschritt beobachtet wurde. Da diese Ligation ein Schlüsselschritt für die Synthese der kompletten Membrandomäne *NpHtrII* 1-114 (**P20**) darstellt, wird die Durchführung und Aufreinigung gesondert in Kapitel 3.3 diskutiert.



**Abbildung 3.30:** Ligation von *NpHtrII* 47Thz-59-*SLeu* (**P17**) mit *NpHtrII* 60C-114-*His*<sub>6</sub> (**P18**). Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, 40 °C in DMF. LCMS-Analysen der Ligation zu verschiedenen Zeitpunkten. Theoretisches Molekulargewicht des Ligationsproduktes (**P34**): 7520.5 g·mol<sup>-1</sup>; gemessenes Molekulargewicht: 7520.0 g·mol<sup>-1</sup>. Der Peak bei 7384.1 g·mol<sup>-1</sup> kann dem *NpHtrII* 47Thz-114-*His*<sub>5</sub> anstatt des *NpHtrII* 47Thz-114-*His*<sub>6</sub> zugeordnet werden. Grund hierfür ist eine nicht quantitative Histidin-Kupplung während der Festphasenpeptidsynthese von *NpHtrII* 60C-114-*His*<sub>6</sub>.

### 3.2.7.6 Ligation zwischen *NpHtrII* 1-46-*SArg*<sub>6</sub> und CVSAIL

Die Ligationen von *NpHtrII* 1-46-*SArg*<sub>6</sub> (**P16**) und CVSAIL (**P2**) wurde mittels Chloroform-Methanol-Fällung gefällt und durch MALDI-MS analysiert (Abbildung 3.31). Es ist die Bildung des Reaktionsproduktes *NpHtrII* 1-46-60C-65 (**P35**) zu beobachten. Darüber hinaus ist bei einem *m/z*-Wert von 5609 das korrespondierende Thiophenoladdukt und bei 4412 *m/z* bzw. 4518 *m/z* ein nicht zu identifizierendes Nebenprodukt zu erkennen.



**Abbildung 3.31:** Ligation von *NpHtrII* 1-46-*SArg*<sub>6</sub> (**P16**) mit CVSAIL (**P2**). Reaktionsbedingungen: 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, 40 °C in DMF. MALDI-MS nach einer Reaktionszeit von 2 h. Theoretische molekulare Masse des Ligationsproduktes (**P35**): 5501.6 g·mol<sup>-1</sup>; gemessene molekulare Masse: 5503.8 g·mol<sup>-1</sup>.

## – Zusammenfassung Kapitel 3.2 –

Da die NCL von transmembranen Peptiden wegen der schlechten Löslichkeit der Komponenten und deren Tendenz zu aggregieren mit großen Schwierigkeiten behaftet ist, wurde in diesem Kapitel ein neues Ligationsverfahren für hydrophobe Peptide entwickelt. Um die mangelnde Löslichkeit in wässrigen Puffersystemen zu überwinden, wurde untersucht, ob die NCL auch in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden kann. Hierzu wurden vier organische Lösungsmittel getestet: DMF, NMP, DMSO und TFE. Nachdem experimentell bestätigt werden konnte, dass eine NCL in diesen organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden kann, wurden für DMF optimierte Reaktionsbedingungen ermittelt, die eine schnelle und effiziente Ligation von Modellpeptiden gestatteten. Zur Erhöhung der Löslichkeit und Stabilität der Peptide in dem organischen Lösungsmittel wurden verschiedene Additive getestet, wobei Lithiumchlorid den größten Effekt ausübte. Bei einer Konzentration von 180 mM konnten alle Reaktanten in Lösung gehalten werden, ohne dass eine Verringerung der Ligationsausbeute festgestellt wurde. Darüber hinaus stellte sich die NCL in DMF als chemoselektiv in Gegenwart anderer nukleophiler Gruppen heraus, so dass keine Schützung von Seitenketten notwendig war. Weiterhin trat bei einer Reaktionstemperatur bis 40 °C keine Epimerisierung der Peptide auf. Es wurde festgestellt, dass die ermittelten Ligationsbedingungen auch auf andere Peptide übertragen werden konnten. Dazu wurden verschiedene Fragmente des archaebakteriellen Transducerproteins *NpHtrII* sowohl mittels Festphasenpeptidsynthese als auch in einem Fall (*NpHtrII* 95C-157) mittels rekombinanter Genexpression hergestellt. Es zeigte sich, dass in allen getesteten Reaktionen das Ligationsprodukt erhalten wurde. Hierbei konnten ebenfalls Peptide, die eine transmembrane Helix enthielten, umgesetzt werden. Diese Ergebnisse belegen, dass mit der NCL in DMF eine neue Strategie zur Modifizierung von hydrophoben Peptiden entwickelt wurde, welche das bisherige Methodenspektrum (Einsatz von Detergenzien, Lipiden oder chaotrope Ionen in wässrigen Puffersystemen) erweitert. Nach Etablierung dieser neuen Ligationsmethode soll im nächsten Kapitel die chemische Synthese der Membrandomäne des Transducerproteins *NpHtrII* erfolgen.

### 3.3 Totalsynthese, Aufreinigung und Faltung von *NpHtrII* 1-114

In diesem Kapitel soll eine chemische Totalsynthese der 114 Aminosäuren umfassenden Membrandomäne des archaebakteriellen Transducerproteins *NpHtrII* entwickelt werden. Hierdurch werden sowohl der Einbau verschiedener Reportergruppen, z. B. Label für die FTIR- und die ESR-Spektroskopie, als auch Veränderungen des Peptid-Rückgrates, wie der Einbau eines Photoschalters, ermöglicht. Die Einführung dieser Modifikationen soll zusätzliche biophysikalische Untersuchungen an diesem Protein gestatten und so helfen, weitere Kenntnisse über dessen Funktion auf molekularer Ebene zu erhalten.

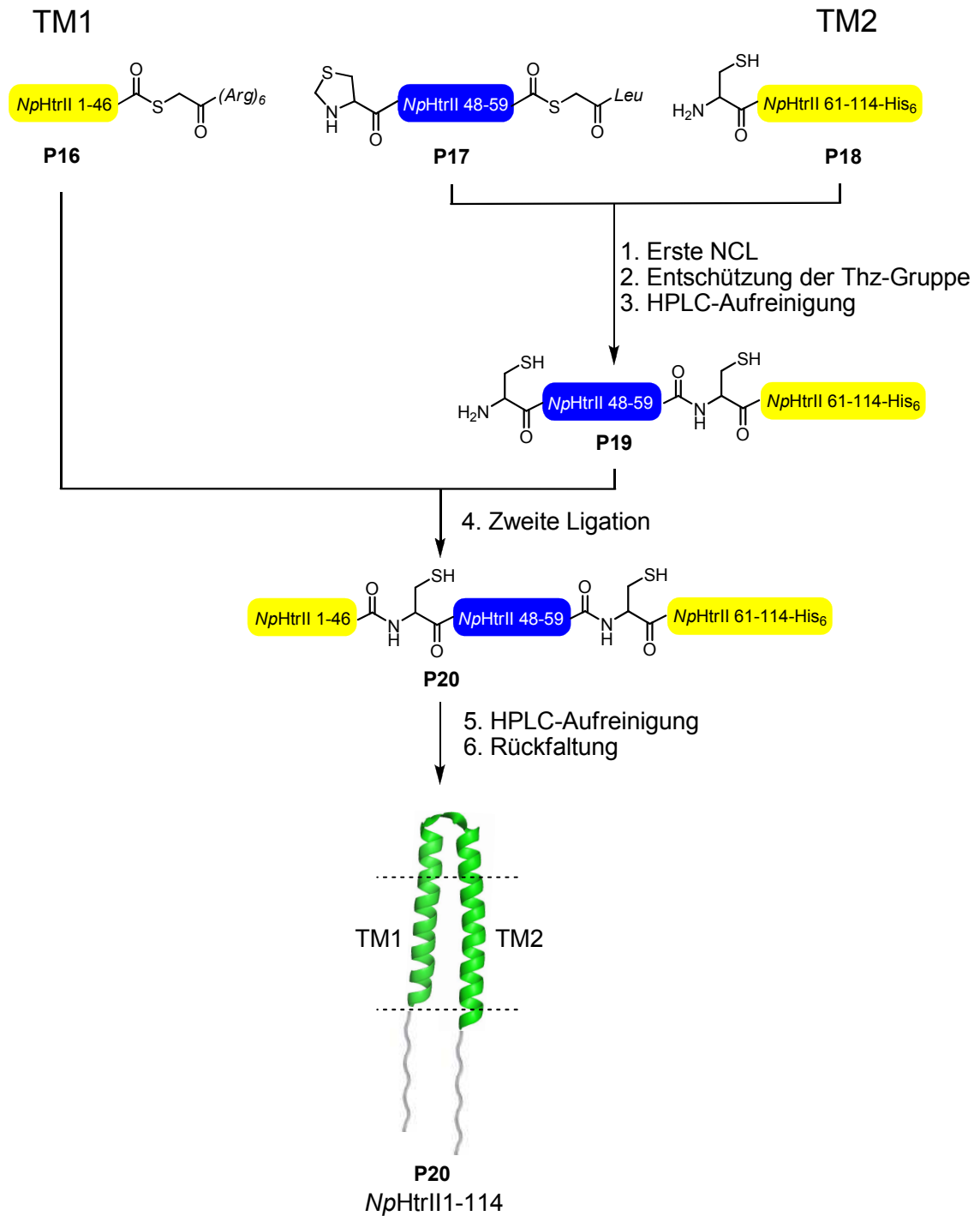
#### 3.3.1 Synthesestrategie

Die Strategie für die Synthese von *NpHtrII* 1-114 ist in Abbildung 3.32 dargestellt und unterteilt die 114 Aminosäuren umfassende Sequenz in drei Segmente. Die Peptide *NpHtrII* 1-46 und *NpHtrII* 60-114 beinhalten jeweils die Sequenz für eine transmembrane Helix, wohingegen das Peptid *NpHtrII* 47-59 die Schleife zwischen den beiden transmembranen Helices umfasst. Da die native Sequenz des *NpHtrII* 1-114 kein Cystein beinhaltet, wurden zwei Cysteine anstelle der Alanin Reste 47 und 60 eingefügt. Tabelle 3.9 dokumentiert die darzustellenden Sequenzen.

**Tabelle 3.9:** Sequenzen der zu synthetisierenden Peptide (Dittmann *et al.*, 2014b). Thz (1,3-Thiazolidin) bezeichnet ein geschütztes Cystein, welches nach einer Ligation entschützt werden kann. *SL* und *SRRRRRR* bezeichnen den verwendeten Thioester: -SCH<sub>2</sub>CO*Leu* oder -SCH<sub>2</sub>CO*Arg*. Die Reste der zwei transmembranen Helices sind unterstrichen.

Peptid	Zahl der Reste	Sequenz	Masse (g·mol <sup>-1</sup> )	
<i>NpHtrII</i> 1-46- <i>SArg</i> <sub>6</sub> ( <b>P16</b> )	46 + 6	MSLNVSRLLLPSRVRRHSYTGKMGAVF <u>IFVGALT</u> VLFGAIAAYGEVTA- <i>SRRRRRR</i>	5926.0	TM1
<i>NpHtrII</i> 47Thz-59- <i>SLeu</i> ( <b>P17</b> )	13 + 1	ThzAATGDAAAVQEA- <i>SL</i>	1376.4	
<i>NpHtrII</i> 60C-114- <i>His</i> <sub>6</sub> ( <b>P18</b> )	55 + 6	<u>CVSAILGLIILLGINLGLVAATLGGDTAASLSTLA</u> AKASRMGDGDLDELETRRE-HHHHHH	6349.2	TM2



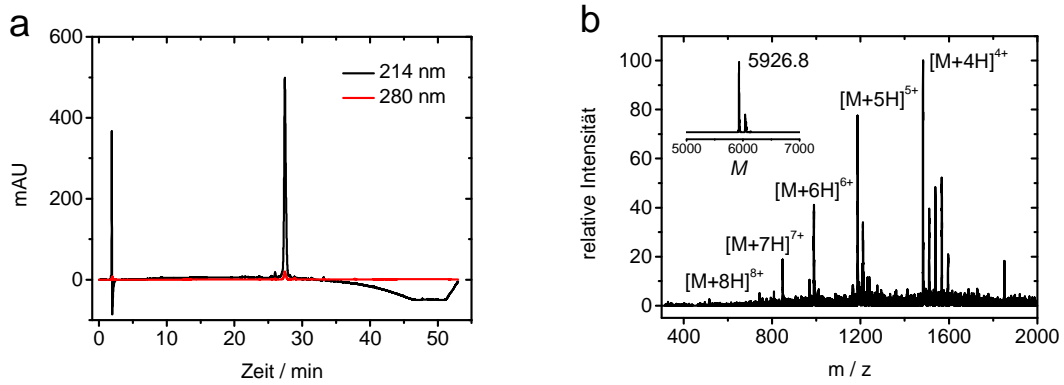


**Abbildung 3.32:** Die Membrandomäne des *NpHtrII* umfasst 114 Aminosäuren und wurde in drei Fragmente unterteilt: *NpHtrII* 1–46, *NpHtrII* 47–59 und *NpHtrII* 60–114, welche mittels Festphasenpeptidsynthese dargestellt werden sollten (Dittmann *et al.*, 2014b). Die Peptide, die eine transmembrane Helix enthalten, sind in gelb abgebildet. Das Peptid, welches die Schleife zwischen den beiden transmembranen Helices umfasst, ist in blau gezeigt. Nachdem Zusammenfügen der gesamten Sequenz durch zwei NCL sollte das aufgereinigte Protein in einem detergenshaltigen Puffer gefaltet werden. Die gestrichelten Linien grenzen den in der Membran liegenden Bereich ein.

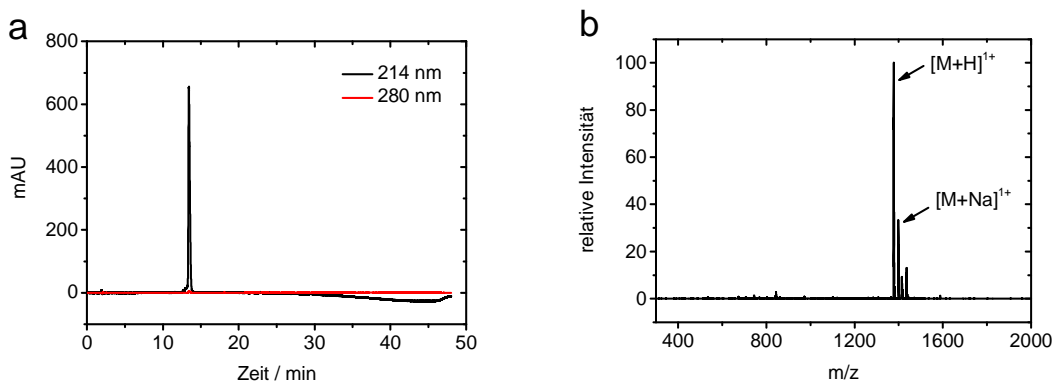
#### 3.3.2 Synthese und Aufreinigung der Peptide

Die Synthese und Aufreinigung der verwendeten Peptide geschah aufbauend auf den Ergebnissen von vorherigen Arbeiten (Dittmann, 2008; Becker, 2009; Sadek, 2011). Im Rahmen dieser Forschungsprojekte konnte die Festphasenpeptidsynthese mittels Boc-Strategie von Peptiden mit jeweils einer transmembranen Helix durch die Durchführung von Doppelkopplungen optimiert werden und so ausreichende Mengen der jeweiligen Rohprodukte erhalten werden. Darüber hinaus wurde die HPLC-Aufreinigung der transmembranen Peptide durch Einführung eines Arginin-Tags, Ermittlung geeigneter Auftragsbedingungen und Nutzung von C4- und Diphenyl-Säulen etabliert.

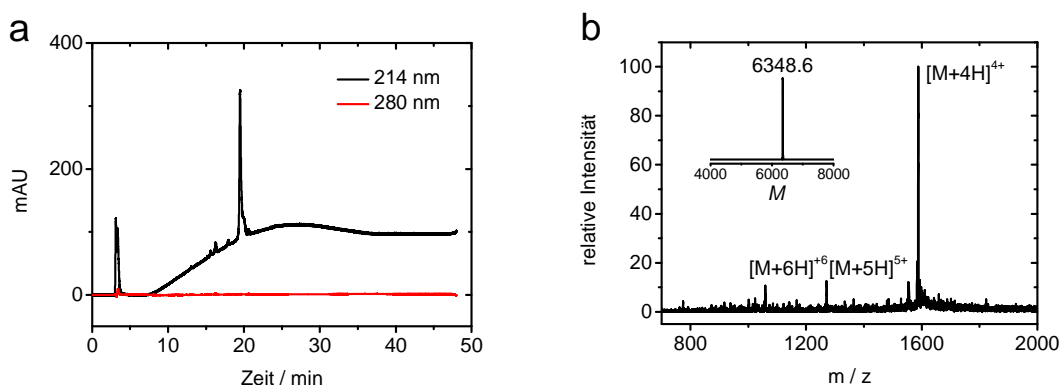
Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde das Peptid *NpHtrII* 1-46 (**P16**) mit einem Hexa-Arginin-Tag dargestellt; das Peptid *NpHtrII* 60C-114 (**P18**) mit einem Hexa-Histidin-Tag. Grund hierfür war, dass ein rekombinantes *NpHtrII* 1-114 (**P21**) mit einem Histidin-Tag bereits in früheren Arbeiten umfassend charakterisiert worden war (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003) und so eine Vergleichbarkeit sichergestellt werden sollte. Dabei verbesserten die verwendeten Tags die Löslichkeit der transmembranen Peptide bei Verwendung von sauren Puffersystemen (d. h. Puffersysteme bestehend aus Wasser und Acetonitril mit Zusatz von 0.1% TFA; pH ~ 2). Diese werden üblicherweise für die HPLC zur Aufreinigung von Peptiden verwendet, was zu Folge hat, dass sowohl Arginin-, Lysin- als auch Histidin-Reste während der HPLC-Aufreinigung positiv geladen vorliegen. Mit diesen Modifikationen eluierten die Peptide als scharfer Peak von einer C4- und Diphenyl-Säule; ohne diese als breiter Hügel, wobei dieses Verhalten typisch für stark hydrophobe Peptide ist (Johnson und Kent 2006b; Johnson und Kent, 2007). Durch Nutzung dieser Synthese und Aufreinigungsprotokolle konnten pro Syntheseansatz (0.2 mmol) 8 bis 19 mg (entspricht einer Gesamtausbeute von 0.7-1.5%) eines aufgereinigten transmembranen Peptides, mit jeweils 52 bis 61 Aminosäuren, erhalten werden. Die Abbildungen 3.33, 3.34 und 3.35 dokumentieren die erhaltenen Chromatogramme und Massenspektren der aufgereinigten Peptide *NpHtrII* 1-46-*SArg*<sub>6</sub>, *NpHtrII* 47Thz-59-*SLeu* und *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub>.



**Abbildung 3.33:** (a) Analytisches HPLC-Chromatogramm (C4-Säule, Gradient 1 und Eluentensystem 1) und (b) ESI-MS von aufgereinigtem *NpHtrII* 1-46-SArg<sub>6</sub> (**P16**) mit dekonvolutiertem Spektrum. Theoretische molekulare Masse: 5926.0 g·mol<sup>-1</sup>, gemessene molekulare Masse: 5926.8 g·mol<sup>-1</sup>. Die zusätzlichen Peaks können auf +113 Addukte (wahrscheinlich TFA) zurückgeführt werden. Solche Addukte wurden auch in ESI-Massenspektren von anderen Arginin-Tag enthaltene Peptiden gefunden. Bei einer Analyse mittels MALDI-MS konnten keine Addukte detektiert werden.



**Abbildung 3.34:** (a) Analytisches HPLC-Chromatogramm (C4-Säule, Gradient 1 und Eluentensystem 1) und (b) ESI-MS von aufgereinigtem *NpHtrII* 47Thz-59-SLeu (**P17**). Theoretische molekulare Masse: 1376.4 g·mol<sup>-1</sup>, gemessene molekulare Masse: 1375.9 g·mol<sup>-1</sup>.



**Abbildung 3.35:** (a) Analytisches HPLC-Chromatogramm (Diphenyl-Säule, Gradient 2 und Eluentensystem 1) und (b) ESI-MS von aufgereinigtem *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> (**P18**) mit dekonvolutiertem Spektrum. Der Anstieg der Basislinie im HPLC-Chromatogramm wurde auch bei einem Lauf ohne Probe beobachtet. Theoretische molekulare Masse: 6349.2 g·mol<sup>-1</sup>, gemessene molekulare Masse: 6348.6 g·mol<sup>-1</sup>.

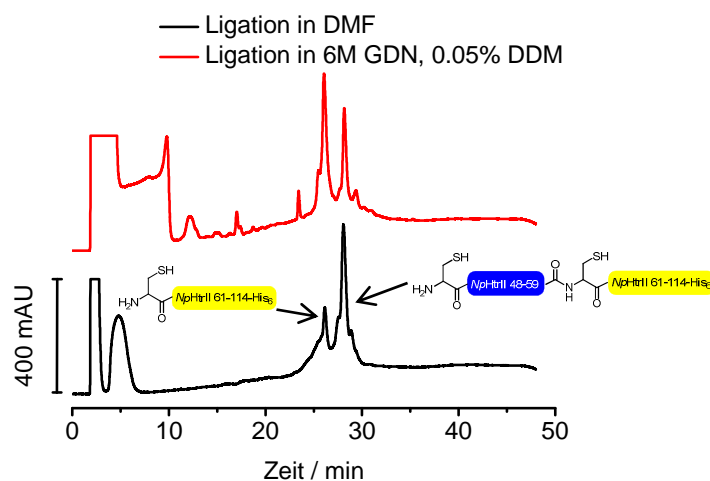
#### 3.3.3 Ligation transmembraner Peptide

Nach der erfolgreichen Festphasenpeptidsynthese und HPLC-Aufreinigung der Fragmente mussten geeignete Ligationsbedingungen gefunden werden. Zu diesem Zweck wurde die Möglichkeit untersucht eine NCL gemäß den in Kapitel 3.2 ausgearbeiteten Bedingungen in dem organischen Lösungsmittel DMF durchzuführen. Folglich wurden Ligationsexperimente in DMF mit 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol bei 40 °C durchgeführt. Darüber hinaus wurden verschiedene wässrige Puffersysteme getestet. Diese Analyse zeigte, dass sich die Peptide nicht in Ligationssystemen lösten, welche häufig für NCL eingesetzt werden, wie z. B. Lösungen mit 6 M Guanidiniumchlorid (Gdn·HCl) oder 8 M Harnstoff. Darüber hinaus vermochte auch nicht der Zusatz von 2 bis 4% SDS, mit oder ohne 8 M Harnstoff, und das Erwärmen der Lösungen auf über 60 °C die Peptide in ausreichender Menge ( $\sim 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) zu solubilisieren. Es konnte nur ein Ligationspuffer ermittelt werden, welches die Peptide in akzeptablen Konzentrationen zu lösen vermochte ( $\geq 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ): Eine Kombination aus 6 M Gdn·HCl, dem Detergens DDM (0.05% bis 2% (w/v) wurden eingesetzt) und einem Phosphatpuffer. Daraufhin wurden Ligationsversuche mit folgendem Ligationspuffer durchgeführt: 6 M Gdn·HCl, 100 mM NaPi, 50 mM MPAA, 20 mM TCEP, pH 7 (Johnson und Kent, 2006a) mit dem Zusatz von 0.05% bis 2% DDM.

