

# 1. Einleitung und Zielsetzung

Proteine stellen einen essentiellen Bestandteil der lebenden Organismen dar und erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben. Sie sind für die Form und die Stabilität von Zellen und Gewebe verantwortlich, können mechanische und elektrochemische Kräfte erzeugen oder dienen als Speicherproteine. Darüber hinaus wirken sie als Signalstoffe und Hormonrezeptoren in biochemischen Signalketten. Zu ihren Aufgaben zählen insbesondere die Katalyse des zellulären Metabolismus, der Transport diverser Stoffe und der Schutz des Organismus vor Krankheitserregern und körperfremden Substanzen.<sup>[1]</sup>

Etwa dreißig Prozent der im Genom einer tierischen Zelle kodierten Proteine sind Membranproteine.<sup>[2]</sup> Diese sind hauptsächlich für den Informations- und Stoffaustausch zwischen der Zelle und ihrer Umgebung verantwortlich. *Peter Agre* gelang es 1988 den Wasserkanal *Aquaporin-1* zu isolieren.<sup>[3]</sup> Dieses Membranprotein bildet transmembrane Poren und ist für einen selektiven Transport von kleinen nichtionischen Molekülen durch die Biomembran verantwortlich.<sup>[4]</sup> Im Jahre 1998 veröffentlichte *R. MacKinnon* die erste räumliche Struktur des Kaliumkanals.<sup>[5]</sup> Beide Forscher erhielten für diese Arbeiten den Chemie-Nobelpreis des Jahres 2003.

Die Vielzahl der biologischen Prozesse ist insbesondere auf Grund der strukturellen Komplexität und der intermolekularen Wechselwirkungen der Proteine möglich. Fehlfaltung der Proteine ist ursächlich für eine Reihe von Erkrankungen wie die Alzheimer-, Parkinson und Creutzfeldt-Jakob-Krankheit sowie Diabetes mellitus vom Typ II. Das Amyloid- $\beta$ -Peptid ist ein Hauptbestandteil der unlöslichen Proteinablagerungen im Gehirn von Alzheimerpatienten. Die Toxizität dieses Peptids beruht vermutlich auf der Ausbildung von intermediären  $\beta$ -Faltblatt-Aggregaten und der damit einhergehenden Entstehung von Poren in der Zellmembran.<sup>[6]</sup>

Um den Prozess der Aggregation zu verstehen, sind Untersuchungen zur Struktur der Intermediate notwendig. Die Anzahl der geeigneten Untersuchungsmethoden ist auf Grund der Anforderungen an die Probe stark limitiert. Obwohl die Röntgenstrukturanalyse eine Standardmethode bei der Bestimmung von Molekülstrukturen darstellt, ist die Kristallisation von Membranproteinen oder Proteinkomplexen immer noch eine Herausforderung. Außerdem wird die Proteinstruktur möglicherweise durch die Kristallisation verändert und bildet nicht die biologisch aktive Spezies ab.<sup>[7]</sup> Festphasen-NMR und NMR-Methoden in Lösung sind zur Strukturaufklärung derartiger Systeme nur bedingt geeignet, weil sie relativ hohe Proteinkonzentration benötigen. Dagegen hat sich die Verwendung von komplementären

spektroskopischen Methoden wie z. B. der CD- und Fluoreszenz-Spektroskopie bewährt, auch wenn es bei diesen allgemeineren Methoden zu Überinterpretationen der Ergebnisse kommen kann.<sup>[8]</sup>

Durch die Weiterentwicklung der EPR-Spektroskopie vor allem in der letzten Dekade steht nun ein weiteres vielversprechendes Werkzeug zur Verfügung.<sup>[9]</sup> Die EPR-Spektroskopie eignet sich für die Untersuchungen der schwer zugänglichen Protein-Membran-Systeme und liefert hochaufgelöste Strukturinformationen wie die Abstände zwischen den Markierungen sowie deren wechselseitige Orientierung.<sup>[10]</sup> Außerdem sind Aussagen über die Orientierung der Peptide in Lipidmembranen möglich.<sup>[11]</sup> Zusätzlich kann auch die Membrangängigkeit von Proteinen bestimmt werden.<sup>[12]</sup> Allerdings ist die Qualität der Informationen auf Grund der flexiblen Linker zwischen der Spin-Markierung und dem Peptidrückgrat begrenzt.