##### *3.3.3.1 Ligation zwischen NpHtrII 47Thz-59-SLeu und NpHtrII 60-114-His<sub>6</sub>*

Die Ligation zwischen *NpHtrII 47Thz-59-SLeu* und *NpHtrII 60C-114-His<sub>6</sub>* wurde unter den erläuterten Ligationsbedingungen durchgeführt und mittels HPLC mit einer C4-Säule analysiert. Dabei wurde ein Isopropanol beinhaltendes Eluentensystem verwendet (Eluentensystem 3) und die Trennung bei 60 °C durchgeführt. Die erhöhte Temperatur war notwendig, um eine bei Raumtemperatur auftretende Peakverbreiterung des Ligationsproduktes zu vermeiden. In Abbildung 3.36 ist ein Chromatogramm der Ligation in DMF und der Ligation, welche mittels des Ligationspuffers durchgeführt wurde, dargestellt. Für die Ligation, welche in dem Ligationspuffer durchgeführt wurde, konnte eine Ausbeute von 35% (bestimmt durch HPLC) nach einer Reaktionszeit von 18 h festgestellt werden. Dabei war es nicht möglich die Ausbeute durch eine weitere

Verlängerung der Reaktionszeit zu steigern. Andererseits wurde mit der NCL in DMF in 4 h eine Ausbeute von 59% erreicht.

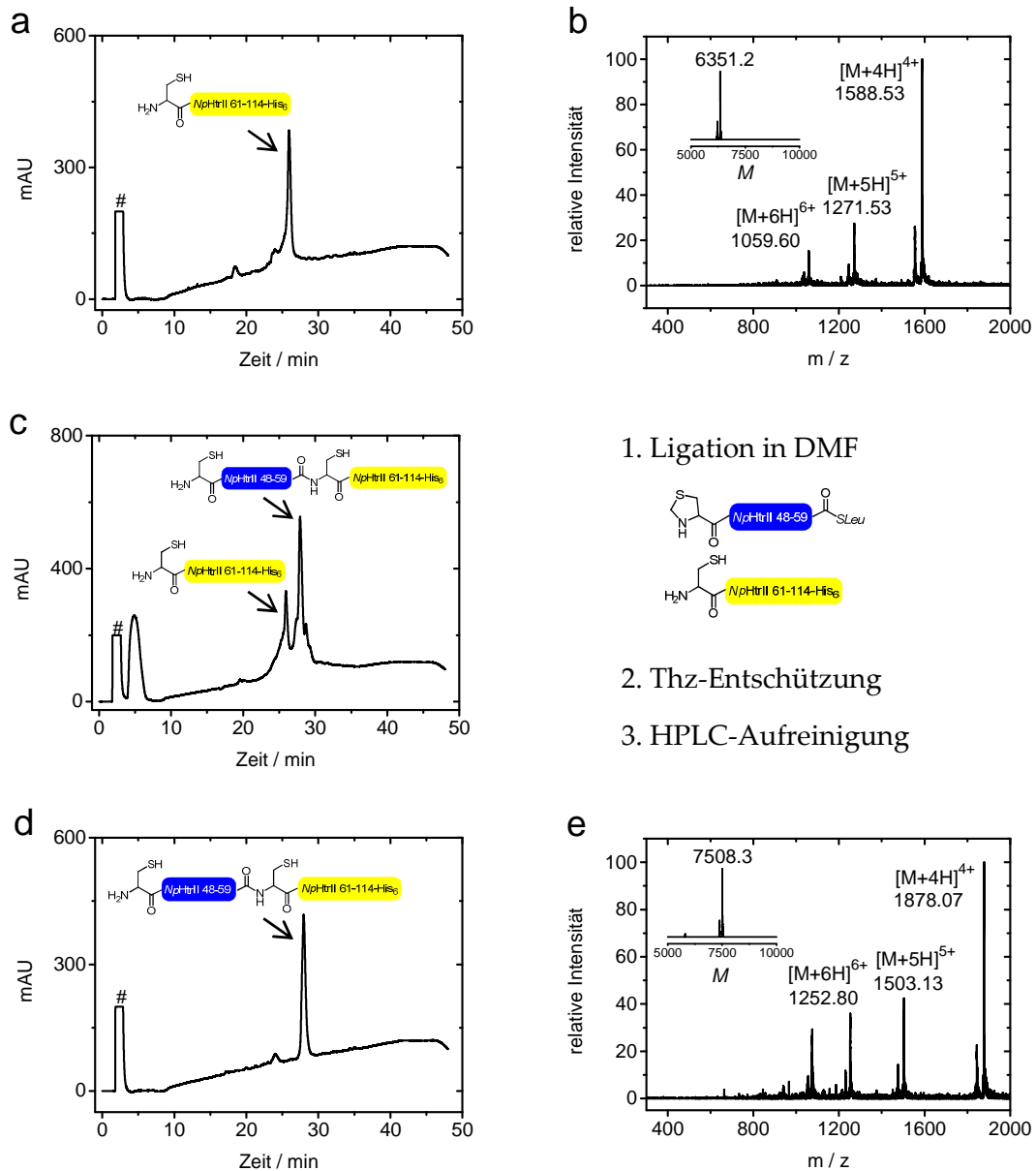


**Abbildung 3.36:** Ligation von *NpHtrII* 47Thz-59-*SLeu* (**P17**) mit *NpHtrII* 60C-114-*His*<sub>6</sub> (**P18**). Die Ligation wurde durchgeführt in DMF mit 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, bei 40 °C, 4 h (schwarze Kurve) oder in 6 M Gdn-HCl, 0.05% DDM, 100 mM NaPi, 50 mM MPAA, 20 mM TCEP, pH 7 bei Raumtemperatur, 18 h (rote Kurve). Beide Ligationen wurden mit einer C4-Säule und einem Isopropanol beinhaltenen Puffersystem bei einer Temperatur von 60 °C analysiert (Eluentensystem 3, Gradient 3). Den Anstieg der Basislinie wird bei jedem Lauf mit Eluentensystem 3 beobachtet; auch bei einer Injektion ohne Probe. Die Thz-Gruppe wurde vor der HPLC-Aufreinigung entschützt (siehe Kapitel 2.5.8).

Die geringere Ausbeute in dem wässrigen Puffersystem könnte durch einen abschirmenden Effekt des Detergens erklärt werden. Da sich das N-terminale Cystein des *NpHtrII* 60C-114 direkt am N-terminalen Ende der zweiten transmembranen Helix befindet, könnte dieses in einer für die Ligationsreaktion ungünstigen Konformation oder Position vorliegen (z. B. in einer Mizelle). Es wurde vermutet, dass ein solcher Effekt die Ausbeute bei detergensvermittelten NCL von hydrophoben Peptiden generell herabsetzt (Hunter und Kochendoerfer, 2004).

Darauf hin wurde die Ligation von *NpHtrII* 47Thz-59-*SLeu* und *NpHtrII* 60C-114-*His*<sub>6</sub> in DMF mit 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol bei 40 °C durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt, die Thz-Gruppe entschützt (siehe Kapitel 2.5.8.4) und die Ligation mittels HPLC aufgereinigt. Die analytischen Daten sind in Abbildung 3.37 dokumentiert. Dabei ist in den Massenspektren in Abbildung 3.37 (b) und (e) neben den

Massen der aufgereinigten Peptiden mit einer geringen Intensität eine zweite Peakserie zuerkennen. Diese konnte *NpHtrII 60C-114-His<sub>5</sub>* anstatt dem *NpHtrII 60C-114-His<sub>6</sub>* oder *NpHtrII 47C-114-His<sub>5</sub>* anstatt dem *NpHtrII 47C-114-His<sub>6</sub>* zugeordnet werden. Grund hierfür ist eine nicht quantitative Histidin-Kupplung während der Festphasen-peptidsynthese des für die Proteinsynthese verwendeten *NpHtrII 60C-114-His<sub>6</sub>*. Aufgrund des sehr ähnlichen Verhaltens während der HPLC-Aufreinigung konnte dieses Nebenprodukt nicht abgetrennt werden.



**Abbildung 3.37:** Ligation von *NpHtrII* 47Thz-59-*SLeu* (**P17**) mit *NpHtrII* 60C-114-*His*<sub>6</sub> (**P18**). Die Ligation wurde durchgeführt in DMF mit 180 mM Lithiumchlorid, 20 mM TEA, 300 mM Thiophenol, bei 40 °C für 4h. Nach Entfernen des organischen Lösungsmittels im Vakuum und Entschützung der Thz Gruppe, wurde die Ligation mittels HPLC und eine C4-Säule bei 60 °C aufgereinigt (Eluentensystem 3, Gradient 3). (a) Analytisches HPLC-Chromatogramm und (b) ESI-MS von aufgereinigtem *NpHtrII* 60C-114-*His*<sub>6</sub> mit dekonvolutiertem Spektrum. Theoretische molekulare Masse: 6349.2 g·mol<sup>-1</sup>, gemessene molekulare Masse: 6351.2 g·mol<sup>-1</sup>. (c) Analytisches HPLC-Chromatogramm der Ligationlösung nach Entschützung der Thz-Gruppe. (d) Analytisches HPLC-Chromatogramm und (e) ESI-MS von aufgereinigtem *NpHtrII* 47C-114-*His*<sub>6</sub> (**P19**) mit dekonvolutiertem Spektrum. Theoretische molekulare Masse: 7508.4 g·mol<sup>-1</sup>, gemessene molekulare Masse: 7508.3 g·mol<sup>-1</sup>.

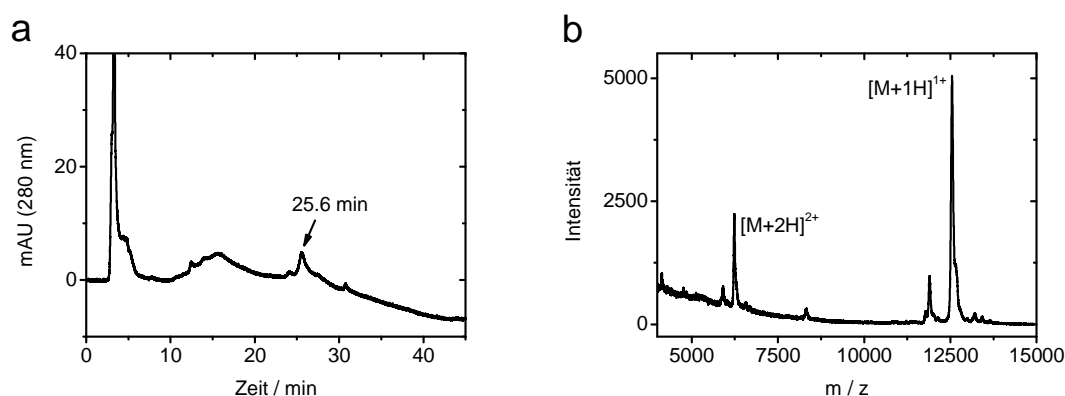
#### 3.3.3.2 Ligation zwischen *NpHtrII* 1-46-SArg<sub>6</sub> und *NpHtrII* 47C-114-His<sub>6</sub>

Nach der erfolgreichen Darstellung von *NpHtrII* 47C-114-His<sub>6</sub> musste, um die zweite Ligation durchführen zu können, zunächst eine geeignete Aufreinigungsmethode für das Ligationsprodukt *NpHtrII* 1-114-His<sub>6</sub> etabliert werden. Grund hierfür war die Beobachtung, dass das Peptid *NpHtrII* 1-46-SArg<sub>6</sub> nach erfolgter Umesterung mit einem Arylthiol nicht mehr als scharfer Peak von der HPLC-Säule eluierte, sondern als breiter Hügel am Ende des Gradienten. Die gleiche Beobachtung wurde auch für das potentielle Ligationsprodukt gemacht, so dass eine Aufreinigung unter den Bedingungen der Ligation von *NpHtrII* 47Thz-59-SLeu mit *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> nicht durchgeführt werden konnte. Das nicht standartmäßige Elutionsverhalten des Peptides *NpHtrII* 1-46 kann mit der Abspaltung des Arginin-Tags begründet werden, da dieser während der Ligation bei der Umwandlung zum Arylthioester entfernt wird. Die damit einhergehenden negativen Auswirkungen auf die HPLC-Analytik und -Aufreinigung stellen ein generelles Problem bei Nutzung eines Arginin-Tags dar. Eine Begründung dafür, dass das synthetische *NpHtrII* 1-114 nicht mittels des in der Literatur oft eingesetzten Eluentensystem 3 aufgereinigt werden konnte (z.B. in Clayton *et al.* 2004; Lahiri *et al.*, 2011), lässt sich nicht ohne weiteres ableiten. Möglicherweise bildet das *NpHtrII* 1-114 unter den Bedingungen der HPLC-Aufreinigung oder der Ligation höhermolekulare Aggregate, welche das Verhalten während der Aufreinigung beeinträchtigen. Untersuchungen mittels Größenausschluss-Chromatographie an dem volllängen Transducerprotein konnten eine zeitabhängige Aggregation des Proteins zeigen (Li L., 2013). Zusätzliche Analysen eines rekombinanten *NpHtrII* 1-114 mittels Größenausschluss-Chromatographie (siehe Kapitel 2.3.5) zeigten im Chromatogramm mehrere Peaks, welche sich alle auf das *NpHtrII* 1-114 zurückführen ließen. Diese Beobachtungen verdeutlichen die Tendenz des *NpHtrII* 1-114 Oligomere-Formen auszubilden, was die Schwierigkeiten bei der Ligation und bei der HPLC-Aufreinigung begründen könnte.

Als Folge dieser Ergebnisse wurde ein Ameisensäure/Isopropanol-Eluentensystem getestet. Ein solches Puffersystem wurde schon für die Analyse von hydrophoben Peptiden mittels HPLC (Bollhagen *et al.*, 1995) verwendet und wurde ursprünglich für die Trennung von Poliovirus-Proteinen mit nahezu quantitativer Rückgewinnung an Ma-



terial eingesetzt (Heukeshoven und Dernick, 1982). Die Hauptnachteile dieser Methode sind einerseits die Möglichkeit einer Protein-Formylierung, welche sich in multiplen +28 Da Addukten äußert, und andererseits die Notwendigkeit für eine Detektion bei 280 nm, da dieses Eluentensystem wegen der Absorption der Ameisensäure bei 214 nm nicht transparent ist (Whitelegge, 2004). Da in der Sequenz von *Np*HtrII 1-114 kein Tryptophan und nur zwei Tyrosine vorkommen, hat dies zur Folge, dass der Extinktionskoeffizient bei 280 nm sehr niedrig ist ( $2980 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , ExPASy ProtParam tool, Swiss Institute of Bioinformatics, in: <http://web.expasy.org/protparam/>, am 02.07.2013, 14:54 Uhr) und der resultierende Peak im Chromatogramm eine sehr geringe Intensität besaß. Aus diesem Grund wurde die Aufreinigung zunächst mit dem rekombinanten Protein (**P21**) etabliert, da von diesem Milligramm-Mengen verfügbar waren. Es wurde eine C4-Säule, Eluentensystem 4 und Gradient 5 eingesetzt (Abbildung 3.38).



**Abbildung 3.38:** (a) Chromatogramm des rekombinant dargestellten *Np*HtrII 1-114 (**P21**). Es wurden etwa 35  $\mu\text{g}$  aufgetragen. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C4-Säule ( $125 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) durchgeführt, wobei Gradient 5 und Eluentensystem 4 verwendet wurden. (b) MALDI-MS des Peaks bei 25.6 min. (theoretische molekulare Masse:  $12548.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; gemessene molekulare Masse:  $12548.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Nach der Etablierung einer Aufreinigungsmethode wurden die in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Ligationssysteme getestet. Hierbei wurde festgestellt, dass nach einer Ligation in DMF nur Spuren des Ligationsproduktes nach der HPLC-Aufreinigung (durch eine C4-Säule, Eluentensystem 4 und Gradient 5) nachgewiesen werden konnten. Dies äußerte sich in einer geringen Intensität des resultierenden Peaks im MALDI-Spektrum. Verlängerte Reaktionszeiten bis hin zu einer Woche oder eine Reaktionstemperatur von  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  brachten keine signifikante Verbesserung. Möglicherweise nehmen die beiden transmembranen Peptide in dem organischen Lösungsmittel DMF mit

Zusatz von 180 mM Lithiumchlorid eine Konformation an, die keinen effizienten Angriff des Cysteins an den aktivierten Thioester gestattet. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt in dem vermehrten Vorhandensein positiv geladener Aminosäureseitenketten, wie Arginin oder Lysin, bei Ligationen von Peptiden mit Molekulargewichten von etwa  $6000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Hierdurch sollte die Konzentration der Trifluoracetatgegenionen, welche auf die HPLC-Aufreinigung der Peptide zurückzuführen sind, ebenfalls ansteigen. In Kapitel 3.2 konnte gezeigt werden, dass Natriumtrifluoracetat die Effizienz der Ligation in DMF drastisch herabsetzt. Durch Austausch des Gegenions und Durchführung weiterer Ligationsexperimente sollte sich diese Hypothese testen lassen.

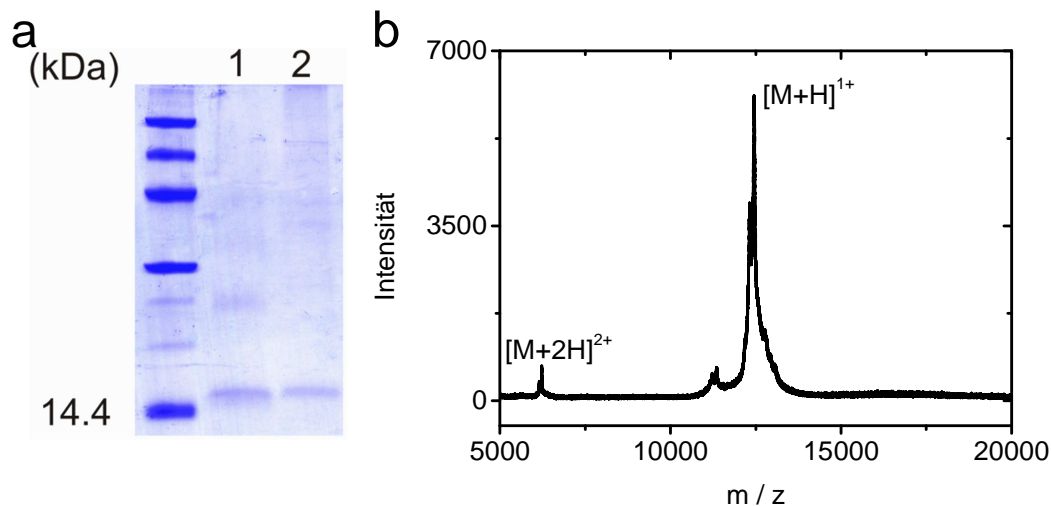
Andererseits konnte nach einer Ligation in dem Ligationspuffer (6 M Gdn-HCl, 2% DDM, 100 mM NaPi, 50 mM MPAA, 20 mM TCEP, pH 7) das synthetische Membranprotein (P20) nachgewiesen und mit dem Ameisensäure/Isopropanol-System aufgereinigt werden. Daher wurde die Ligation in der Folge mit diesem Puffersystem durchgeführt.

Darüber hinaus wurde ein Protokoll entwickelt, um das aufgereinigte Protein in eine funktionale Form zu falten. Dies wurde zunächst mit rekombinantem Protein etabliert. Hierfür wurde eine HPLC-Aufreinigung des rekombinanten *NpHtrII* 1-114 mit einer Ameisensäure/Isopropanol-Mischung als mobiler Phase durchgeführt. Nach Entfernen des HPLC-Puffers wurde ein Rückstand des denaturierten rekombinanten *NpHtrII* 1-114 erhalten. Für erste Faltungsversuche wurde das Protein in 6 M Gdn-HCl, 2% DDM gelöst, wobei die Faltung entweder durch eine Dialyse gegen Gdn-HCl freien Puffer erfolgen sollte oder durch Dialyse gegen 8 M Harnstoff und schrittweise Reduzierung der Harnstoffkonzentration. In beiden Fällen wurde nur aggregiertes Protein erhalten, wenn die Konzentration des chaotropen Ions einen bestimmten Wert unterschritt ( $2-4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Daraufhin wurde ein Verfahren getestet, welches in der Vergangenheit erfolgreich von Lahiri *et al.* (2011) eingesetzt wurde, um das Membranprotein Diacylglycerol Kinase aus *E. coli* nach einer HPLC-Aufreinigung in eine funktionale Form zu falten. Direkt nach der HPLC-Aufreinigung wurde der HPLC-Puffer mit dem aufgereinigten Protein mit der zweifachen Menge an TFE versetzt. Durch vorsichtiges Ein-

gen des Lösungsmittelgemisches im Vakuum mittels einer Speed-Vac und Wiederaufnahme in TFE wurde der HPLC-Puffer gegen TFE ersetzt. Die so erhaltene konzentrierte Lösung des Proteins in TFE wurde in das zehnfache Volumen eines wässrigen Puffers (150 mM Natriumchlorid, 25 mM NaPi, pH 8), welcher 0.5% (w/v) DDM enthielt, verdünnt. Dialyse gegen das hundertfache Volumen an detergensfreiem Puffer reduzierte die Menge an TFE. Nach der Dialyse und Zentrifugation wurde aggregiertes Protein durch Zentrifugation entfernt. Experimente mit dem rekombinanten Protein zeigten, dass durch dieses Vorgehen etwa 15-20% des eingesetzten Proteins zurückgefalten werden konnten.

Mit den so entwickelten HPLC- und Rückfaltungsprotokollen konnte das synthetische *NpHtrII* (**P20**) mit einer Ausbeute von 5% nach Ligation, HPLC-Aufreinigung und Rückfaltung erhalten werden. Abbildung 3.39 (a) zeigt eine Analyse des Ligationsproduktes und des rekombinanten Proteins mittels SDS-PAGE. Die Diskrepanz des theoretischen Molekulargewichtes ( $\sim 12500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) und dem im SDS-Gel beobachtetem ( $\sim 15000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) ist typisch für archaebakterielle Transducerproteine (vgl. Mreyen, 2003). Abbildung 3.39 (b) zeigt das MALDI-MS des aufgereinigten und rückgefalteten *NpHtrII* 1-114 (**P20**). Es wurde eine molekulare Masse von  $12453.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  gemessen. Die Differenz von  $48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  verglichen mit der theoretischen Masse von  $12405.3$  kann durch eine Oxidation der in dem Protein vorhandenen Methionine während der Rückfaltung erklärt werden (das Protein besitzt drei Methionine). Die sauren Bedingungen während der Rückfaltung scheinen möglicherweise die Oxidation zu begünstigen. Um diese Theorie zu testen, wurde ein Trypsin-in-Gel-Verdau des synthetischen Proteins durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.9). Hierbei sollten drei Peptide, welche jeweils ein Methionin enthalten, gebildet werden (Peptide mit den Aminosäuren: 1-7, 22-96 und 100-112). Zwei dieser Peptide (Peptide mit den Aminosäuren: 1-7 und 100-112) konnten ganz überwiegend in der oxidierten Form detektiert werden (Verhältnis Methioninsulfoxid zu Methionin  $\sim 30:1$ ). Ein Fragment bestehend aus den Aminosäuren 22-96 konnte in dieser Analyse nicht nachgewiesen werden. Dieses Peptid besitzt ein Methionin an Position 22 und umfasst die beiden transmembranen Helices. Die Entstehung eines solchen hydrophoben Fragmentes könnte dazu führen, dass sich dieses entweder

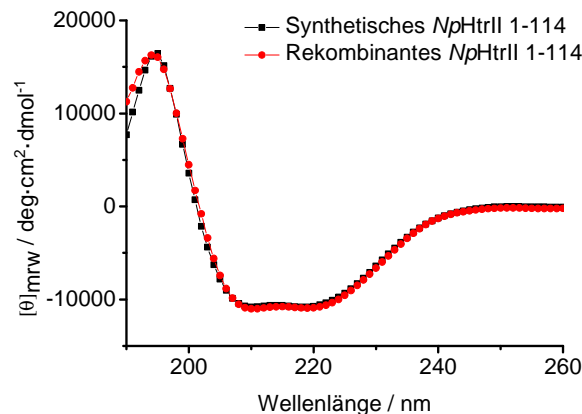
nicht in den für die HPLC-MS-Analyse verwendeten Puffer löst (Wasser, 0.1% TFA) oder nicht von der verwendeten HPLC-Säule eluiert. Die Oxidation der Methioninseitenketten sollte durch Entgasen der bei der Rückfaltung verwendeten Lösungsmittel und durch Arbeiten unter Schutzgas vermieden werden können. Der Peak bei  $12317.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Differenz  $135.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) konnte einem Protein mit fehlenden Histidin im Histidin-Tag zugeordnet werden. Ein solches Nebenprodukt wurde bereits bei der Ligation zwischen *NpHtrII* 47Thz-59-*SLeu* und *NpHtrII* 60-114-His<sub>6</sub> beobachtet (Abbildung 3.37). Grund für dessen Auftreten ist eine nicht quantitative Histidin-Kupplung während der Festphasenpeptidsynthese von *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub>. Aufgrund des sehr ähnlichen Verhaltens während der HPLC-Aufreinigung konnte dieses Nebenprodukt nicht abgetrennt werden.



**Abbildung 3.39:** (a) SDS-PAGE des synthetischen *NpHtrII* 1-114 (**P20**) (Spur 1) und des rekombinanten Proteins (**P21**) (Spur 2) (Dittmann *et al.*, 2014b). (b) MALDI-MS des Ligationsproduktes (**P20**). Es wurde eine molekulare Masse von  $12453.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  beobachtet. Die Differenz von  $48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  zur theoretischen Masse von  $12405.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  kann durch eine Oxidation der Methioninreste während der Rückfaltung erklärt werden.

### 3.3.4 Charakterisierung des synthetischen *NpHtrII* 1-114

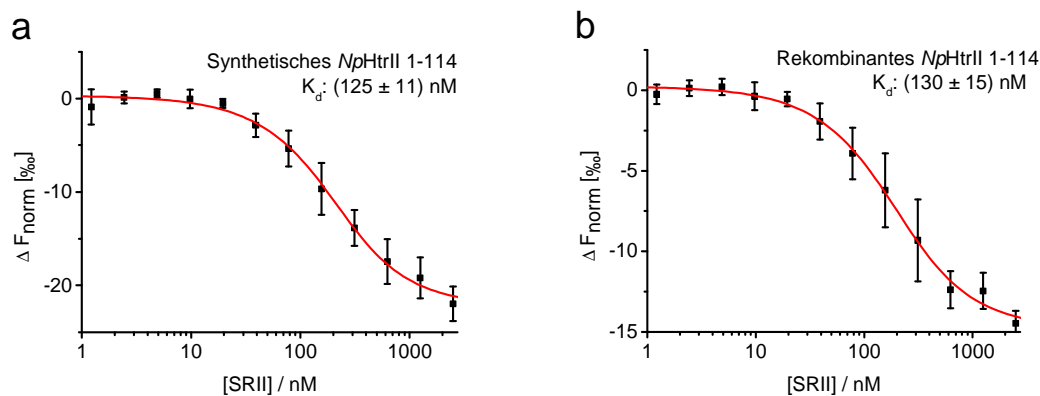
Zur Charakterisierung wurde das in einem DDM-haltigen Puffer vorliegende synthetische *NpHtrII* 1-114 mittels CD-Spektroskopie, optisch erzeugter Thermophorese (engl. *Microscale Thermophoresis*) und Laser-Flash-Photolyse untersucht. Abbildung 3.40 zeigt das CD-Spektrum des synthetischen und des rekombinant dargestellten *NpHtrII* 1-114.



**Abbildung 3.40:** CD-Spektren des synthetischen (P20) (schwarze Kurve) und des rekombinant (P21) (rote Kurve) dargestellten *NpHtrII* 1-114 (Dittmann *et al.*, 2014b). Die Messungen wurden in einem Puffer bestehend aus 150 mM Natriumchlorid, 25 mM NaPi, 0.5% DDM, pH 8 bei Raumtemperatur durchgeführt.

Der Verlauf der Kurven in beiden Proben ist nahezu identisch. Es konnten in beiden Spektren vergleichbare  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturelemente beobachtet werden. Da eine ähnliche Sekundärstruktur noch kein Beweis darstellt, dass ein Protein mit nativen Bindungseigenschaften dargestellt wurde, sollte die Bindungsaffinität zum Photorezeptor SRII (P22) ermittelt werden. Die Bindungsaffinität des rekombinant dargestellten *NpHtrII* 1-114 wurde bereits in vorherigen Arbeiten mittels ITC zu  $(240 \pm 40)$  nM bestimmt (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003). Eine neue Methode, die nur geringe Mengen an Probe benötigt, ist die optisch erzeugte Thermophorese. Um diese einsetzen zu können, wurden das synthetische und das rekombinante *NpHtrII* 1-114 mittels eines kommerziell erworbenen Kits (NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland) mit einem Fluoreszenzfarbstoff nach Angaben des Herstellers markiert (Kapitel 2.7.2). Nun wurde eine Verdünnungsreihe des nicht markierten Bindungspartners (SRII) präpariert und eine konstante Menge des markierten Bindungspartners hinzugegeben. Nach Durchführung des Experimentes wurden die Daten mittels der Software NT Analysis der Firma NanoTemper Technologies GmbH ausgewertet und die  $K_d$ -Werte

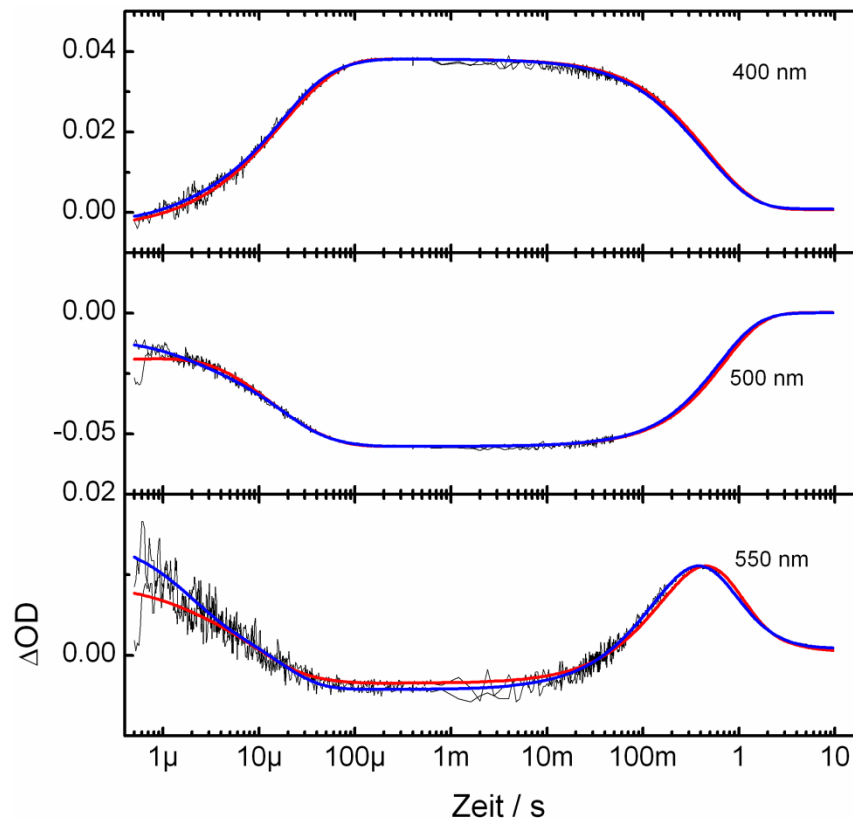
bestimmt. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 3.41 (a) und (b) dargestellt. Im Rahmen der Messgenauigkeit stimmt der  $K_d$ -Wert des synthetischen und des rekombinanten HtrII überein. Hierbei mussten zur Messung der Bindungsaffinität des synthetischen Transducers (P20) 1 mM TCEP zum Ansatz gegeben werden, da sonst nicht auswertbare Spektren erhalten wurden. Dieses Resultat kann durch die Bildung von intramolekularen Disulfidbindungen durch Oxidation während der Probenvorbereitung erklärt werden, die möglicherweise das Protein in eine nicht funktionale Konformation zwingen. Ein Vergleich mit den veröffentlichten ITC-Daten zeigt, dass die mittels optisch erzeugter Thermophorese bestimmten  $K_d$ -Werte in derselben Größenordnung liegen (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003).



**Abbildung 3.41:** Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen *NpHtrII* 1-114 und SRII mittels optisch erzeugter Thermophorese (Dittmann *et al.*, 2014b). Hierfür wurde das Transducerprotein mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes markiert und jeweils eine konstante Menge für jeden Messpunkt eingesetzt, wohingegen die Konzentration des SRII variiert wurde. Die Konzentration des markierten synthetischen Proteins betrug 160 nM; die des rekombinanten 126 nM. Für die Berechnung eines  $K_d$ -Wertes wurden drei unabhängige Titrationen verwendet, wobei jeweils drei Messungen direkt nacheinander durchgeführt wurden. (a) Synthetisches *NpHtrII* 1-114 (P20). (b) Rekombinant dargestelltes *NpHtrII* 1-114 (P21).

Darüber hinaus wurde der Photozyklus des SRII/*NpHtrII*-Komplexes sowohl mit dem synthetischen als auch mit dem rekombinanten HtrII in einem DDM-haltigen Puffer in Kooperation mit Dr. Igor Chizhov (Medizinische Hochschule Hannover) bestimmt (Abbildung 3.42). Dazu wurde der zeitliche Verlauf der Absorption bei drei verschiedenen Wellenlängen gemessen (400, 500, und 550 nm). Die erhaltenen Daten wurden durch eine Gleichung mit sechs Exponentialtermen gefittet. Dabei repräsentiert die Messung bei 500 nm den Abbau und die Regeneration des Grundzustandes, die bei 400 nm die Entstehung und den Zerfall des M-Intermediates bzw. die bei 550 nm das

O-Intermediat. Die Messungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem synthetischen und rekombinanten *NpHtrII* auf. Dies bedeutet, dass die untersuchten Proteinkomplexe die gleichen photochemischen Eigenschaften besitzen.



**Abbildung 3.42:** Absorptionsänderungen nach Anregung des SRII/*NpHtrII* 1-114 Komplexes bei 25 °C (Dittmann *et al.*, 2014b). Der Zeitverlauf ist für drei Wellenlängen gezeigt (400, 500, und 550 nm). Die rote und blaue Kurve repräsentieren die Ergebnisse eines globalen Fits durch eine Gleichung mit sechs Exponentialtermen. Dabei stellt die rote Kurve den Fit für den Komplex des rekombinanten *NpHtrII* (P21) dar; die blaue Kurve den Fit für den Komplex des synthetischen *NpHtrII* (P20).

Durch die Etablierung einer Synthese des *NpHtrII* 1-114 sind nun die methodischen Voraussetzungen für eine chemische Modifizierung des archaebakteriellen Transducerproteins *NpHtrII* geschaffen worden. In zukünftigen Arbeiten könnte der Einbau verschiedener Reportergruppen, wie z. B. Label für die Festkörper-NMR-, die FTIR- sowie die ESR-Spektroskopie, sowie der Einbau eines Photoschalters geschehen. Diese Modifizierungen sollten weitere biophysikalische Untersuchungen an diesem Protein ermöglichen.

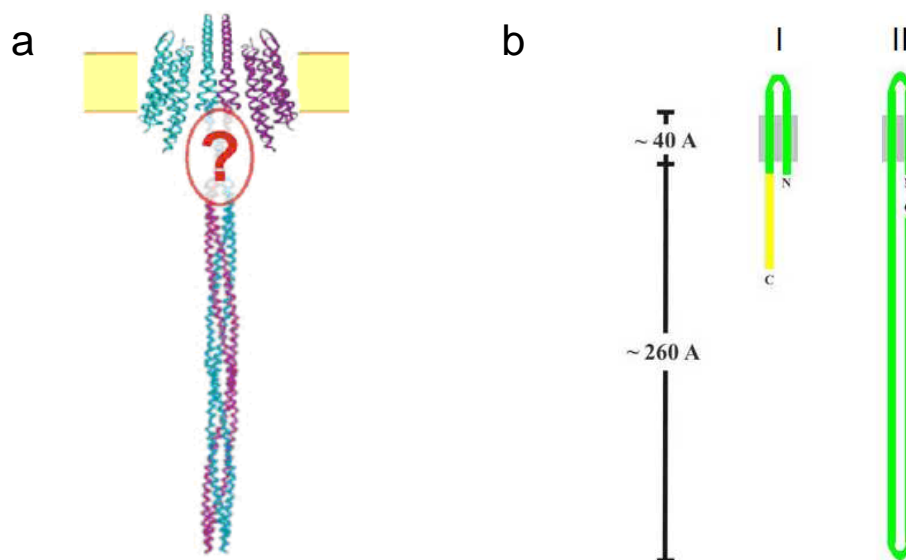
## – Zusammenfassung Kapitel 3.3 –

In diesem Kapitel ist die chemische Synthese und HPLC-Aufreinigung der Membrandomäne des Transducerproteins *NpHtrII* entwickelt worden. Dazu wurde die 114 Aminosäuren umfassende Sequenz in drei Segmente unterteilt. Die Peptide *NpHtrII* 1-46 und *NpHtrII* 60-114 beinhalten jeweils die Sequenz für eine transmembrane Helix, wohingegen das Peptid *NpHtrII* 47-59 die Schleife zwischen den beiden Helices umfasste. Auf schon veröffentlichten Vorarbeiten aufbauend (Dittmann, 2008; Becker, 2009; Sadek, 2011) wurde zunächst die Festphasenpeptidsynthese und HPLC-Aufreinigung von den jeweils eine transmembrane Helix tragenden Peptiden etabliert. Daraufhin wurden zwei Verfahren zur Ligation der transmembranen Peptide untersucht. Mit dem in Kapitel 3.2 entwickelten System in DMF konnte für die Ligation zwischen *NpHtrII* 47Thz-59-SLeu und *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> eine höhere Ausbeute erhalten werden (Ausbeute: 59%), als mit einem Phosphatpuffer mit Zusatz von Guanidiniumchlorid und DDM (Ausbeute: 35%). Für die Analyse und Aufreinigung der Ligation zwischen *NpHtrII* 1-46-SArg<sub>6</sub> und *NpHtrII* 47C-114-His<sub>6</sub> war die Verwendung einer mobilen Phase, bestehend aus Ameisensäure, Wasser und Isopropanol, auf einer C4-Säule notwendig. Da bei Testligationen in DMF nur Spuren des Ligationsproduktes nachgewiesen werden konnten, wurde die Ligation in einem Phosphatpuffer mit Zusatz von Guanidiniumchlorid und DDM durchgeführt. Nach der HPLC-Aufreinigung wurde ein Rückfaltungsprotokoll von Lahiri *et al.* (2011) eingesetzt, um das Ligationsprodukt in einen DDM-haltigen Puffer zu überführen. Es resultierte eine Gesamtausbeute von 5%. Zur Charakterisierung wurde das synthetische *NpHtrII* mittels CD-Spektroskopie, optisch erzeugter Thermophorese (*engl. Microscale Thermophoresis*) und Laser-Flash-Photolyse untersucht. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass das synthetische Protein vergleichbare Struktur- und Bindungseigenschaften wie ein rekombinant dargestelltes *HtrII* besitzt. Durch die Etablierung einer Synthese sind nun die methodischen Voraussetzungen für eine chemische Modifizierung der Membrandomäne des archaebakteriellen Transducerproteins *NpHtrII* geschaffen worden.



### 3.4 Semisyntthese und Isotopenmarkierung von *NpHtrII* 1-157

Die Expressed Protein Ligation (EPL) erlaubt die Größenlimitierung des vollsynthetischen Ansatzes zu überwinden und eröffnet so neue Möglichkeiten das Transducerprotein *NpHtrII* mittels der für Membranproteine geeigneten Festkörper-NMR-Spektroskopie zu studieren. Die Aufklärung der Struktur und Dynamik der ersten HAMP-Domäne des SRII/HtrII-Komplexes ist zum Verständnis des transmembranen Signaltransfers der archaebakterielle Phototaxis essentiell (siehe Kapitel 1.1). Daher soll ein verkürztes Konstrukt des *NpHtrII* dargestellt werden, bei dem die erste HAMP-Domäne  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  isotopenmarkiert vorliegt. Dieses Vorgehen sollte bei Festkörper-NMR-Untersuchungen die spektrale Auflösung verbessern und zusätzliche Daten zur Struktur und Dynamik der ersten HAMP-Domäne liefern. Abbildung 3.43 zeigt eine schematische Darstellung des zu synthetisierenden isotopenmarkierten *NpHtrII*-Konstruktes und ordnet dieses in die 534 Aminosäuren umfassende Sequenz des Gesamtproteins ein.



**Abbildung 3.43:** (a) Modell des Komplexes mit einem zusammengesetzten Transducer basierend auf der Kristallstruktur des transmembranen Teils (Gordeliy *et al.*, 2002) und des zytoplasmatischen Teils des Aspartatrezeptors aus *E. Coli* (Kim *et al.*, 2002). Die unbekannte Struktur des Linker-Bereiches ist durch ein Fragezeichen markiert (Abbildung übernommen aus Schiffer, 2005). (b) Schematische Darstellung des zu synthetisierenden isotopenmarkierten *NpHtrII*-Konstruktes (I) und des kompletten Transducerproteins zum Vergleich (II).

Hierzu war zunächst eine Strategie zur semisynthetischen Darstellung und Isotopenmarkierung der Transducer-Analoga zu entwickeln (Abbildung 3.44), da zu Beginn

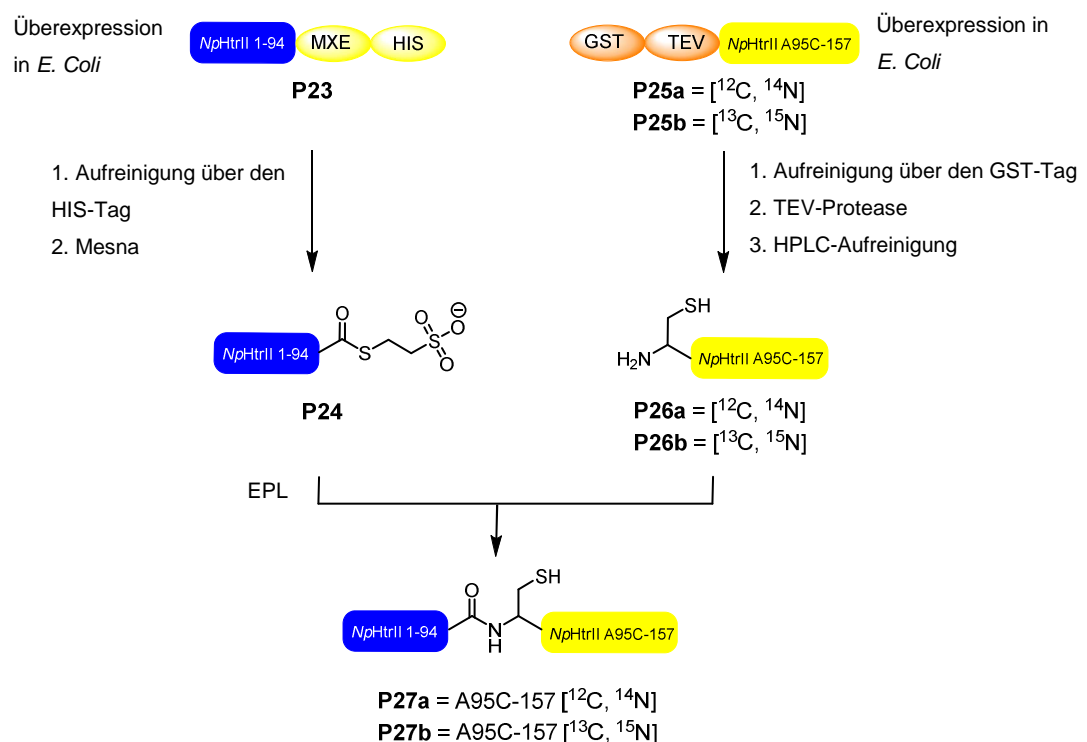
dieses Forschungsprojektes keine veröffentlichte Arbeit über eine erfolgreiche Semisynthese eines segmentweise markierten Membranproteins und dessen NMR-spektroskopischer Untersuchung vorlag. Die in der Literatur beschriebenen Semisynthesen von Membranproteinen zielten ausschließlich auf die Darstellung von Ionenkanälen [KcsA (Valiyaveetil *et al.*, 2002), OmpF (Reitz *et al.*, 2009) und NaK (Linn *et al.*, 2010)]. Ein verkürztes, 125 von insgesamt 160 Aminosäuren umfassendes, Fragment des Kaliumkanals KcsA war das erste Membranprotein, welches semisynthetisch zugänglich wurde. Hierbei wurde ein rekombinant dargestellter Thioester (Aminosäuren 1-73) mit einem chemisch mittels Boc-Chemie hergestellten C-terminalen Peptid (Aminosäuren 74-125) ligiert. Das N-terminale Teilstück wurde dabei als Fusionskonstrukt sowohl mit einem N-terminalen GST-Tag als auch C-terminal, zur Generierung eines Thioesters, mit einem GyrA-Intein rekombinant dargestellt. Nach der Aufreinigung der Peptide konnte die Ligation in einem Phosphatpuffer mit Zusatz von 1% SDS durchgeführt, mittels HPLC aufgereinigt und das Ligationsprodukt in Lipid-Vesikel in eine native tetramere Form zurückgefalten werden. Durch den Einbau nicht nativer Aminosäuren (Komarov *et al.*, 2009), den Einbau einer D-Aminosäure (Valiyaveetil *et al.*, 2004; Valiyaveetil *et al.*, 2006a) und einer Modifikation des Peptid-Rückgrates (Valiyaveetil *et al.*, 2006b) konnten in darauffolgenden Arbeiten wichtige Daten zur Funktion des KcsA auf molekularer Ebene erhalten werden.

#### 3.4.1 Synthesestrategie

Aufbauend auf zur Semisynthese des *Np*HtrII's veröffentlichten Arbeiten (Schiffer, 2005; Martell, 2008; Rzymann, 2011) wurde eine Strategie zur Darstellung des isoto-penmarkierten Transducers verwendet, welche in Abbildung 3.44 aufgezeigt ist. Da das Verfahren der Expressed Protein Ligation (EPL) eingesetzt werden soll, ist das Vorhandensein eines C-terminalen Thioesters im N-terminalen Teilstück und eines N-terminalen Cysteinrestes im C-terminalen Fragment notwendig. Daher war beabsichtigt, ein N-terminales Transducerfragment [Aminosäuren 1 bis 94; *Np*HtrII (1-94)] durch Nutzung der Intein-Technologie (Xu *et al.*, 1993; Severinov and Muir, 1998) mit einem C-terminalen Thioester darzustellen (**P24**). Dabei sollte dieses mit einem Mxe-Intein und einem His-Tag in *E. coli* rekombinant dargestellt werden (**P23**). Nach der Aufreini-

gung sollte das Intein-Segment mit einem Thiol abgespalten werden, um den C-terminalen Thioester des N-terminalen Transducerfragmentes zu erhalten (**P24**).

Für die Darstellung der isotopenmarkierten Transducer-Analoga bedarf es eines günstigen Zuganges zu den C-terminalen isotopenmarkierten Peptiden. Dazu sollten Protokolle für die Markierung von Proteinen mittels synthetischer Minimalmedien, welche [ $^{13}\text{C}$ ] D-Glukose und/oder [ $^{15}\text{N}$ ] Ammoniumchlorid als Kohlenstoff bzw. Stickstoffquelle beziehen, eingesetzt werden (Goto und Kay, 2000; McIntosh und Dahlquist, 1990). Um ein N-terminales Cystein zu erhalten, wurde eine TEV-Protease Schnittstelle und eine Glutathion-S-transferase-Sequenz eingefügt (**P25a**, **P25b**). Nach Aufreinigung der Konstrukte über den GST-Tag sollte die Glutathion-S-transferase-Sequenz protolytisch abgespalten und dadurch ein N-terminales Cystein generiert werden (**P26a**, **P26b**). Die verwendeten Konstrukte wurden in einer vorherigen Arbeit kloniert (Martell, 2008) und standen in Form von plasmidischer DNA zur Verfügung.

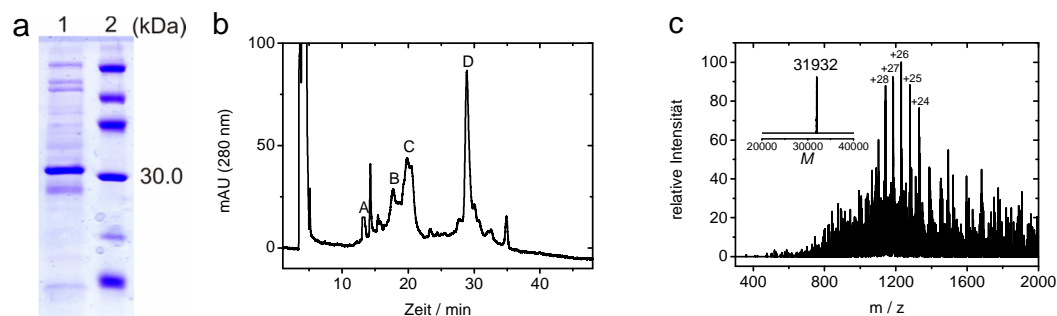


**Abbildung 3.44:** Strategie für die semisynthetische Darstellung des Transducers. Der nicht isotopenmarkierte Bereich, welcher die beiden transmembranen Helices umfasst, ist in blau gezeigt. Der Bereich der isotopenmarkiert vorliegen soll, ist in gelb dargestellt.

### 3.4.2 Expression und Aufreinigung der Peptide

#### 3.4.2.1 Expression und Aufreinigung von *NpHtrII* 1-94-MXE-His

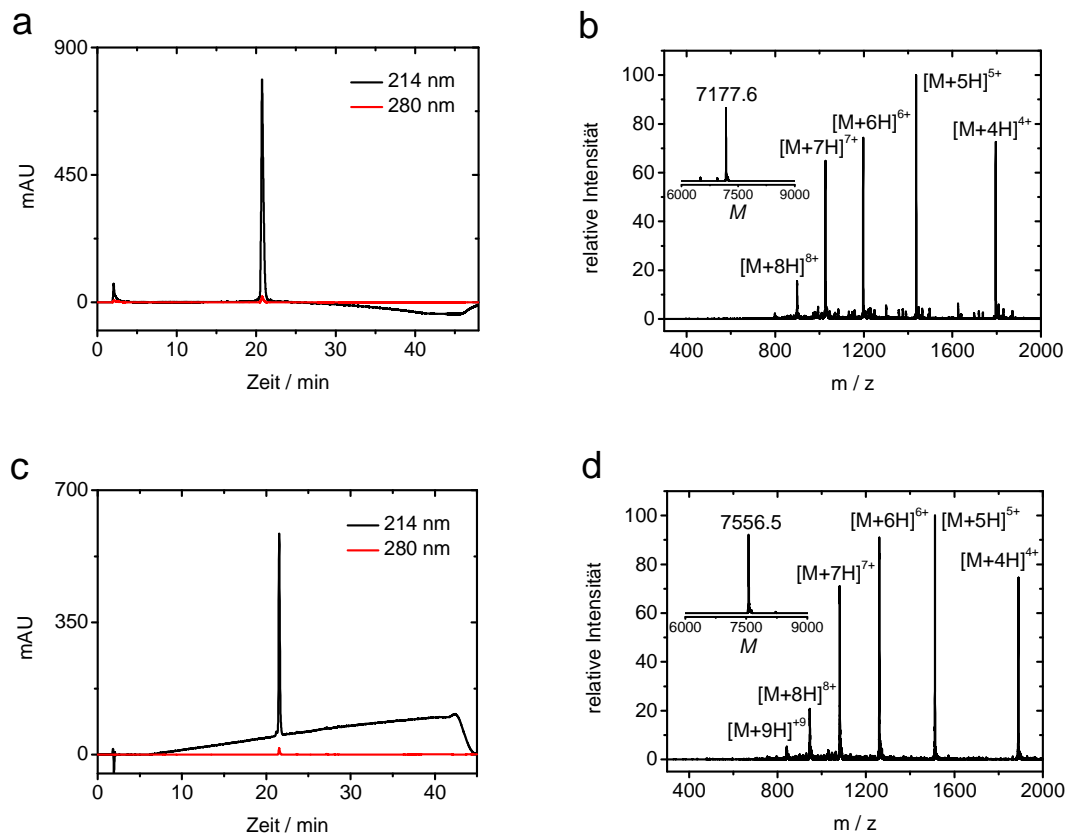
Die Überexpression von *NpHtrII* 1-94-MXE-His (**P23**) erfolgte wie in Kapitel 2.6.2.1 beschrieben. Die durchschnittliche Proteinausbeute lag bei 3.5 mg pro Liter Medium. Abbildung 3.45 (a) zeigt eine Analyse mittels SDS-PAGE und Abbildung 3.45 (b) ein HPLC-Chromatogramm (C4-Säule, Eluentensystem 4, Gradient 5). In beiden Abbildungen ist das Vorhandensein von Verunreinigungen zu erkennen, welche sich nicht durch weitere Aufreinigungsversuche (zusätzliche Ni-NTA-Affinitätschromatographie oder Größenausschluss-Chromatographie) abtrennen ließen. Eine Analyse mittels ESI-MS (Abbildung 3.45 (c)) zeigte, dass das Protein ohne N-terminales Methionin dargestellt wurde, da eine molekulare Masse von  $31932 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  anstatt von  $32074.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  festgestellt wurde. Das Protein wurde gegen den Ligationspuffer dialysiert und in der Folge für Ligationsexperimente eingesetzt.



**Abbildung 3.45:** (a) SDS-PAGE des aufgereinigten *NpHtrII* 1-94-MXE-His (**P23**). (1) *NpHtrII* 1-94-MXE-His, (2) LMW-Marker. (b) Chromatogramm des aufgereinigten *NpHtrII* 1-94-MXE-His. Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C4-Säule ( $125 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) durchgeführt, wobei Gradient 5 und Eluentensystem 4 verwendet wurden. Peak (A) stellt ein zum Ansatz hinzugegebenes Peptid dar. Die Peaks (B) und (C) wurden auch bei einer Injektion von Puffer beobachtet. Peak (D) stellt das *NpHtrII* 1-94-MXE-His dar. (c) ESI-MS von Peak (D) (theoretische molekulare Masse:  $31911.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; gemessene molekulare Masse:  $31932 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

#### 3.4.2.2 Expression und Aufreinigung von GST-TEV-NpHtrII 95C-157

Die Überexpression von GST-TEV-NpHtrII 95C-157 (**P25a** und **P25b**) geschah wie in Kapitel 2.6.2.2 beschrieben. Das Protein wurde mittels Affinitätschromatographie mit einer GSH-Sepharose-Säule aufgereinigt und ein N-terminales Cystein mittels TEV-Verdau generiert. Hierzu wurden pro 50 mg GST-TEV-NpHtrII 95C-157 1 mg TEV-Protease hinzugegeben und eine Konzentration von 1 mM DTT eingestellt. Der Verdau wurde mittels SDS-PAGE und analytischer HPLC (C4-Säule, Eluentensystem 1, Gradient 1) verfolgt. Nach dem nahezu quantitativen Verdau wurde die Reaktionslösung zentrifugiert und ein sich bei der Reaktion gebildeter Niederschlag abgetrennt. Der Überstand wurde in der Folge mittels HPLC aufgereinigt. Ausgewählte Fraktionen wurden mittels ESI-MS und analytischer HPLC untersucht. Fraktionen, die das Produkt in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt, lyophilisiert und bei -20 °C gelagert, wobei die Peptide mit einer Ausbeute von 3 mg pro Liter Medium erhalten wurden. Abbildung 3.46 zeigt die analytischen Daten für das nicht markierte (**P26a**) und das isotope markierte (**P26b**) Peptid. Aus der Differenz der theoretischen molekularen Masse bei einer 100%igen Label-Effizienz und der gemessenen molekularen Masse ergibt sich eine tatsächliche Label-Effizienz des markierten Peptides von 99%.

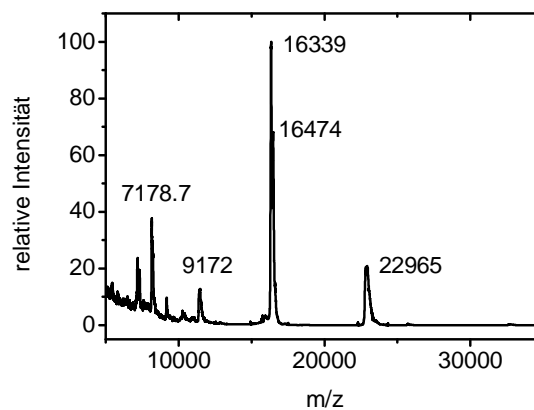


**Abbildung 3.46:** (a) Chromatogramm des aufgereinigten *NpHtrII* 95C-157 (**P26a**). Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C4-Säule (125 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) durchgeführt, wobei Gradient 1 und Eluentensystem 1 verwendet wurden (vgl. Rzymann, 2011). (b) ESI-MS des aufgereinigten *NpHtrII* 95C-157 (**P26a**). Theoretische molekulare Masse: 7177.7 g $\cdot$ mol<sup>-1</sup>; gemessene molekulare Masse: 7177.6 g $\cdot$ mol<sup>-1</sup> (vgl. Rzymann, 2011). (c) Chromatogramm des aufgereinigten *NpHtrII* 95C-157 (**P26b**). Dabei wurde die HPLC-Analyse mit einer C4-Säule (125 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) durchgeführt, wobei Gradient 1 und Eluentensystem 1 verwendet wurde. (d) ESI-MS des aufgereinigten *NpHtrII* 95C-157 (**P26b**). Theoretische molekulare Masse: 7559.0 g $\cdot$ mol<sup>-1</sup>; gemessene molekulare Masse: 7556.5 g $\cdot$ mol<sup>-1</sup>. Aus der Differenz der theoretischen molekularen Masse bei 100% Label-Effizienz und der gemessenen, ergibt sich eine tatsächliche Label-Effizienz von 99%.

### 3.4.3 Semisynthese und Isotopenmarkierung

Nach der erfolgreichen Überexpression der Peptide mussten Ligationsbedingungen und eine geeignete Aufreinigungsmethode zur Isolierung des Ligationsproduktes *NpHtrII* 1-157 ermittelt werden. Die Semisynthese wurde dabei mit dem nicht isoto-  
 penmarkierten Peptid etabliert. In den veröffentlichten Arbeiten (Schiffer, 2005; Martell, 2008; Rzymann, 2011) wurden bereits Bedingungen zur Ligation von Peptiden, welche von dem Transducerprotein *NpHtrII* abstammten, entwickelt. Daher wurde die Ligation zwischen *NpHtrII* 1-94-MXE-His und *NpHtrII* 95C-157 in einem Puffersystem bestehend aus 0.05% DDM, 50 mM NaPi, 300 mM Natriumchlorid, 200 mM Mesna, pH 8 durchgeführt (Rzymann, 2011), wobei die Konzentration des *NpHtrII* 1-94-MXE-

His etwa 10  $\mu\text{M}$  betrug und sieben Äquivalente des Peptides *NpHtrII* 95C-157 verwendet wurden. Hierbei erfolgte die Thioesterbildung in situ. In der Arbeit von Rzymann (Rzymann, 2011) konnte die Bildung des Ligationsproduktes *NpHtrII* 1-157 mittels SDS-PAGE und MALDI-MS nachgewiesen werden. Abbildung 3.47 zeigt ein typisches MALDI-Massenspektrum der Ligationlösung, wobei die verschiedenen Komponenten im Rahmen der Genauigkeit der verwendeten Methode zugeordnet werden konnten. Die große Peakbreite ( $\pm 30$  m/z) verhinderte eine exakte Bestimmung. Das Ligationsprodukt besitzt eine molekulare Masse von 16316.4  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (gemessen: 16338  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; plus 21.6), das MESNA-Addukt des Ligationsproduktes eine molekulare Masse von 16452.6  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (gemessen: 16474  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; plus 21.4). Der hydrolysierte Thioester *NpHtrII* 1-94 konnte dem Peak bei 9172 m/z zugeordnet werden (*NpHtrII* 1-94 besitzt eine molekulare Masse von 9156.7  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; gemessen: 9171  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; plus 14.3) und das Intein dem Peak mit einem Maximum bei 22965 m/z (berechnete molekulare Masse: 22772.6  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; einfaches MESNA-Addukt: 22908.8  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , zweifaches Mesna-Addukt: 23045.0  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Das Massenspektrum belegt sowohl ein erfolgreiches Intein-Splicen als auch eine abgelaufene Ligation der Peptide *NpHtrII* 1-94-SMESNA und *NpHtrII* 95C-157.



**Abbildung 3.47:** MALDI-MS der Ligationlösung von *NpHtrII* 1-94-MXE-His (**P23**) und *NpHtrII* 95C-157 (**P26a**). Die Ligation wurde in einem Puffersystem bestehend aus 0.05% DDM, 50 mM NaPi, 300 mM Natriumchlorid, 200 mM Mesna, pH 8 durchgeführt. Die Probe wurde mittels Chloroform-Methanol-Fällung gefällt, in 80%iger Ameisensäure gelöst und mittels DHB als Matrix vermessen. Die m/z-Werte wurden auf die des Peptides *NpHtrII* 95C-157 (**P26a**) kalibriert (berechnete molekulare Masse: 7177.7  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Da in früheren Arbeiten keine geeignete Aufreinigungsmethode ermittelt werden konnte, die sowohl ausreichende Mengen des Ligationsproduktes *NpHtrII* 1-157 (**P27a**)

zur Analyse mittels Festkörper-NMR ( $\geq 1.5$  mg) liefert, als auch das Ligationprodukt in ausreichender Reinheit zu Verfügung stellt, wurden darüber hinaus verschiedene Aufreinigungsmethoden getestet (Rzymann, 2011; dieses Forschungsprojekt). Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

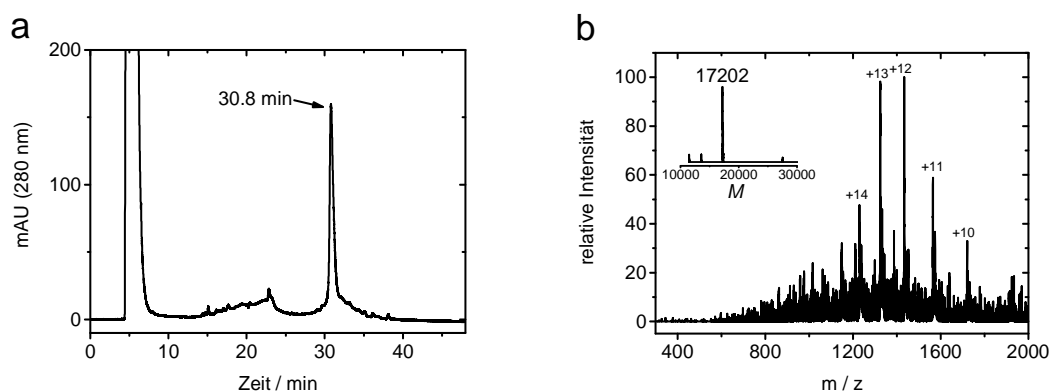
**Tabelle 3.10:** Getestete Aufreinigungsmethoden.

Methoden	Stationäre Phase	Mobile Phase	Kommentar
Größenausschluss-Chromatographie	Superdex 200	0.05% DDM, 50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 200 mM Mesna, pH 8	Keine ausreichende Auftrennung
HPLC	C4-Säule	Puffer A: Wasser 0.1% TFA Puffer B: Acetonitril 0.08% TFA	Keine Elution des Proteins
HPLC	Diphenyl-Säule	Puffer A: Wasser 0.1% TFA Puffer B: Acetonitril 0.08% TFA	Keine Elution des Proteins
HPLC	C4-Säule, 60 °C	Puffer A: Wasser 0.1% TFA Puffer B: 60% Isopropanol, 30% Acetonitril, 10% Wasser 0.1% TFA	Keine Elution des Proteins
HPLC	C4-Säule	Puffer A: 60% Ameisensäure, 40% Wasser Puffer B: Isopropanol	Elution des Proteins und ausreichende Auftrennung

Es ist zu erkennen, dass ein Versuch die Ligation mittels Größenausschluss-Chromatographie aufzureinigen an der mangelnden Trennleistung des Systems scheiterte, da das semisynthetische *NpHtrII* 1-157 nicht von den anderen Komponenten der Ligationlösung abgetrennt werden konnte. Die Versuche das Ligationprodukt mittels HPLC aufzureinigen, führten zunächst ebenfalls nicht zum Ziel, da eine irreversible Bindung des Ligationproduktes an die verwendeten HPLC-Säulen beobachtet wurde. Erst die Nutzung eines Ameisensäure/Isopropanol-Puffersystems, welches in Kapitel 3.3 vorgestellt wurde, gestattete eine Aufreinigung der Membrandomäne. Die Hauptnachteile dieser Methode sind die Möglichkeit einer Protein-Formylierung, welche sich in multiplen +28 Da Addukten äußert und die Notwendigkeit für eine Detektion bei 280 nm, da dieses Eluentensystem bei 214 nm wegen der Absorption der Ameisensäure nicht transparent ist. Dies war insbesondere ein Nachteil, da in der Sequenz von *NpHtrII* 1-157 (**P27a**) kein Tryptophan und nur drei Tyrosine vorkommen. Dies hatte zur Folge, dass der Extinktionskoeffizient bei 280 nm niedrig war ( $4470 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,



ExPASy ProtParam tool, Swiss Institute of Bioinformatics, in: <http://web.expasy.org/protparam/>, am 15.07.2013, 10:30 Uhr) und der resultierende Peak im Chromatogramm eine sehr geringe Intensität besaß. In Analogie zu Kapitel 3.3 wurde daher die Aufreinigung zunächst mit dem rekombinanten Protein etabliert (**P28**). Abbildung 3.48 zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm und das ESI-MS des Peaks bei 30.8 min. Man erkennt, dass das rekombinante *NpHtrII* 1-157 mit dieser Methode aufgereinigt werden kann.

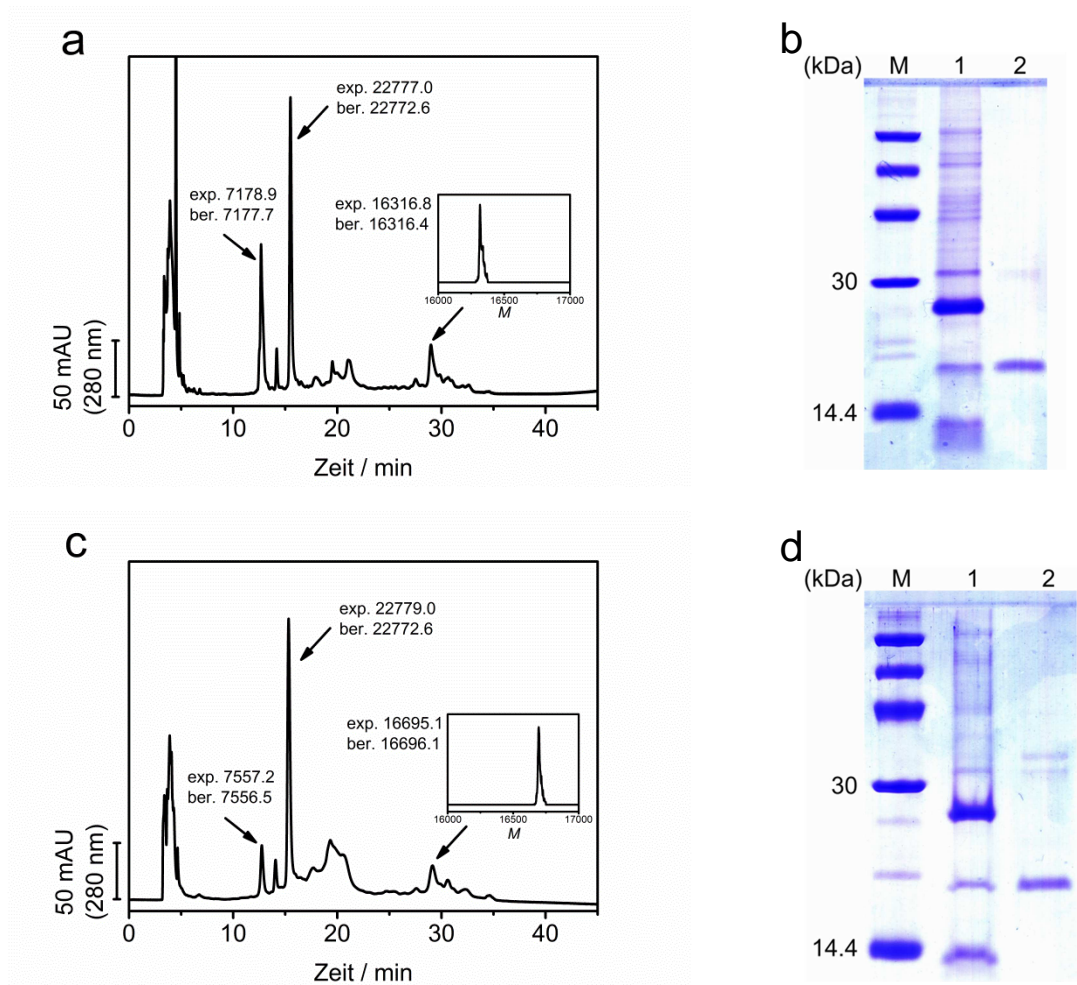


**Abbildung 3.48:** (a) Chromatogramm des rekombinant dargestellten *NpHtrII* 1-157 (**P28**). Die HPLC-Analyse wurde mit einer C4-Säule (125 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) durchgeführt, wobei Gradient 5 und Eluentensystem 4 verwendet wurden. (b) ESI-MS des Peaks bei 30.8 min mit dekonvolviertem Spektrum. (Theoretische molekulare Masse: 17202.3  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; gemessene molekulare Masse: 17202.2  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Eine weitere Notwendigkeit war die Etablierung eines Protokolls um das Ligationsprodukt nach der HPLC-Aufreinigung in eine native Form zu falten. Dies wurde – wiederum in Analogie zu Kapitel 3.3 – mit vorhandenem rekombinantem Protein etabliert und dabei das Rückfaltungsprotokoll nach Lahiri *et al.* (2011) eingesetzt (siehe Kapitel 3.3 und Kapitel 2.6.4). Experimente mit dem rekombinanten Protein (**P28**) zeigten, dass etwa 19-23% des eingesetzten Proteins zurückgefalten werden können.

Mit dem so entwickelten Aufreinigungs- und Rückfaltungsprotokoll konnte das semi-synthetische Ligationsprodukt aufgereinigt und in einen DDM-haltigen Puffer rückgefalten werden. Die Ligation zwischen *NpHtrII* 1-94-MXE-His und *NpHtrII* 95C-157 wurde nun sowohl mit dem nicht isotopenmarkierten Peptid *NpHtrII* 95C-157 als auch mit dem isotopenmarkierten Peptid *NpHtrII* 95C-157 durchgeführt und mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt. Dabei wurden für Ligationen mit nicht isotopenmarkierten Peptid *NpHtrII* 95C-157 sieben Äquivalente dieses Peptides eingesetzt, wobei

eine durchschnittliche Ausbeute von 30% nach der Ligation, HPLC-Aufreinigung und Rückfaltung erhalten werden konnte. Im Falle von Ligationen mit dem isotopenmarkierten Peptid *NpHtrII* 95C-157 wurde nach der Ligation, HPLC-Aufreinigung und Rückfaltung bei Nutzung von 2.5 Äquivalenten eine durchschnittliche Ausbeute von 23% erreicht; bei Verwendung von 1.2 Äquivalenten eine durchschnittliche Ausbeute von 16%. Grund für die Nutzung von unterschiedlichen Äquivalenten des Peptides *NpHtrII* 95C-157 war die geringe vorhandene Menge des isotopenmarkierten Peptides *NpHtrII* 95C-157, so dass die Reaktion dahingehend optimiert werden musste. Abbildung 3.49 zeigt die dabei erhaltenen HPLC-Chromatogramme mit dazugehörigen dekonvoluierten Massenspektren der Ligationsprodukte und die Analysen mittels SDS-PAGE.



**Abbildung 3.49:** (a) HPLC-Chromatogramm der Ligation (mit **P26a**, C4-Säule, Eluentensystem 4, Gradient 5) mit dazugehörigem dekonvolvierten Massenspektrum des Ligationsproduktes (**P27a**). (b) SDS-PAGE der Ligation (mit **P26a**) vor (Spur 1) und nach Aufreinigung bzw. Rückfaltung in einen DDM-beinhaltenden Puffer (Spur 2). (c) HPLC-Chromatogramm der Ligation (mit **P26b**, C4-Säule, Eluentensystem 4, Gradient 5) mit dazugehörigem dekonvolvierten Massenspektrum des Ligationsproduktes (**P27b**). (d) SDS-PAGE der Ligation (mit **P26b**) vor (Spur 1) und nach Aufreinigung bzw. Rückfaltung in einen DDM-beinhaltenden Puffer (Spur 2).

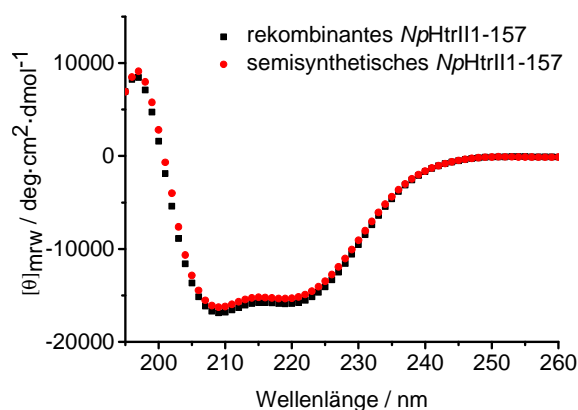
Die Peaks in den Chromatogrammen (Abbildungen 3.49 (a) und (c)) konnten mittels ESI-MS Spezies aus dem Reaktionsansatz zugeordnet werden. Das Peptid *Np*HtrII 95C-157 (**P26a**) eluiert bei einer Retentionszeit von 12.7 min (Abbildung 3.49 (a)). Bei 15.5 min beobachtet man den Peak des Inteins (**P29**). Das Ligationsprodukt *Np*HtrII 1-157 folgt bei einer Retentionszeit von 29.0 min (**P27a**). Darüber hinaus konnte der Peak bei 30.6 min mittels MALDI-MS dem nicht umgesetzten *Np*HtrII 1-94-SMESNA (**P24**) zugeordnet werden. Die Analysen mittels SDS-PAGE (Abbildung 3.49 (b) und (d)) zeigen jeweils eine Probe des Ligationsansatzes (Spur 1) und eine nach der Aufreinigung und Rückfaltung (Spur 2). In den Gel-Spuren 1 unter den 30 kDa Banden der Marker

befinden sich die Banden der Inteine (**P29**). Knapp unter den 20 kDa Banden de Marker beobachtet man die Ligationsprodukte (**27a, b**) und auf der Höhe von etwa 14 kDa die Banden der zugegebenen Peptide *NpHtrII* 95C-157 (**26a, b**). In den Gel-Spuren 2 ist zu erkennen, dass das Ligationsprodukt (**27a, b**) in beiden Fällen aufgereinigt werden konnte (Abbildung 3.49 (b) und (d)).

Nach der Etablierung des Aufreinigungs- und Rückfaltungsprotokolles wurden mit dem nicht isotoopenmarkierten Transducer (**27a**) die in Kapitel 3.4.4 beschriebenen Experimente zur Charakterisierung des semisynthetischen *NpHtrII* 1-157 durchgeführt. Das isotoopenmarkierte Konstrukt (**27b**) wurde gemäß Kapitel 2.6.5 in Proteoliposome aus *Halobacterium salinarum* rekonstituiert und soll für Festkörper-NMR-Experimente in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marc Baldus (Universität Utrecht) verwendet werden.

### 3.4.4 Charakterisierung des semisynthetischen *NpHtrII* 1-157

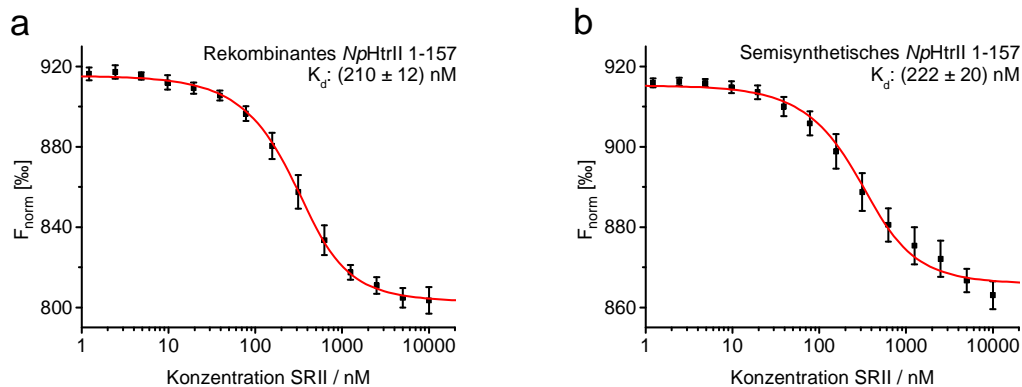
Zur Charakterisierung wurde das in einen DDM-haltigen Puffer zurückgefaltene, nicht isotopenmarkierte *NpHtrII* mittels CD-Spektroskopie, optisch erzeugter Thermophorese (engl. *Microscale Thermophoresis*), Größenausschluss-Chromatographie und Blauer-Nativer-Gelelektrophorese untersucht. Abbildung 3.50 zeigt die CD-Spektren des semisynthetischen und des rekombinant dargestellten *NpHtrII*.



**Abbildung 3.50:** CD-Spektren des rekombinant (P28) (schwarze Kurve) und des semisynthetisch (P27a) (rote Kurve) dargestellten *NpHtrII* 1-157. Die Messungen wurden in einem Puffer bestehend aus 150 mM Natriumchlorid, 25 mM NaPi, 0.5% DDM, pH 8 bei Raumtemperatur durchgeführt.

Der Verlauf der Kurven in beiden Proben ist nahezu identisch. Es konnten in beiden Spektren hauptsächlich  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturelemente beobachtet werden. Da eine ähnliche Sekundärstruktur noch kein Beweis darstellt, dass ein funktionales Protein dargestellt wurde, wurde die Bindungsaffinität zu dem Photorezeptor SRII mittels optisch erzeugter Thermophorese ermittelt. Die Bindungsaffinität des rekombinant dargestellten *NpHtrII* 1-157 ist bereits in vorherigen Arbeiten mittels ITC zu  $(161 \pm 16)$  nM bestimmt worden (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003). Für die Messungen mittels optisch erzeugter Thermophorese wurden die Proteine mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Kits (NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland) mit einem Fluoreszenzfarbstoff nach Angaben des Herstellers markiert. Nun wurde eine Verdünnungsreihe des nicht markierten Bindungspartners (SRII) präpariert und eine konstante Menge des markierten Bindungspartners hinzugegeben. Nach Durchführung des Experimentes wurden die Daten mittels der Software NT Analysis (NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland) ausgewertet und die  $K_d$ -Werte bestimmt (Ab-

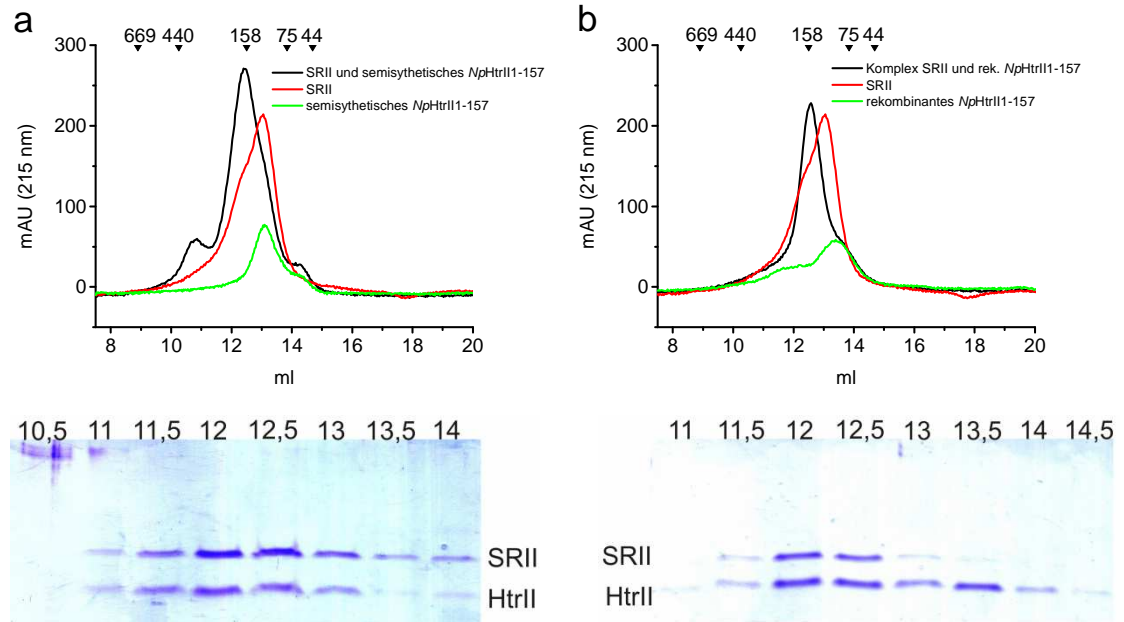
bildung 3.51 (a) und (b)). Im Rahmen der Messgenauigkeit stimmten der  $K_d$ -Wert des synthetischen und des rekombinanten HtrII überein. Ein Vergleich mit veröffentlichten ITC-Daten (Hippler-Mreyen *et al.*, 2003) zeigt, dass die mittels optisch erzeugter Thermophorese bestimmten  $K_d$ -Werte in derselben Größenordnung liegen.



**Abbildung 3.51:** Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen *NpHtrII* 1-157 und SRII mittels optisch erzeugter Thermophorese. Hierfür wurde das Transducerprotein mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes markiert und jeweils eine konstante Menge für jeden Messpunkt eingesetzt, wohingegen die Konzentration des SRII variiert wurde. Die Konzentration des markierten synthetischen Proteins betrug 157 nM; die des rekombinanten 172 nM. Für die Berechnung eines  $K_d$ -Wertes wurden drei unabhängige Titrations verwendet, wobei jeweils drei Messungen direkt nacheinander durchgeführt wurden. (a) Rekombinant dargestelltes *NpHtrII* 1-157 (P28). (b) Semisynthetisches *NpHtrII* 1-157 (P27a).

Zur weiteren Charakterisierung der Komplexbildung wurden Experimente mittels Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt. Die Größenausschluss-Chromatographie basiert auf der unterschiedlichen Permeation von Analyten in ein poröses Trägermaterial und trennt dabei gelöste Moleküle nach ihrer Größe (Lottspeich und Zorbas, 1998). Der Komplex, bestehend aus dem *NpHtrII* 1-157 und dem SRII, sollte ein höheres effektives Molekulargewicht besitzen als die beiden Komponenten alleine und bei früheren Zeiten eluieren. Die Experimente wurden mittels einer Superdex 200 10/300 GL (optimaler Trennbereich für globuläre Proteine: 10000-600000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) durchgeführt, da bei der Verwendung einer Superdex 75 10/300 GL (optimaler Trennbereich für globuläre Proteine: 3000-70000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) die Proteine im Ausschussvolumen eluieren. Ein 1:1 Komplex des *NpHtrII* 1-157 und des SRIIs besitzt ein Molekulargewicht von etwa 44000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Der Grund warum die Proteine im Ausschussvolumen einer Superdex 75 10/300 GL eluieren, sollte auf das Detergens DDM zurückzuführen sein, da eine DDM-Mizelle eine molekulare Masse von etwa 50000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  besitzt. Daher wurden sowohl die einzelnen Proteine als auch beide Komponenten zusammen nach

einer einstündigen Inkubation mit einer Superdex 200 10/300 GL analysiert. Abbildung 3.52 zeigt die erhaltenen Ergebnisse für das semisynthetische *NpHtrII* und das rekombinante Protein.

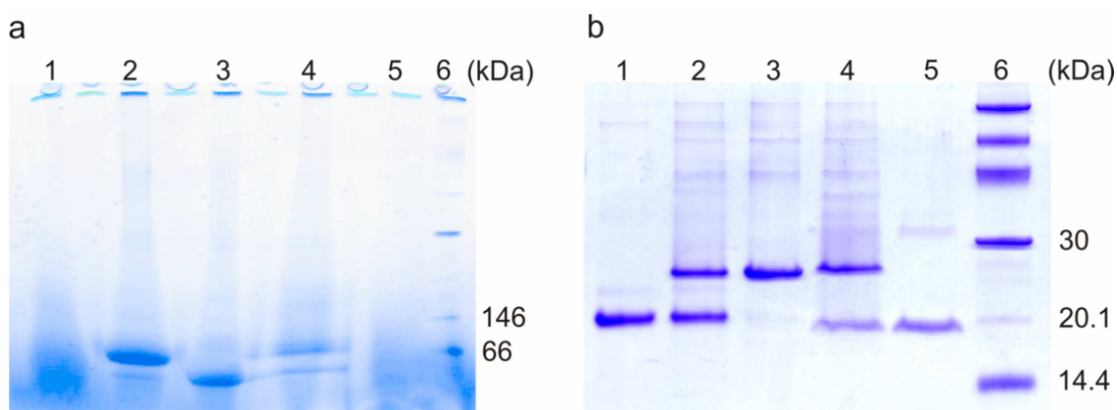


**Abbildung 3.52:** Analyse der Komplexbildung zwischen *NpHtrII* 1-157 und SRII mittels Größenausschluss-Chromatographie durch eine Superdex 200 10/300 GL und SDS-PAGE. Als mobile Phase wurde ein Puffer bestehend aus 0.05% DDM, 50 mM NaPi, 300 mM Natriumchlorid, 200 mM Mesna, pH 8 verwendet. Es wurden jeweils 20 µg der Proteine aufgetragen. Die Retentionszeiten des Proteinstandards sind in den Chromatogrammen abgebildet. (a) Semisynthetisches *NpHtrII* 1-157 (P27a) und SRII (P22). (b) Rekombinant dargestelltes *NpHtrII* 1-157 (P28) und SRII (P22). Unter den Chromatogrammen ist die Analyse unterschiedlicher Fraktionen mittels SDS-PAGE gezeigt.

Sowohl bei der Analyse der Komplexbildung des semisynthetischen *NpHtrII* 1-157 als auch bei der Analyse des rekombinant dargestellten *NpHtrII* 1-157 ist eine Verringerung der Retentionszeiten im Vergleich zu den Läufen der einzelnen Komponenten zu erkennen. Dies deutet auf ein höheres effektives Molekulargewicht hin. Durch Berechnung des effektiven Molekulargewichtes der Proteine mit Hilfe einer Eichgeraden erhält man für das SRII einen Wert von 110000 g·mol<sup>-1</sup>, für das exprimierte *NpHtrII* 1-157 einen Wert von 90000 g·mol<sup>-1</sup>, für das semisynthetisch dargestellte *NpHtrII* 1-157 einen Wert von 100000 g·mol<sup>-1</sup>, für den Komplex aus dem rekombinant dargestellten Proteinen einen Wert von 135000 g·mol<sup>-1</sup> und für den Komplex aus dem SRII und dem semisynthetischen *NpHtrII* 1-157 einen Wert von 145000 g·mol<sup>-1</sup>. Die Abweichungen von den tatsächlichen molekularen Gewichten (siehe Anhang A.3) könnte auf das Vorhandensein des Detergens DDM zurückzuführen sein. Der Wert für das SRII stimmt mit

veröffentlichten Daten überein (Li, 2013). Eine Analyse verschiedener Fraktionen mittels SDS-PAGE zeigte, dass der nach der Komplexbildung neu entstandene Peak sich dem Komplex aus *NpHtrII* 1-157 und SRII zuordnen lässt. Die beobachteten Unterschiede der Retentionszeiten der verschiedenen Komponenten sind allerdings gering, entsprechen aber den nach der Eichgeraden zu erwartenden Werten. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich das semisynthetische *NpHtrII* 1-157 und das rekombinante Protein in einer Analyse mittels Größenausschluss-Chromatographie gleich verhalten. In beiden Fällen konnte die Komplexbildung verfolgt werden.

Abschließend wurde die Bildung des Komplexes aus *NpHtrII* 1-157 und SRII mittels Blauer-Nativer-Gelelektrophorese (BN-PAGE) analysiert. Bei dieser Methode wird im Vergleich zur SDS-PAGE das denaturierende Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) durch Coomassie Blau G-250 ersetzt (Schägger und Jagow, 1991; Wittig *et al.*, 2006). Dieses bindet an Proteine, welche in der Folge zur Anode wandern. Proteine oder Proteinkomplexe behalten dabei ihre native Struktur, weil Coomassie Blau nicht als Detergens wirkt. Abbildung 3.53 (a) zeigt ein zur Analyse der Komplexbildung angefertigtes 4-16%iges Gradientengel. Dabei wurden die Proben des semisynthetischen (**P27a**) und des rekombinanten Transducers vor Durchführung der Gelelektrophorese für eine Stunde mit dem SRII inkubiert (Spur 2 und 4). In Abbildung 3.53 (b) sind die dafür verwendeten Komponenten mittels SDS-PAGE analysiert.



**Abbildung 3.53:** (a) BN-PAGE und (b) SDS-PAGE zur Analyse der Komplexbildung.

BN-PAGE zur Komplexbildung

Spur 1: rekombinanter Transducer (10 µg)

Spur 2: rekombinanter Transducer (10 µg) + SRII (15 µg)

Spur 3: SRII (15 µg)

Spur 4: semisynthetischer Transducer (10 µg) + SRII (15 µg)

Spur 5: semisynthetischer Transducer (10 µg)

SDS-PAGE der verwendeten Proteine

Spur 1: rekombinanter Transducer

Spur 2: rekombinanter Transducer und SRII

Spur 3: SRII

Spur 4: semisynthetischer Transducer und SRII

Spur 5: semisynthetischer Transducer



Aus Abbildung 3.53 (a) ist zu erkennen, dass in den Gel-Spuren 2 und 4 (Mischungen aus *Np*SRII und dem rekombinanten oder dem semisynthetischen *Np*HtrII 1-157) eine Bande bei höherem Molekulargewicht auftritt, die sich deutlich von der Bande des SRII abhebt (Spur 3). Die Banden in Spur 2 und 4 liegen zwischen den Markerbanden von 66 kDa und 146 kDa und sollten dem Komplex aus beiden Proteinen zuzuordnen sein. Eine genaue Zuordnung kann aufgrund der geringen Auflösung dieses Gradientengels nicht durchgeführt werden. Darüber hinaus laufen die Transducerproteine ohne Komplexierung mit SRII nicht als distinkte Bande, sondern schmieren über einen breiten Bereich des Gels (Abbildung 3.53 (a) Spur 1 und 5). Man erkennt weiterhin in Abbildung 3.53 (b) eine geringere Intensität der Färbung des semisynthetischen Transducers im Vergleich zum rekombinanten Protein, was auf den nicht vorhandenen His-Tag des semisynthetischen Transducers zurückgeführt werden kann.

Die Ergebnisse diese Untersuchungen zeigen, dass sich die Komplexbildung des semisynthetischen Transducers und des SRII sowohl mittels Größenausschluss-Chromatographie, BN-PAGE als auch mittels optisch erzeugter Thermophorese beobachten lässt. Durch Nutzung der optisch erzeugten Thermophorese konnten darüber hinaus Bindungsaffinitäten für das semisynthetische und das rekombinante *Np*HtrII 1-157 gegenüber dem Rezeptor SRII ermittelt werden, wobei diese im Rahmen der Messgenauigkeit gut übereinstimmten. Weiterhin waren diese mittels optisch erzeugter Thermophorese bestimmten Werte vergleichbar mit denen in früheren Arbeiten durch ITC bestimmten Bindungsaffinitäten, des rekombinanten Proteins mit dem SRII. Die Analyse mittels CD-Spektroskopie ließ auf eine weitgehend übereinstimmende Sekundärstruktur des semisynthetischen *Np*HtrII 1-157 im Vergleich zum rekombinanten Protein schließen. Diese Resultate zeigen, dass das semisynthetische und das rekombinante *Np*HtrII 1-157 ähnliche Struktur- und Bindungseigenschaften besitzen.

– Zusammenfassung Kapitel 3.4 –

Auf veröffentlichten Vorarbeiten aufbauend (Schiffer 2005; Martell, 2008; Rzymann, 2011) konnte die Semisyntese, die HPLC-Aufreinigung und die Rückfaltung eines verkürzten, die erste HAMP-Domäne umfassenden Transducerkonstruktes etabliert werden. Dazu wurde ein N-terminales Transducerfragment *NpHtrII* (1-94) durch Nutzung der Intein-Technologie mit einem Mxe-Intein und einem His-Tag in *E. coli* rekombinant dargestellt. Darüber hinaus wurden das C-terminale Peptid *NpHtrII* 95C-157 als Fusionskonstrukt mit einer Glutathion-S-Transferase-Sequenz und einer TEV-Protease-Schnittstelle ebenfalls in *E. coli* überexprimiert. Nach Aufreinigung dieses Konstruktes über den GST-Tag wurde die Glutathion-S-Transferase-Sequenz mittels Verdau mit einer TEV-Protease abgespalten und dadurch ein N-terminales Cystein freigelegt. Die Aufreinigung dieses Peptides erfolgte über HPLC. Durch Überexpression in Minimalmedien, welche  $^{13}\text{C}$  D-Glukose und  $^{15}\text{N}$  Ammoniumchlorid als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle enthalten, konnte das Peptid *NpHtrII* 95C-157 in  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierter Form erhalten werden. Es wurde ein Markierungsgrad von 99% erreicht. Die Ligation zwischen *NpHtrII* 1-94-MXE-His und *NpHtrII* 95C-157 wurde in einem das Detergens DDM beinhaltenden Puffersystem durchgeführt. Hierbei erfolgte die Thioesterbildung *in situ*. Für die HPLC-Aufreinigung der Ligation war die Nutzung einer mobilen Phase, bestehend aus Ameisensäure, Wasser und Isopropanol, auf einer C4-Säule notwendig. In der Folge wurde ein Rückfaltungsprotokoll von Lahiri *et al.* (2011) eingesetzt, um das Ligationsprodukt in einen DDM-haltigen Puffer zu überführen. Ein nicht isotonmarkiertes Transduceranalogon wurde mittels CD-Spektroskopie, optisch erzeugter Thermophorese (*engl. Microscale Thermophoresis*), Größenausschluss-Chromatographie und Blauer-Nativer-Gelelektrophorese untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass das Ligationsprodukt vergleichbare Struktur- und Bindungseigenschaften wie ein rekombinant dargestelltes Transducerprotein besitzt. Ein isotonmarkiertes Konstrukt soll für Festkörper-NMR-Experimente verwendet werden, welche in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Baldus (Universität Utrecht) durchgeführt werden.

## 4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die chemische Synthese der Membrandomäne des archaebakteriellen Transducerproteins *NpHtrII* unter Ausnutzung der Nativen Chemischen Ligation (NCL) beschrieben. Durch die Etablierung einer Synthese wurden die Voraussetzungen für eine chemische Modifizierung des *NpHtrII* geschaffen, um sowohl den Einbau eines chemisch synthetisierten Photoschalters als auch die Inkorporation von Reportergruppen für biophysikalische Methoden zu ermöglichen.

Zunächst wurden mechanistische Untersuchungen zur Photoisomerisierung des Thioindigos – des Grundchromophors des bereits in Peptide eingebauten HTI-Photoschalters – durchgeführt. Durch die Synthese und photochemische Charakterisierung der Farbstoffe 4,4'-Dihydroxythioindigo, 4,4'-Dimethoxythioindigo und 4-Methoxy-4'-Hydroxythioindigo wurde gezeigt, dass bereits der Protonentransfer im angeregten Zustand innerhalb nur einer Hemithioindigohälfte die Photostabilität deutlich erhöht.

Um die chemische Synthese der Membrandomäne des *NpHtrII* zu ermöglichen, wurde ein neues auf der NCL basierendes Ligationsverfahren für hydrophobe Peptide in organischen Lösungsmitteln entwickelt. Für das Lösungsmittel DMF wurden die Reaktionsbedingungen so optimiert, dass eine schnelle und effiziente Ligation von Modellpeptiden ermöglicht wurde. Die NCL in DMF stellte sich als chemoselektiv in Gegenwart anderer nukleophiler Gruppen heraus und konnte ohne Epimerisierung der Thioester-tragenden Peptide durchgeführt werden. Darüber hinaus waren die Ligationsbedingungen auch auf andere Peptide anwendbar. Diese Ergebnisse belegen, dass mit der NCL in DMF eine neue Strategie zur Ligation von hydrophoben Peptiden entwickelt wurde, welche das bisherige Methodenspektrum (Einsatz von Detergenzien, Lipiden oder chaotropen Ionen in wässrigen Puffersystemen) erweitert.

Nachdem die methodischen Voraussetzungen etabliert worden waren, konnte die Synthese eines Membranproteins erfolgen. Dazu wurde die 114 Aminosäuren umfassende Sequenz der Membrandomäne des Transducerproteins *NpHtrII* in drei Segmente unterteilt. Die Peptide *NpHtrII* 1-46 und *NpHtrII* 60-114 beinhalteten jeweils die Sequenz für eine transmembrane Helix, wohingegen das Peptid *NpHtrII* 47-59 die Schleife

zwischen den beiden Helices umfasste. Für jede der zwei durchgeführten Ligationen war es notwendig, gesonderte Bedingungen zu etablieren. Die erste Ligation zwischen *NpHtrII* 47Thz-59-*SLeu* und *NpHtrII* 60C-114-His<sub>6</sub> wurde im organischen Lösungsmittel DMF durchgeführt, wohingegen für die Ligation zwischen *NpHtrII* 1-46 und *NpHtrII* 47-114-His<sub>6</sub> ein wässriges Puffersystem mit Zusatz eines Detergens und einer chaotropen Verbindung verwendet wurde. Das Ligationsprodukt wurde in einen DDM-haltigen Puffer zurückgefalten und mittels CD-Spektroskopie, optisch erzeugter Thermophorese sowie Laser-Flash-Photolyse untersucht. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse belegen, dass das synthetische Protein vergleichbare Struktur- und Bindungseigenschaften wie ein rekombinant dargestelltes HtrII besaß. Darüber hinaus konnte keine Veränderung des Photozyklus im Komplex mit dem Rezeptor SRII festgestellt werden.

Um die Größenlimitierung des vollsynthetischen Ansatzes zu überwinden, wurde auf veröffentlichten Arbeiten (Schiffer, 2005; Martell, 2008; Rzymann, 2011) aufbauend die Semisynthese eines verkürzten, die erste HAMP-Domäne umfassenden Transducerkonstruktes etabliert. Nach der HPLC-Aufreinigung und Rückfaltung des Ligationsproduktes in einen DDM-haltigen Puffer wurde nachgewiesen, dass dieses vergleichbare Struktur- und Bindungseigenschaften wie ein rekombinant dargestelltes Protein besaß. Die Herstellung eines Analogons mit isotope markierter erster HAMP-Domäne beweist, dass durch die entwickelte Semisynthese der Einbau von NMR-Label ermöglicht wird. Das isotope markierte Konstrukt soll für Festkörper-NMR-Experimente verwendet werden, welche in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Marc Baldus (Universität Utrecht) durchgeführt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die chemische Synthese von Membranproteinen möglich ist. Die entwickelte Synthese des *NpHtrII* wird sowohl den Einbau eines chemisch synthetisierten Photoschalters als auch die Inkorporation von Reportergruppen für biophysikalische Methoden (z. B. die FTIR- oder ESR-Spektroskopie) gestatten. Diese Modifikationen werden zusätzliche biophysikalische Untersuchungen erlauben und so helfen, weitere Kenntnisse über die Funktion des *NpHtrII* auf molekularer Ebene zu erhalten.

## 5 Literatur

- Airola M.V., Watts K.J., Bilwes A.M., Crane B.R. (2010) Structure of Concatenated HAMP Domains Provides a Mechanism for Signal Transduction. *Structure* 18(4): 436–448.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004) Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- Aravind L., Ponting C.P. (1999) The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 176(1): 111–116.
- Baeyer A., Emmerling A. (1870) Reduktion des Isatins zu Indigoblau. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 3: 514–517.
- Baldauf C., Pagel K., Warnke S., von Helden G., Kokschi B., Blum V., Scheffler M. (2013) How Cations Change Peptide Structure. *Chem. Eur. J.* 19(34): 11224–11234.
- Bang D., Kent S.B.H. (2005) His6 tag-assisted chemical protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(14): 5014–5019.
- Becker C. (2009) Synthese von *NpHtr* Analoga. Bachelorarbeit. Technische Universität Dortmund.
- Berliner L.J., Grunwald J., Hankovszky H.O., Hideg K. (1982) A novel reversible thiol-specific spin label: papain active site labeling and inhibition. *Anal. Biochem.* 119(2): 450–455.
- Blanc J., Ross D.L. (1968) Procedure for determining the absorption spectra of mixed photochromic isomers not requiring their separation. *J. Phys. Chem.* 72(8): 2817–2824.
- Bogomolni R.A., Spudich J.L. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79(20): 6250–6254.
- Bollhagen R., Schmiedberger M., Grell E. (1995) High-performance liquid chromatographic purification of extremely hydrophobic peptides: transmembrane segments. *J. Chromatogr. A* 711(1): 181–186.
- Bordignon E., Klare J.P., Doebber M., Wegener A.A., Martell S., Engelhard M., Steinhoff H.J. (2005) Structural Analysis of a HAMP Domain: the linker region of the phototransducer in complex with sensory rhodopsin II. *J. Biol. Chem.* 280(46): 38767–38775.

- Brode W.R., Pearson E.G., Wyman G.M. (1954) The Relation between the Absorption Spectra and the Chemical Constitution of Dyes. XXVII. cis-trans Isomerism and Hydrogen Bonding in Indigo Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* 76(4): 1034–1036.
- Camarero J.A., Adeva A., Muir T.W. (2000) 3-Thiopropionic acid as a highly versatile multidetachable thioester resin linker. *Lett. Pept. Sci.* 7(1): 17–21.
- Chen X., Spudich J.L. (2002) Demonstration of 2:2 stoichiometry in the functional SRI-HtrI signaling complex in *Halobacterium* membranes by gene fusion analysis. *Biochemistry* 41(12): 3891–3896.
- Chizhov I., Schmies G., Seidel R., Sydor J.R., Lüttenberg B., Engelhard M. (1998) The photophobic receptor from *Natronobacterium pharaonis*: temperature and pH dependencies of the photocycle of sensory rhodopsin II. *Biophys. J.* 75(2): 999–1009.
- Clayton D., Shapovalov G., Maurer J.A., Dougherty D.A., Lester H.A., Kochendoerfer G.G. (2004) Total chemical synthesis and electrophysiological characterization of mechanosensitive channels from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(14): 4764–4769.
- Dawson P., Muir T., Clark-Lewis I., Kent S. (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* 266(5186): 776–779.
- Dittmann M. (2008) Darstellung eines photoschaltbaren transmembranen Peptides. Masterarbeit. Technische Universität Dortmund.
- Dittmann M., Sauermann J., Seidel R., Zimmermann W., Engelhard M. (2010) Native chemical ligation of hydrophobic peptides in organic solvents. *J. Peptide Sci.* 16(10): 558–562.
- Dittmann M., Sadek M., Seidel R., Engelhard M. (2012) Native chemical ligation in dimethylformamide can be performed chemoselectively without racemization. *J. Pept. Sci.* 18(5): 312–316.
- Dittmann M., Graupner F.F., Maerz B., Oesterling S., de Vivie-Riedle R., Zinth W., Engelhard M., Lüttke W. (2014a) Photostabilität von 4,4'-Dihydroxythioindigo: ein Mimetikum des Indigo. *Angew. Chem.* 126(2): 602–605.
- Dittmann M., Graupner F.F., Maerz B., Oesterling S., de Vivie-Riedle R., Zinth W., Engelhard M., Lüttke W. (2014a) Photostability of 4,4'-Dihydroxythioindigo, a Mimetic of Indigo. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53(2): 591–594.

- Dittmann M., Seidel R., Chizhov I., Engelhard M. (2014b) Total chemical synthesis of a membrane protein domain analogue containing two transmembrane helices: functional reconstitution of the semisynthetic sensory rhodopsin/transducer complex. *J. Peptide Sci.* doi: 10.1002/psc.2605
- Doebber M., Bordignon E., Klare J.P., Holterhues J., Martell S., Mennes N., Li L., Engelhard M., Steinhoff H.J. (2008) Salt-driven Equilibrium between Two Conformations in the HAMP Domain from *Natronomonas pharaonis*: the language of signal transfer? *J. Biol. Chem.* 283(42): 28691–28701.
- Dümeland M. (2002) (Hemi-)Indigoderivate - Synthese, Eigenschaften und Anwendung als Haarfärbemittel. Dissertation. Technische Universität Braunschweig.
- Durek T., Torbeev V.Y., Kent S.B.H. (2007) Convergent chemical synthesis and high-resolution x-ray structure of human lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(12): 4846–4851.
- Ehresmann B., Imbault P., Well J.H. (1973) Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal. Biochem.* 54(2): 454–463.
- Elsaesser T., Kaiser W., Luettker W. (1986) Picosecond spectroscopy of intramolecular hydrogen bonds in 4,4',7,7'-tetramethylindigo. *J. Phys. Chem.* 90(13): 2901–2905.
- Etzkorn M. (2008) Protein precipitates, aggregation kinetics and membrane protein receptors characterized by solid-state NMR. Dissertation. Universität Göttingen.
- Flavell R.R., Muir T.W. (2009) Expressed Protein Ligation (EPL) in the Study of Signal Transduction, Ion Conduction, and Chromatin Biology. *Acc. Chem. Res.* 42(1): 107–116.
- Fehrentz T., Schönberger M., Trauner D. (2011): Optochemische Genetik. *Angew. Chem.* 123(51): 12362–12390.
- Friedlaender P. (1916) Über Oxy- und Methoxy-Derivate des Thioindigos. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 49(1): 955–966.
- Gautier A., Nietlispach D. (2012) Solution NMR studies of integral polytopic  $\alpha$ -helical membrane proteins: the structure determination of the seven-helix transmembrane receptor sensory rhodopsin II, pSRII. *Methods Mol. Biol.* 914: 25–45.

- Getahun Z., Huang C.Y., Wang T., León B. de, DeGrado W.F., Gai F. (2003) Using nitrile-derivatized amino acids as infrared probes of local environment. *J. Am. Chem. Soc.* 125(2): 405–411.
- Goody R.S., Alexandrov K., Engelhard M. (2003) Herstellung modifizierter Proteine durch kombinierte Synthese und Biosynthese. *BIOspektrum* 9(1): 42-45.
- Gordeliy V.I., Labahn J., Moukhametzianov R., Efremov R., Granzin J., Schlesinger R., Büldt G., Savopol T., Scheidig A.J., Klare J.P., Engelhard M. (2002) Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II–transducer complex. *Nature* 419(6906): 484–487.
- Goto N.K., Kay L.E. (2000) New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10(5): 585–592.
- Gradmann S., Ader C., Heinrich I., Nand D., Dittmann M., Cukkemane A., Dijk M., Bonvin A.M.J.J., Engelhard M., Baldus M. (2012) Rapid prediction of multi-dimensional NMR data sets. *J. Biomol. NMR* 54(4): 377–387.
- Gradmann S. (2013) A combination of novel solid-state NMR methods and related software to study molecular assemblies and biomolecules. Dissertation. Universität Utrecht.
- Grellmann K.H., Hentzschel P. (1978) Mechanism of the photochemical cis⇌trans isomerization of thioindigo and 6,6'-diethoxy-thioindigo in solution. *Chem. Phys. Lett.* 53(3): 545–551.
- Hackeng T.M., Griffin J.H., Dawson P.E. (1999) Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(18): 10068–10073.
- Haucke G., Paetzold R. (1978) Photophysikalische Chemie indigoider Farbstoffe. Nova Acta Leopoldina, Supplement 11.
- Hazemoto N., Kamo N., Terayama Y., Kobatake Y., Tsuda M. (1983) Photochemistry of two rhodopsinlike pigments in bacteriorhodopsin-free mutant of *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* 44(1): 59–64.
- Heukeshoven J., Dernick R. (1982) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of virus proteins and other large hydrophobic proteins in formic acid containing solvents. *J. Chromatogr.* 252: 241–254.
- Hippler-Mreyen S., Klare J.P., Wegener A.A., Seidel R., Herrmann C., Schmies G., Nagel G., Bamberg E., Engelhard M. (2003) Probing the Sensory Rhodopsin II



- Binding Domain of its Cognate Transducer by Calorimetry and Electrophysiology. *J. Mol. Biol.* 330(5): 1203–1213.
- Hohenfeld I.P., Wegener A.A., Engelhard M. (1999) Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 442(2-3): 198–202.
- Hubbell W.L., Cafiso D.S., Altenbach C. (2000) Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *Nat. Struct. Biol.* 7(9): 735–739.
- Hulko M., Berndt F., Gruber M., Linder J.U., Truffault V., Schultz A., Martin J., Schultz J.E., Lupas A.N., Coles M. (2006) The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling. *Cell* 126(5): 929–940.
- Hunter C.L., Kochendoerfer G.G. (2004) Native Chemical Ligation of Hydrophobic Peptides in Lipid Bilayer Systems. *Bioconjugate Chem.* 15(3): 437–440.
- Irimia-Vladu M., Głowacki E.D., Troshin P.A., Schwabegger G., Leonat L., Susarova D.K., Krystal O., Ullah M., Kanbur Y., Bodea M.A., Razumov V.F., Sitter H., Bauer S., Sariciftci N.S. (2011) Indigo - A Natural Pigment for High Performance Ambipolar Organic Field Effect Transistors and Circuits. *Adv. Mater.* 24(3): 375–380.
- Iwakura I., Yabushita A., Kobayashi T. (2010) Kinetic isotope effect on the proton-transfer in indigo carmine. *Chem. Phys. Lett.* 484(4-6): 354–357.
- Jerabek-Willemsen M., Wienken C.J., Braun D., Baaske P., Duhr S. (2011) Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol.* 9(4): 342–353.
- Johnson E.C.B., Kent S.B.H. (2006a) Insights into the Mechanism and Catalysis of the Native Chemical Ligation Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 128(20): 6640–6646.
- Johnson E.C.B., Kent S.B.H. (2006b) Studies on the Insolubility of a Transmembrane Peptide from Signal Peptide Peptidase. *J. Am. Chem. Soc.* 128(22): 7140–7141.
- Johnson E.C.B., Kent S.B.H. (2007) Towards the total chemical synthesis of integral membrane proteins: a general method for the synthesis of hydrophobic peptide-athioester building blocks. *Tetrahedron Lett.* 48(10): 1795–1799.
- Kallen R.G. (1971) Equilibria for the reaction of cysteine and derivatives with formaldehyde and protons. *J. Am. Chem. Soc.* 93(23): 6227–6235.

- Kates M., Kushwaha S.C., Sprott G.D. (1982) [13] Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria. *Methods in Enzymology* 88: 98–111.
- Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1751(2): 119–139.
- Kent S.B.H. (2009) Total chemical synthesis of proteins. *Chem. Soc. Rev.* 38(2): 338–351.
- Kent S.B.H., Sohma Y., Liu S., Bang D., Pentelute B., Mandal K. (2012) Through the looking glass - a new world of proteins enabled by chemical synthesis. *J. Pept. Sci.* 18(7): 428–436.
- Kessler H., Gehrke M., Lautz J., Köck M., Seebach D., Thaler A. (1990) Complexation and medium effects on the conformation of cyclosporin A studied by NMR spectroscopy and molecular dynamics calculations. *Biochem Pharmacol.* 40(1): 169–73.
- Kim S.H., Wang W., Kim K.K. (2002) Dynamic and clustering model of bacterial chemotaxis receptors: Structural basis for signalling and high sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(18): 11611–11615.
- Kirsch A.D., Wyman G.M. (1977) Excited state chemistry of indigoid dyes. 5. The intermediacy of the triplet state in the direct photoisomerization and the effect of substituents. *J. Phys. Chem.* 81(5): 413–420.
- Klare J.P. (2002) Strukturelle und funktionelle Untersuchungen des photophoben Rezeptor/Transducer-Komplexes aus *Natronobacterium pharaonis*. Dissertation. Universität Dortmund.
- Klare J.P., Engelhard M. (2004) Sensorische Rhodopsine: Modellsystem für transmembrane Signaltransduktion. *BIOspektrum* 10(2): 150–153.
- Klare J.P., Gordeliy V.I., Labahn J., Büldt G., Steinhoff H.J., Engelhard M. (2004) The archaeal sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer. *FEBS Lett.* 564(3): 219–224.
- Klare J.P., Chizhov I., Engelhard M. (2008) Microbial Rhodopsins: Scaffolds for Ion Pumps, Channels und Sensors. In: Schäfer G., Penefsky H., Bioenergetics Results and Problems in Cell Differentiation (45) Bioenergetics: Energy Conservation and Conversion, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Klare J.P., Bordignon E., Engelhard M., Steinhoff H.J. (2011) Transmembrane signal transduction in archaeal phototaxis: the sensory rhodopsin II-transducer

- complex studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Eur. J. Cell Biol.* 90(9): 731–739.
- Klessinger M., Lüttke W. (1963) Theoretische und spektroskopische untersuchungen an indigo-farbstoffen — II: Das chromophore system der Indigo-Farbstoffe. *Tetrahedron* 19(Supplement 2): 315–335.
- Kochendoerfer G.G., Salom D., Lear J.D., Wilk-Orescan R., Kent S.B.H., DeGrado W.F. (1999) Total Chemical Synthesis of the Integral Membrane Protein Influenza A Virus M2: Role of Its C-Terminal Domain in Tetramer Assembly. *Biochemistry* 38(37):11905–11913.
- Koeck M., Kessler H., Seebach D., Thaler A. (1992) Novel backbone conformation of cyclosporin A: the complex with lithium chloride. *J. Am. Chem. Soc.* 114(7): 2676–2686.
- Komarov A.G., Linn K.M., Devereaux J.J., Valiyaveetil F.I. (2009) Modular strategy for the semisynthesis of a K<sup>+</sup> channel: investigating interactions of the pore helix. *ACS Chem. Biol.* 4(12): 1029–1038.
- Konieczny M.T., Konieczny W., Okabe S., Tsujimoto H., Suda Y., Wierzbka K. (2006) Synthesis and Cytostatic Activity of 4,7-Dihydroxythioaurone Derivatives. Effect of B Ring Substitution on the Activity. *Chem. Pharm. Bull.* 54 (3): 350–353.
- Kramer H.E.A. (1990) Wirkungsweise von stabilisatoren in polymeren unter berücksichtigung der 2-hydroxyphenylbenzotriazole. *Angew. Makromol. Chemie* 183(1): 67–101.
- Kumar A.K.S., Bavikar S.N., Spasser L., Moyal T., Ohayon S., Brik A. (2011) Total Chemical Synthesis of a 304 Amino Acid K48-Linked Tetraubiquitin Protein. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50(27): 6137–6141.
- Lahiri S., Brehs M., Olschewski D., Becker C.F.W. (2011) Total Chemical Synthesis of an Integral Membrane Enzyme: Diacylglycerol Kinase from *Escherichia coli*. *Angew. Chem.* 123(17): 4074–4078.
- Li L. (2013) Signaltransfer des SRII/HtrII Komplexes und strukturelle und funktionelle Untersuchung der HAMP Domäne aus *Natronomonas pharaonis*. Dissertation. Technische Universität Dortmund.
- Linn K.M., Derebe M.G., Jiang Y., Valiyaveetil F. I. (2010) Semisynthesis of NaK, a Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> conducting ion channel. *Biochemistry* 49(21): 4450–4456.
- Lottspeich F., Zorbas H. (1998) Bioanalytik. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Luca S., Heise H., Baldus M. (2003) High-resolution solid-state NMR applied to polypeptides and membrane proteins. *Acc. Chem. Res.* 36(11): 858–865.
- Lüttke W., Hermann H., Klessinger M. (1966) Theoretically and Experimentally Determined Properties of the Fundamental Indigo Chromophore. *Angew. Chem. Int. Ed.* 5(6): 598–599.
- Madelung W., Wilhelmi O. (1924) Über Imide, Anile und Hydrazone des Indigblaus und die stereochemische Konfiguration der Indigoide. *Ber. dtsh. Chem. Ges. A/B* 57(2): 234–241.
- Mannila J., Järvinen K., Holappa J., Matilainen L., Auriola S., Jarho P. (2009) Cyclodextrins and chitosan derivatives in sublingual delivery of low solubility peptides: A study using cyclosporin A,  $\alpha$ -cyclodextrin and quaternary chitosan N-betainate *Int. J. Pharm.* 381(1): 19–24.
- Martell S. (2008) Untersuchung der Struktur und Funktion von Sieben-Helix-Membranrezeptoren. Dissertation. Technische Universität Dortmund.
- McGarry P.F., Jockusch S., Fujiwara Y., Kaprinidis N.A., Turro N.J. (1997) DMSO Solvent Induced Photochemistry in Highly Photostable Compounds. The Role of Intermolecular Hydrogen Bonding. *J. Phys. Chem. A* 101(5): 764–767.
- McIntosh L.P., Dahlquist F.W. (1990) Biosynthetic incorporation of  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  for assignment and interpretation of nuclear magnetic resonance spectra of proteins. *Q. Rev. Biophys.* 23(1): 1–38.
- Merrifield R.B. (1985) Festphasen-Synthese (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* 97(10): 801–812.
- Moukhametzianov R., Klare J.P., Efremov R., Baeken C., Göppner A., Labahn J., Engelhard M., Büldt G., Gordeliy V.I. (2006) Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer. *Nature* 440(7080): 115–119.
- Mreyen S. (2003) Funktionelle Untersuchungen zur Wechselwirkung des archaebakteriellen Photorezeptors NpSR<sub>II</sub> mit seinem Transducer NpHtr<sub>II</sub> durch heterologe Expression in E.coli. Dissertation. Universität Dortmund.
- Mukherjee C., De A. (2002) Application of Directed Metallation in Synthesis, Part 2: An Expedient Synthesis of Methoxybenzo[b]thiophenes. *Synlett* 2002(02): 325–327.
- Mukherjee C., Kamila S., De A. (2003) Application of directed metalation in synthesis. Part 4: Expedient synthesis of substituted benzo[b]thiophene and naphthothiophene. *Tetrahedron* 59(26): 4767–4774.

- Muralidharan V., Muir T.W. (2006) Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins. *Nat. Methods* 3(6): 429–438.
- Noren C.J., Wang J., Perler F.B. (2000) Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and Its Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39(3): 450–466.
- Olschewski D., Becker C.F.W. (2008) Chemical synthesis and semisynthesis of membrane proteins. *Mol. BioSyst.* 4(7): 733–740.
- Otaka A., Ueda S., Tomita K., Yano Y., Tamamura H., Matsuzaki K., Fujii N. (2004) Facile synthesis of membrane-embedded peptides utilizing lipid bilayer-assisted chemical ligation. *Chem. Commun.* (15): 1722–1773.
- Palczewski K. (2006) G Protein–Coupled Receptor Rhodopsin. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 743–767.
- Rao K.G., Becker E.D., Rao C.N.R. (1977) Effect of lithium ion on the torsional barrier in amides. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (10): 350–351.
- Reisdorf S. (2009) FTIR-spektroskopische Untersuchung der Interaktionen zwischen dem Photorezeptor Sensory Rhodopsin II aus *Natronobacterium pharaonis* und seinem Transducer. Dissertation. Universität Freiburg.
- Reitz S., Cebi M., Reiss P., Studnik G., Linne U., Koert U., Essen L.O. (2009) On the function and structure of synthetically modified porins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48(26): 4853–4857.
- Regner N., Herzog T.T., Haiser K., Hoppmann C., Beyermann M., Sauermann J., Engelhard M., Cordes T., Rück-Braun K., Zinth W. (2012) Light-switchable hemithioindigo-hemistilbene-containing peptides: ultrafast spectroscopy of the Z → E isomerization of the chromophore and the structural dynamics of the peptide moiety. *J. Phys. Chem. B* 116(14): 4181–4191.
- Renault M., Cukkemane A., Baldus M. (2010) Solid-state NMR spectroscopy on complex biomolecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49(45): 8346–8357.
- Robey F.A. (2000) Selective and facile cyclization of N-chloroacetylated peptides from the C4 domain of HIV Gp120 in LiCl/DMF solvent systems. *J. Pept. Res.* 56(3): 115–120.
- Rudolph J., Nordmann B., Storch K.F., Gruenberg H., Rodewald K., Oesterhelt D. (1996) A family of halobacterial transducer proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 139(2-3): 161–168.

- Rzymann J. (2011) Struktur der zwei HAMP Domänen von NpHtrII. Masterarbeit. Technische Universität Dortmund.
- Sadek M. (2011) Synthese von hydrophoben Peptiden. Masterarbeit. Technische Universität Dortmund.
- Sagné C., Isambert M.F., Henry J.P., Gasnier B. (1996) SDS-resistant aggregation of membrane proteins: application to the purification of the vesicular monoamine transporter. *Biochem. J.* 316(Pt 3): 825–831.
- Sarin V.K., Kent S.B., Tam J.P., Merrifield R.B. (1981) Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal. Biochem.* 117(1): 147–157.
- Sato T., Saito Y., Aimoto S. (2005) Synthesis of the C-terminal region of opioid receptor like 1 in an SDS micelle by the native chemical ligation: effect of thiol additive and SDS concentration on ligation efficiency. *J. Peptide Sci.* 11(7): 410–416.
- Schäfer G., Engelhard M., Müller V. (1999) Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(3): 570–620.
- Schägger H., Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166(2): 368–379.
- Schägger H., Jagow G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199(2): 223–231.
- Schiffer E. (2005) Domain specific isotope labelling of membrane proteins – NMR and FTIR spectroscopy of SRII/HtrII complexes from *Natronobacterium pharaonis*. Dissertation. Universität Dortmund.
- Schmidt H. (1997) Indigo - 100 Jahre industrielle Synthese. *Chemie in unserer Zeit* 31(3): 121–128.
- Schnölzer M., Alewood P., Jones A., Alewood D., Kent S.B. (1992) In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.* 40(3-4): 180–193.
- Scopes R.K. (1974) Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal Biochem.* 59(1): 277–282.
- Seddon A.M., Curnow P., Booth P.J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta.* 1666(1-2): 105–17.

- Seebach D., Thaler A., Beck A.K. (1989) Solubilization of Peptides in Non-polar Organic Solvents by the Addition of Inorganic Salts: Facts and Implications. *Helv. Chim. Acta* 72(5): 857–867.
- Seidel R., Scharf B., Gautel M., Kleine K., Oesterhelt D., Engelhard M. (1995) The primary structure of sensory rhodopsin II: a member of an additional retinal protein subgroup is coexpressed with its transducer, the halobacterial transducer of rhodopsin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(7): 3036–40.
- Seidel S.A., Dijkman P.M., Lea W.A., van den Bogaart G., Jerabek-Willemsen M., Lazic A., Joseph J.S., Srinivasan P., Baaske P., Simeonov A., Katritch I., Melo F.A., Ladbury J.E., Schreiber G., Watts A., Braun D., Duhr S. (2013) Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods* 59(3): 301–315.
- Severinov K., Muir T.W. (1998) Expressed protein ligation, a novel method for studying protein-protein interactions in transcription. *J. Biol. Chem.* 273(26): 16205–16209.
- Shen F., Huang Y.C., Tang S., Chen Y.X., Liu L. (2011) Chemical Synthesis of Integral Membrane Proteins: Methods and Applications. *Isr. J. Chem.* 51(8-9): 940–952.
- Shroff R., Muck A., Svatoš A. (2007) Analysis of low molecular weight acids by negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21(20): 3295–3300.
- Spudich J.L., Bogomolni R.A. (1984) Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature* 312(5994): 509–513.
- Spudich J.L., Bogomolni R.A. (1988) Sensory Rhodopsins of Halobacteria. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17(1): 193–215.
- Steingruber E. (2004) Indigo and Indigo Colorants. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim.
- Steinhoff H.J. (2002) Methods for study of protein dynamics and protein-protein interaction in protein-ubiquitination by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Front. Biosci.* 7: C97-C110.
- Steinhoff H.J. (2004) Inter- and intra-molecular distances determined by EPR spectroscopy and site-directed spin labeling reveal protein-protein and protein-oligonucleotide interaction. *Biol. Chem.* 385(10): 913–920.
- Steinle W., Rück-Braun K. (2003) Synthesis and characterization of novel bifunctional hemithioindigo chromophores. *Org. Lett.* 5(2): 141–144.

- Szymański W., Beierle J.M., Kistemaker H.A.V., Velema W.A., Feringa B.L. (2013) Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. *Chem. Rev.* 113(8): 6114–6178.
- Taichi M., Kimura T., Nishiuchi Y. (2009) Suppression of Side Reactions During Final Deprotection Employing a Strong Acid in Boc Chemistry: Regeneration of Methionyl Residues from Their Sulfonium Salts. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 15(4): 247–253.
- Takahashi T., Tomioka H., Kamo N., Kobatake Y. (1985) A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium*. *FEMS Microbiology Letters* 28(2): 161–164.
- Thaler A.P. (1991) Lithium-Salzeffekte in der Peptidchemie. Dissertation. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.
- Torbeev V.Y., Kent S.B.H. (2007) Convergent Chemical Synthesis and Crystal Structure of a 203 Amino Acid “Covalent Dimer” HIV-1 Protease Enzyme Molecule. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46(10): 1667–1670.
- Valiyaveetil F.I., MacKinnon R., Muir T.W. (2002) Semisynthesis and Folding of the Potassium Channel KcsA. *J. Am. Chem. Soc.* 124(31): 9113–9120.
- Valiyaveetil F.I., Sekedat M., Mackinnon R., Muir T.W. (2004) Glycine as a D-amino acid surrogate in the K(+)-selectivity filter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(49): 17045–17049.
- Valiyaveetil F.I., Leonetti M., Muir T.W., Mackinnon R. (2006a) Ion selectivity in a semisynthetic K<sup>+</sup> channel locked in the conductive conformation. *Science* 314(5801): 1004–1007.
- Valiyaveetil F.I., Sekedat M., Mackinnon R., Muir T.W. (2006b) Structural and functional consequences of an amide-to-ester substitution in the selectivity filter of a potassium channel. *J. Am. Chem. Soc.* 128(35): 11591–11599.
- Vogel R., Siebert F. (2000) Vibrational spectroscopy as a tool for probing protein function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4(5): 518–523.
- Vogel R., Siebert F. (2003) Fourier transform IR spectroscopy study for new insights into molecular properties and activation mechanisms of visual pigment rhodopsin. *Biopolymers* 72(3): 133–148.
- Wallin E., von Heijne G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7(4): 1029–1038.



- Wang X., de Silva S.O., Reed J.N., Billadeau R., Griffen E.J., Chan A., Snieckus V. (1995) 7-Methoxyphthalide. *Organic Syntheses* 72: 163.
- Wang J., Sasaki J., Tsai A.I., Spudich J.L. (2012) HAMP Domain Signal Relay Mechanism in a Sensory Rhodopsin-Transducer Complex. *J. Biol. Chem.* 287(25): 21316–21325.
- Wegener A.A., Klare J.P., Engelhard M., Steinhoff H.J. (2001) Structural insights into the early steps of receptor-transducer signal transfer in archaeal phototaxis. *EMBO J.* 20(19): 5312–5319.
- Welsch N.: Indigo. RÖMPP Online, zuletzt geprüft im März 2006, abgerufen am: 13.08.2013.
- Wessel D., Flügge U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138(1): 141–143.
- Whitelegge J.P. (2004) HPLC and mass spectrometry of intrinsic membrane proteins. *Methods Mol. Biol.* 251: 323–340.
- Wieland T., Bokelmann E., Bauer L., Lang H.U., Lau H. (1953) Über Peptidsynthesen. 8. Mitteilung Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 583(1): 129–149.
- Wintermann F., Engelbrecht S. (2013) Rekonstitution des katalytischen ( $\alpha\beta$ )  $3\gamma$ -Kernkomplexes der F-ATPase aus *Escherichia coli* mithilfe der chemisch synthetisierten Untereinheit  $\gamma$ . *Angew. Chem.* 125(4): 1347–1351.
- Williams G.J., Hunter N.R. (1976) Site-selective  $\alpha'$ -acetoxylation of some  $\alpha,\beta$ -enones by manganic acetate oxidation. *Can. J. Chem.* 54(24): 3830–3832.
- Wittig I., Braun H.P., Schägger H. (2006) Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1(1): 418–428.
- Wyman G.M., Brode W.R. (1951) The Relation between the Absorption Spectra and the Chemical Constitution of Dyes XXII. cis-trans Isomerism in Thioindigo Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* 73(4): 1487–1493.
- Wyman G.M. (1971) The interaction of excited thioindigo with hydroxylic compounds and its implications on the photostability of indigo. *J. Chem. Soc. D* (21): 1332–1334.
- Xu M.Q., Southworth M.W., Mersha F.B., Hornstra L.J., Perler F.B. (1993) In vitro protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate. *Cell* 75(7): 1371–1377.

Yamazaki S., Sobolewski A.L., Domcke W. (2011) Molecular mechanisms of the photostability of indigo. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13(4): 1618–28.

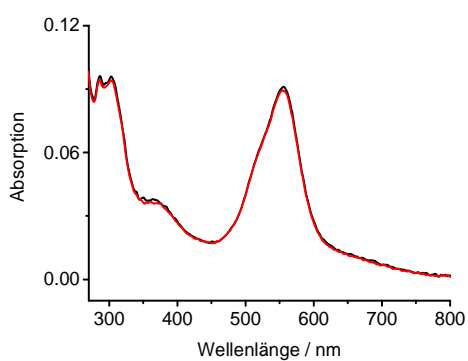
Ye S., Huber T., Vogel R., Sakmar T.P. (2009) FTIR analysis of GPCR activation using azido probes. *Nat. Chem. Biol.* 5(6): 397–399.

## Anhang

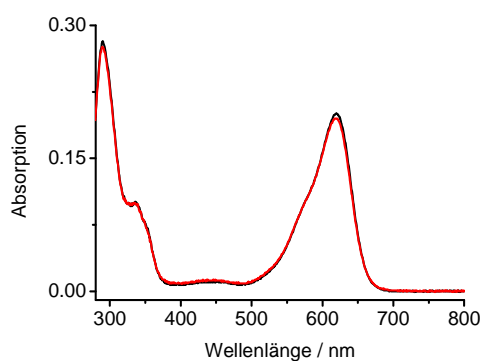
### A.1 UV-VIS-Spektren zur Untersuchung einer Photoisomerisierung

UV-VIS-Spektren von Thioindigoderivaten vor (schwarze Kurve) und nach (rote Kurve) zweistündiger Bestrahlung mittels einer Lampe mit Gelbfilter (Konzentration ~ 0.1 mM; Weglänge 0.1 cm).

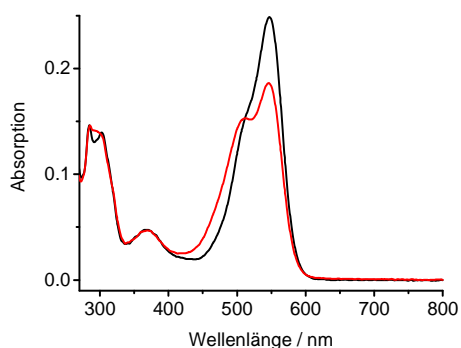
#### 4,4'-Dihydroxythioindigo in DMSO – Photoisomerisierung



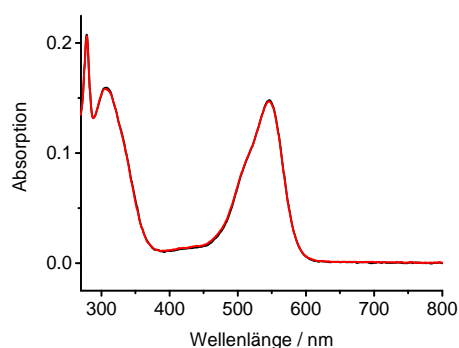
#### Indigo in DMSO – Photoisomerisierung



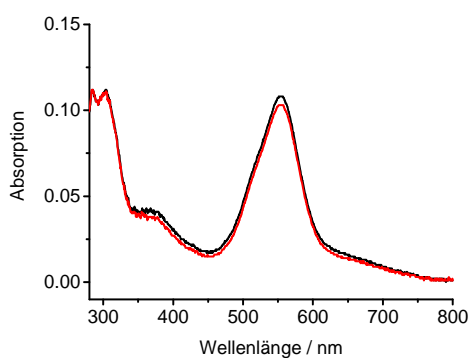
#### 4,4'-Dimethoxythioindigo in DMSO + Photoisomerisierung



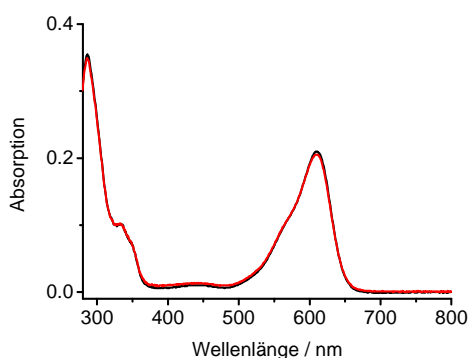
#### Thioindigo in DMSO – Photoisomerisierung



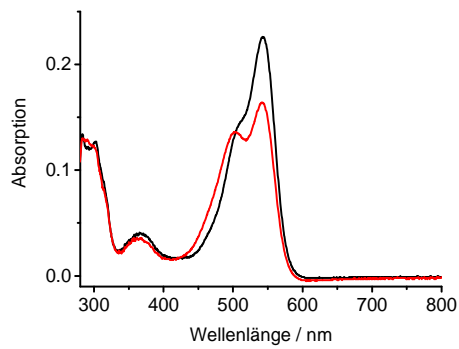
#### 4,4'-Dihydroxythioindigo in DMF – Photoisomerisierung



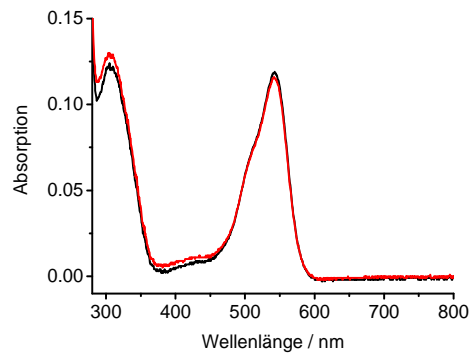
#### Indigo in DMF – Photoisomerisierung



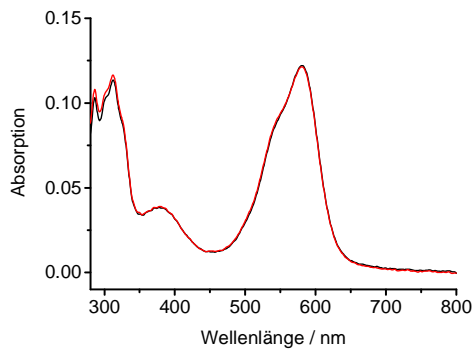
4,4'-Dimethoxythioindigo in DMF  
+ Photoisomerisierung



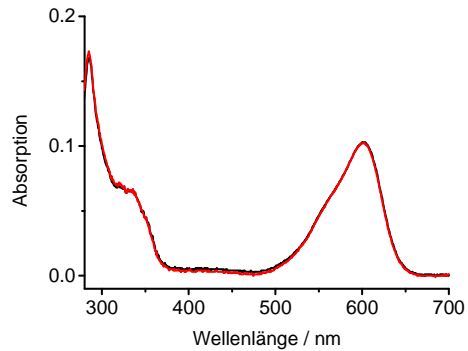
Thioindigo in DMF  
– Photoisomerisierung



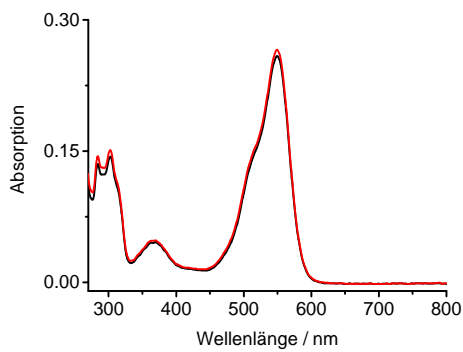
4,4'-Dihydroxythioindigo in CHCl<sub>3</sub>  
– Photoisomerisierung



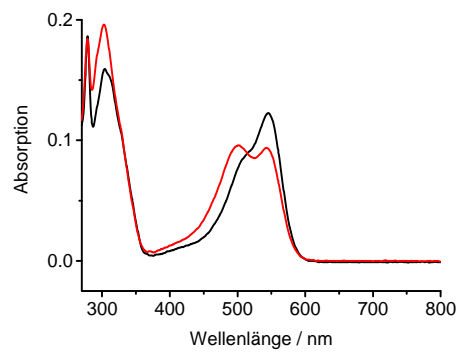
Indigo in CHCl<sub>3</sub>  
– Photoisomerisierung



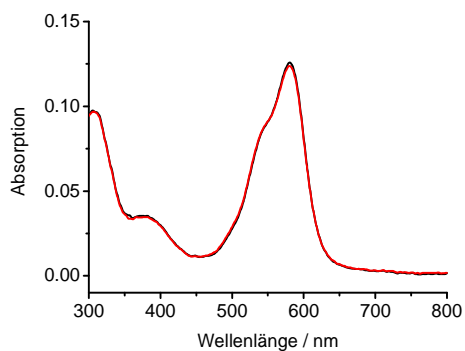
4,4'-Dimethoxythioindigo in CHCl<sub>3</sub>  
– Photoisomerisierung



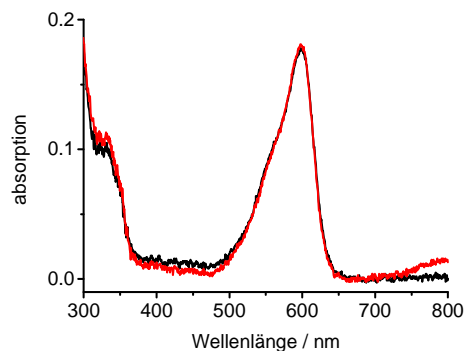
Thioindigo in CHCl<sub>3</sub>  
+ Photoisomerisierung



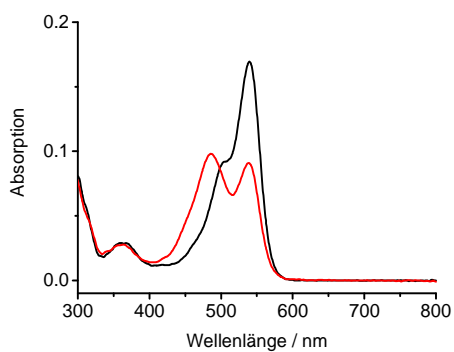
4,4'-Dihydroxythioindigo in Benzol  
– Photoisomerisierung



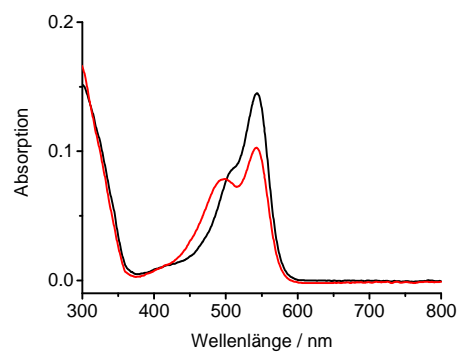
Indigo in Benzol  
– Photoisomerisierung



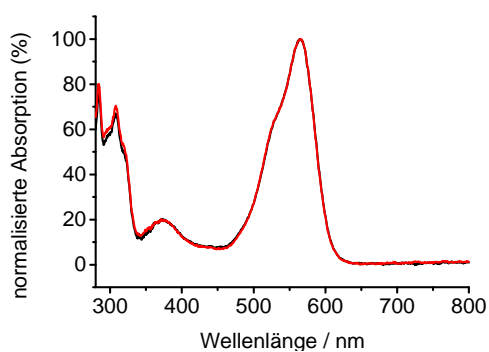
4,4'-Dimethoxythioindigo in Benzol  
– Photoisomerisierung



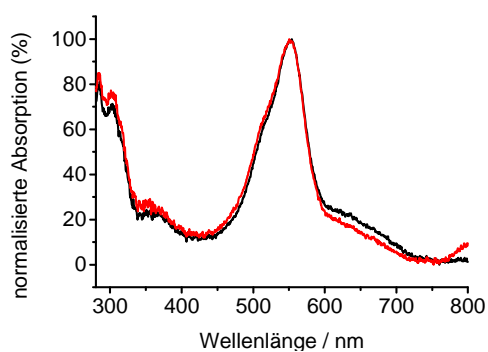
Thioindigo in Benzol  
+ Photoisomerisierung



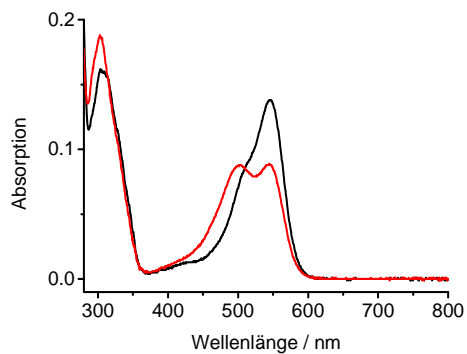
4-Methoxy-4'-hydroxythioindigo in CHCl<sub>3</sub> (-)  
– Photoisomerisierung



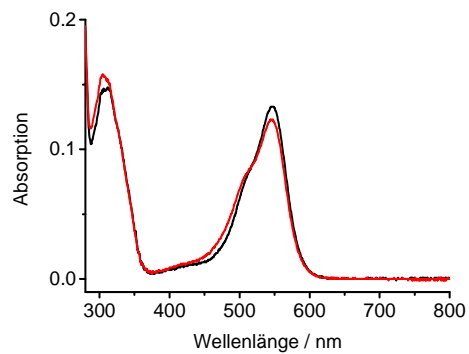
4-Methoxy-4'-hydroxythioindigo in DMSO (-)  
– Photoisomerisierung



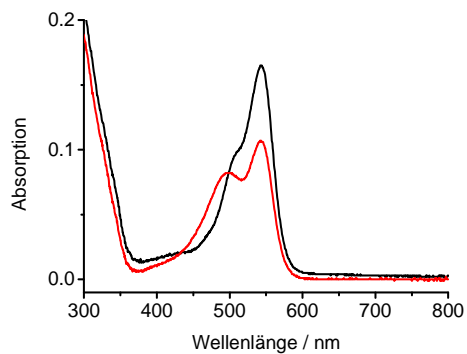
Thioindigo in Chloroform  
100 Äq. Essigsäure  
+ Photoisomerisierung



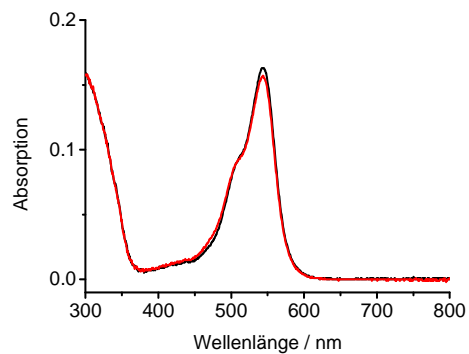
Thioindigo in Chloroform  
100 Äq. Trifluoressigsäure  
- Photoisomerisierung



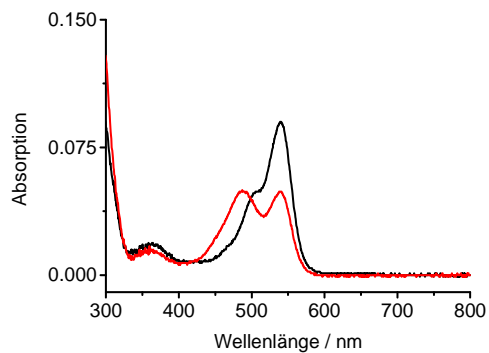
Thioindigo in Benzol  
100 Äq. Essigsäure  
+ Photoisomerisierung



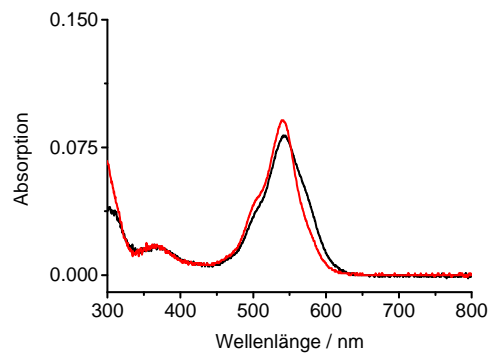
Thioindigo in Benzol  
100 Äq. Trifluoressigsäure  
- Photoisomerisierung



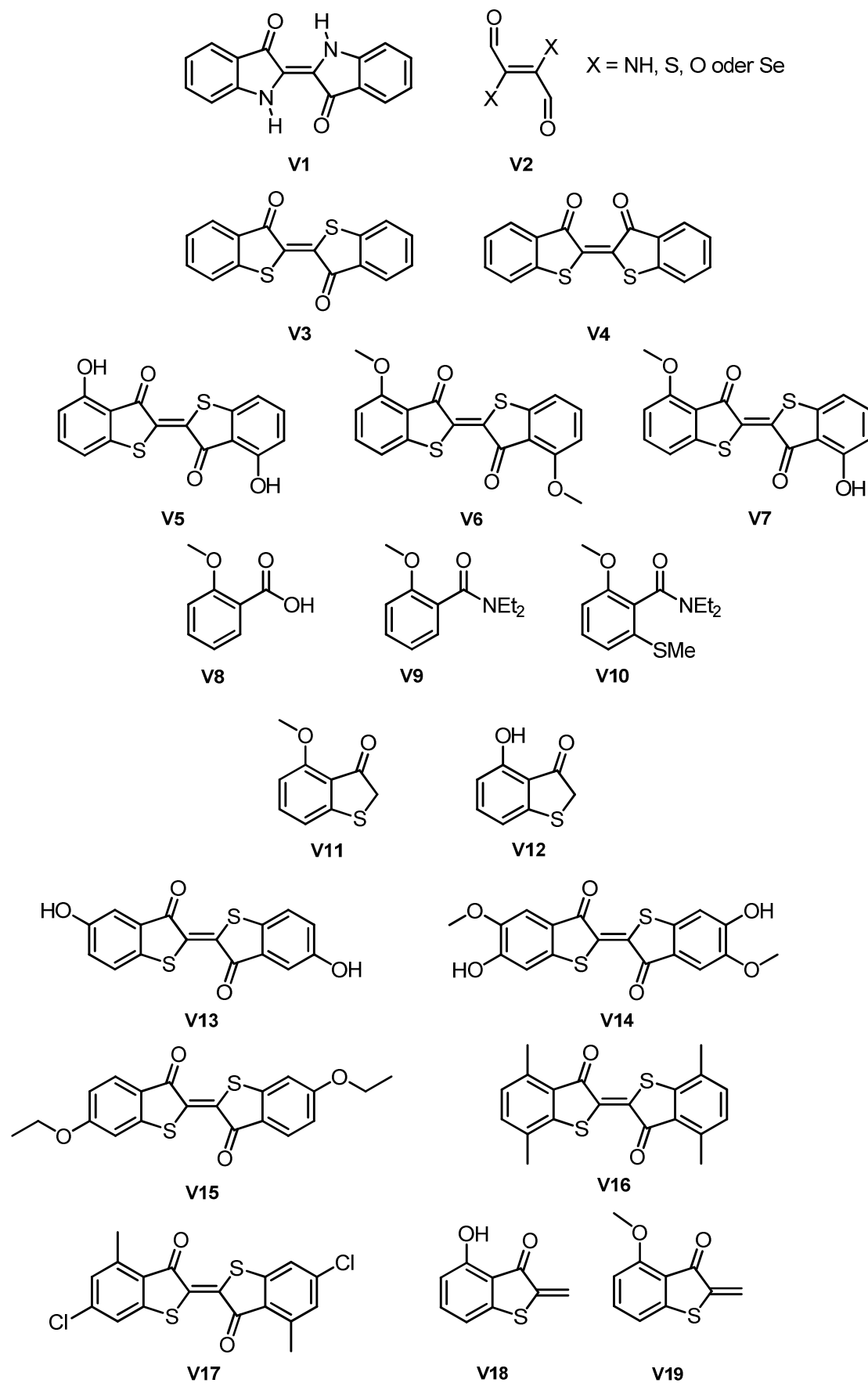
4,4'-Dimethoxythioindigo in Benzol  
100 Äq. Essigsäure  
Isomerisierung



4,4'-Dimethoxythioindigo in Benzol  
100 Äq. Trifluoressigsäure  
keine Isomerisierung



## A.2 Verzeichnis der Verbindungen in Kapitel 3.1



## A.3 Peptid- und Protein-Sequenzen

*S* bezeichnet den Thioester -SCH<sub>2</sub>CO-; *SMPAA*, *SPh*, *SMESNA* bezeichnen 4-Mercaptophenyl-essigsäure, Thiophenol und Natrium-2-sulfanylethansulfonat, welche über das Schwefelatom an die  $\alpha$ -Carboxygruppen der C-terminalen Aminosäuren gebunden sind.

Bezeichnung	Sequenz	M <sub>w</sub> / g·mol <sup>-1</sup>	Peptid- nummer
<i>NpHtrII</i> 55-59- <i>SLeu</i>	AVQEA-SL	703.8	P1
<i>NpHtrII</i> 60C-65	CVSAIL	604.7	P2
<i>NpHtrII</i> 55-59-60C-65	AVQEACVSAIL	1103.3	P3
<i>NpHtrII</i> 55-59- <i>SMPAA</i>	AVQEA- <i>SMPAA</i>	666.7	P4
<i>NpHtrII</i> 55-59- <i>SPh</i>	AVQEA- <i>SPh</i>	608.7	P5
<i>NpHtrII</i> 60-65	KVSAIL	629.8	P6
<i>NpHtrII</i> 60-65	AVSAIL	572.7	P7
<i>NpHtrII</i> 55-60K-65	AVQEAKVSAIL	1128.3	P8
<i>NpHtrII</i> 55-60A-65	AVQEAAVSAIL	1071.2	P9
<i>NpHtrII</i> 55-59- <i>SLeu</i>	AVQEa-SL	703.8	P10
	A-SL	276.4	P11
	CV	220.3	P12
	ACV	291.4	P13
	aCV	291.4	P14
<i>NpHtrII</i> 55-59-60C-65	AVQEaCVSAIL	1103.3	P15
<i>NpHtrII</i> 1-46- <i>SArg</i> <sub>6</sub>	MSLNVSRLLLPSRVRHSYTGKMGAVFIFVGAL TVLFGAIAYGEVTA-SRRRRRR	5926.0	P16
<i>NpHtrII</i> 47Thz-59- <i>SLeu</i>	ThzAATGDAAAVQEA-SL	1376.4	P17
<i>NpHtrII</i> 60C-114- <i>His</i> <sub>6</sub>	CVSAILGLIILLGINLGLVAATLGGDTAASLST LAAKASRMGDGDL DVELETRREHHHHHH	6349.2	P18
<i>NpHtrII</i> 47C-114- <i>His</i> <sub>6</sub>	CAATGDAAAVQEACVSAILGLIILLGINLGLV AATLGGDTAASLSTLAAKASRMGDGDL DVE LETRREHHHHHHH	7508.4	P19
Synthetisches	MSLNVSRLLLPSRVRHSYTGKMGAVFIFVGAL TVLFGAIAYGEVTACAATGDAAAVQEACVS	12405.3	P20



<i>Np</i> HtrII 1-114	AILGLIILLGINLGLVAATLGGDTAASLSTLAA KASRMGDGDL DVELETRREHHHHHHH		
Rekombinantes <i>Np</i> HtrII 1-114	SLNVSLLLLPSRVRHSYTGKMGAVFIFVGALT VLFGAIA YGEVTAAAATGDAAAVQEAAVSAI LGLIILLGINLGLVAATLGGDTAASLSTLAAK ASRMGDGDL DVELETRRENSHHHHHHH	12548.3	P21
<i>Np</i> SRII	MVGLTTLFWLGAIGMLVGTLAFAWAGR DAG SGERRYVVTLVGISGIAAVAYVVMALGVGVV PVAERTVFAPRYIDWILTTPLIVYFLGLLAGLD SREFGIVITLNTVVMLAGFAGAMVPGIER YAL FGMGAVAFGLVYYLVGPMTESASQRSSGIKS LYVRLRNLT VILWAIYPIWLLGPPGVALLTPT VDVALIVYLDLVTKVGF GFIALDAAATLRAE HGESLAGVD TDAPAVADENSHHHHHHHH	26645.2 26911.6*	P22
<i>Np</i> HtrII 1-94-MXE-His	SLNVSLLLLPSRVRHSYTGKMGAVFIFVGALT VLFGAIA YGEVTAAAATGDAAAVQEAAVSAI LGLIILLGINLGLVAATLGGDTAASLSTLACIT GDALVALPEGESVRIADIVPGARPNSDNAIDL KVLDRHGPNV LADRLFHSGEHPVYTVRTVEG LRVTGTANHPLLCLVDVAGVPTLLWKLIDEI KPGDYAVIQRS AFSVDCAGFARGKPEFAPTTY TVGVPLVRFLEA HHRDPDAQIADELTDGR FYYAKVASVTDAGVQPVYSLRVDTADHAFIT NGFVSHATGLTGIHHHHHHHHH	31911.3	P23
<i>Np</i> HtrII 1-94-SMESNA	SLNVSLLLLPSRVRHSYTGKMGAVFIFVGALT VLFGAIA YGEVTAAAATGDAAAVQEAAVSAI LGLIILLGINLGLVAATLGGDTAASLSTLA- SMESNA		P24
GST-TEV- <i>Np</i> HtrII 95C-157	MSPILGYWKIKGLVQPTRL LLEYLEEKYEEHL YERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDV KLTQSMAIIRYIADKH NMLGGCPKERA EISML EGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPE MLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYD ALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIE AIPQI DKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKS DLVPRGSENL YFQCKASRMGDGDL DVELETR REDEIGDLYAAFDEMRQSVRTSLEDAKNARE DAEQAQKRAEEINT	34265.1	P25
<i>Np</i> HtrII 95C-157 [ <sup>12</sup> C, <sup>14</sup> N]	CKASRMGDGDL DVELETRREDEIGDLYAAFD EMRQSVRTSLEDAKNAREDAEQAQKRAEEIN T	7177.7	P26a
<i>Np</i> HtrII 95C-157 [ <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N]	CKASRMGDGDL DVELETRREDEIGDLYAAFD EMRQSVRTSLEDAKNAREDAEQAQKRAEEIN T	7156.5 7159.0**	26b

Semisynthetisches <i>NpHtrII</i> 1-157; Reste 95C-157: [ <sup>12</sup> C, <sup>14</sup> N]	SLNVSRLLLPSRVRHSYTGKMGAVFIFVGALT VLFGAIAYGEVTA AAAATGDAAA VQEAAVSAI LGLIILLGINLGLVAATLGGDTAASLSTLACK ASRMGDGDL DVELETRREDEIGDLYAAFDEM RQSVRTSLEDAKNA REDAEQAQKRAEEINT	16316.4	P27a
Semisynthetisches <i>NpHtrII</i> 1-157; Reste 95C-157: [ <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N]	SLNVSRLLLPSRVRHSYTGKMGAVFIFVGALT VLFGAIAYGEVTA AAAATGDAAA VQEAAVSAI LGLIILLGINLGLVAATLGGDTAASLSTLACK ASRMGDGDL DVELETRREDEIGDLYAAFDEM RQSVRTSLEDAKNAREDAEQAQKRAEEINT	16696.1	P27b
Rekombinantes <i>NpHtrII</i> 1-157	AVSRLLLPSRVRHSYTGKMGAVFIFVGALTVL FGAIAYGEVTA AAAATGDAAA VQEAAVSAI LILLGINLGLVAATLGGDTAASLSTLA AKASR MGDGDLDVELETRREDEIGDLYAAFDEM RQS VRTSLEDAKNAREDAEQAQKRAEEINTNSH HHHHHH	17202.3	P28
MXE-His	CITGDALVALPEGESVRIADIVPGARPNSDNA IDLKVLDRHGPNPVLADRLFHSGEHPVYTVRT VEGLRVGTANHP LLLCLVDVAGVPTLLWKLI DEIKPGDYAVIQSAFSVDCAGFARGKPEFAP TTYTVGVPGLVRFLEAHRDPDAQAIAD E L T DGRFYAKVASVTDAGVQPVYSLRVDTADH AFITNGFVSHATGLTGIHHHHHHH	22772.6	P29
<i>NpHtrII</i> 47Thz-59-65	ThzAATGDAAA VQEACVSAIL	1776.0	P30
<i>NpHtrII</i> 55-59-95C-157	AVQEACKASRMGDGDL DVELETRREDEIGDL YAAFDEM RQSVRTSLEDAKNAREDAEQAQK RAEEINT	7676.3	P31
<i>NpHtrII</i> 47Thz-59-95C- 157	ThzAATGDAAA VQEACKASRMGDGDL DVEL ETRREDEIGDLYAAFDEM RQSVRTSLEDAKN AREDAEQAQKRAEEINT	8349.0	P32
<i>NpHtrII</i> 55-59-60C-114- His <sub>6</sub>	AVQEACVSAILGLIILLGINLGLVAATLGGDT AASLSTLA AKASRMGDGDL DVELETRREHH HHHH	6848.2	P33
<i>NpHtrII</i> 47Thz-59-60C- 114-His <sub>6</sub>	ThzAATGDAAA VQEACVSAILGLIILLGINLGL VAATLGGDTAASLSTLA AKASRMGDGDL DV ELETRREHHHHHHH	7520.5	P34
<i>NpHtrII</i> 1-46-60C-65	MSLNVSRLLLPSRVRHSYTGKMGAVFIFVGAL TVLFGAIAYGEVTA CVSAIL	5501.6	P35
<i>NpHtrII</i> 47Thz-59- <i>SPh</i>	ThzAATGDAAA VQEA- <i>SPh</i>	1178.3	P36

\*Molekulare Masse mit Retinal-Chromophor

\*\*Molekulare Masse bei 100%iger Labelleffizienz

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die es mir durch ihre Hilfe und Unterstützung ermöglicht haben, diese Arbeit zu erstellen.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Martin Engelhard für die hochinteressante Themenstellung, die intensive Betreuung und für sein großes persönliches Engagement.

Bei Prof. Dr. Roger S. Goody bedanke ich mich für die Aufnahme in seine Abteilung.

Ich danke Prof. Dr. Daniel Rauh für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Prof. Dr. Marc Baldus und Dr. Sabine Gradmann möchte ich für die Zusammenarbeit im Projekt zur Semisynthese und Isotopenmarkierung des *Np*Htr II 1-157 danken.

Ich danke Prof. Dr. Wolfgang Zinth, Franziska Graupner und Benjamin Maerz für die Zusammenarbeit im Projekt zur Synthese und Charakterisierung des 4,4'-Dihydroxythioindigos, ebenso wie Prof. Dr. Regina de Vivie-Riedle und Sven Oesterling.

Ich möchte mich bei Dr. Igor Chizhov für die Photozyklus-Messungen bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. Ralf Seidel und Dr. Frank Hofmann für steten Rat, Hilfe und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke den von mir betreuten Masterstudenten Jakob Rzymann und Muheeb Sadek für die gute Zusammenarbeit. Jakob Rzymann arbeitete mit an dem Projekt zur Semisynthese des *Np*HtrII 1-157; Muheeb Sadek an dem Projekt zur Nativen Chemische Ligation in Dimethylformamid.

Ich möchte mich bei Dr. Petra Janning, Andreas Brockmeyer und Chantale Martin für die Unterstützung bei Fragen zur Massenspektrometrie und für die Durchführung der HPLC-MS-Analysen bedanken.

Bei Chantale Martin möchte ich mich darüber hinaus für die Hilfe bei den MALDI- und FTIR-Messungen bedanken.

Sascha Genz danke ich für die Hilfe bei peptidchemischen Arbeiten.

Ich möchte mich bei Anke Reulen und Karin Vogel-Bachmayr für die Expression und Aufreinigung von Transducer-Fragmenten bedanken.

Ich danke Martina Wischnewski für die Unterstützung bei HPLC-Aufreinigungen.

Dr. Anne Kuhlee danke ich für die Hilfe bei den Thermophorese-Messungen und für die Unterstützung bei der Durchführung der BN-PAGE.

Ich danke Arne Bothe für die Expression und Aufreinigung des SRIIs.

Markus Hüffner danke ich für die Durchführung der Elementar-Analysen.

Ich möchte mich weiter bei allen Mitarbeitern der Abteilung 3 für die freundliche Aufnahme, für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders bei: Arne Bothe, Dr. Andrea Braunshausen, Sascha Gentz, Ines Heinrich, Dr. Frank Hofmann, Nina Ludwigs, Dr. Ralf Seidel, Sarah Ulbrich, Karin Vogel-Bachmayr, Dr. David Wiegandt und Martina Wischnewski.

Ich danke der Studienstiftung des deutschen Volkes und der International Max Planck Research School in Chemical Biology für die finanzielle und ideelle Förderung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich in allen Lebenslagen unterstützt hat.

Mein liebster Dank gilt meiner Lebensgefährtin Gabi Bruckschen für ihre Geduld, Unterstützung und Motivation. Ohne sie wäre nichts so schön wie es ist.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Marc Dittmann  
Anschrift: Landfermannstraße 11  
47051 Duisburg  
  
Geburtsdatum: 06.03.1983  
Geburtsort: Duisburg

### Hochschulausbildung

2003-2006 Chemische Biologie an der Universität  
Dortmund; Abschluss: Bachelor of Science  
  
2006-2008 Chemische Biologie an der Technischen  
Universität Dortmund; Abschluss: Master of Science  
  
Seit 2009 Promotion am Max-Planck-Institut für  
molekulare Physiologie in Dortmund; Betreuung durch  
Herrn Prof. Dr. Martin Engelhard

### Schulbildung

1989-1993 Grundschule Lüderitzallee in Duisburg  
1993-2002 Steinbart-Gymnasium Duisburg;  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Besonderheiten

2002-2003 Wehrdienst im 7. und 3. Sanitätsregiment 22

---

Ort, Datum

---

Unterschrift (Marc Dittmann)