Ein Ziel dieser Arbeit ist das Design und die Synthese einer neuen Spin-markierten Aminosäure, welche eine optimale Nutzung der neuen Techniken der EPR-Spektroskopie ermöglicht. Die Aminosäure soll durch eine rigide Konformation und eine definierte Orientierung der Markierung im Bezug zum Peptidrückgrat direkte Rückschlüsse auf die Konformation der Peptide und ihre Ausrichtung in Lipidmembranen ermöglichen. Weiterhin ist es vorgesehen die Funktionalität der neuen Aminosäure an einem Peptid mit zwei Markierungen durch die Bestimmung des Abstands sowie der wechselseitigen Orientierung der Sonden zu demonstrieren.

Zur Untersuchung von Biomolekülen haben sich zudem Modellsysteme bewährt. In dieser Arbeit sollen Modellpeptide dazu verwendet werden, das Potential der Wasserstoffbrückenbindungen zur Assoziation von Sekundärstrukturen der integralen Membranproteine im Hinblick auf die Porenbildung zu ermitteln. Dazu sollen D,L-alternierend konfigurierte Peptide mit Erkennungseinheiten versehen und in Lipidmembranen auf die Ausbildung von höheren Aggregaten untersucht werden. Zur Assoziation der Modellpeptide sollen Alanyl-Nucleoaminosäuren verwendet werden und die Bestimmung der Aggregate soll mittels FRET-Methode (Förster-Resonanz-Energie-Transfer) in großen unilamellaren Vesikeln (LUVs) erfolgen.

Weiterhin sollen  $\beta$ -Peptide, die aus nicht proteinogenen  $\beta^3$ -Aminosäuren aufgebaut sind und auf Grund der repetitiven Struktur der  $3_{14}$ -Helix interessante Modellsysteme für die Untersuchung der intermolekularen Wechselwirkungen darstellen, auf ihr Potential als Transmembraneinheiten untersucht werden.

## 2. Nitroxid-markierte chirale $\alpha$ -Aminosäure

### 2.1 Spinlabels in der EPR-Spektroskopie

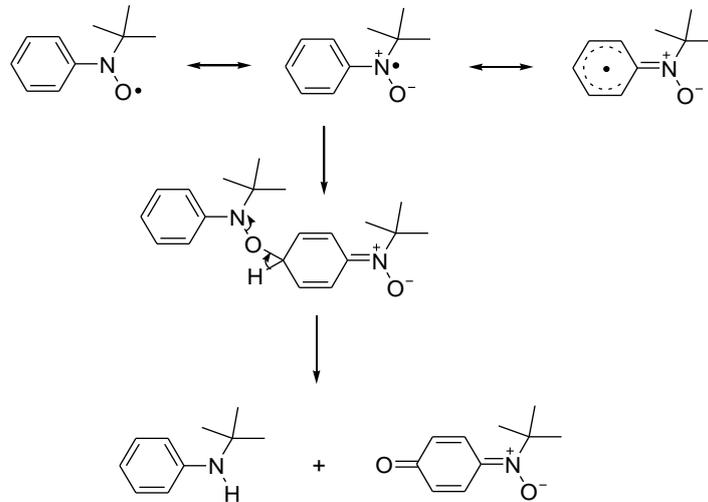
In den vergangenen Jahrzehnten gab es wesentliche Fortschritte auf dem Gebiet der EPR-Anwendungen. Den Anstoß dazu gaben die Entwicklung von schnelleren Rechnern, gepulsten Mikrowellenquellen sowie supraleitenden Magneten mit der Eigenschaft, das Magnetfeld mit der Zeit möglichst linear ändern zu können.<sup>[9]</sup> Diese Fortschritte ermöglichten die Anwendung von Multipulsexperimenten in der EPR Spektroskopie. *Bennati* und *Prisner* bestimmten 2005 mittels PELDOR (pulsed electron double resonance) Spektroskopie den Abstand und die Orientierung von Biradikalen in der Ribonukleotidreduktase.<sup>[10, 13]</sup> Aktuell werden die Spinsonden in der EPR-Spektroskopie überwiegend zur Bestimmung von Abständen und zur Untersuchung lokaler Polarität oder der Dynamik von Biomolekülen eingesetzt.<sup>[8, 12b, 14]</sup>

In biologischen Systemen sind zwei Arten von paramagnetischen Molekülen vertreten: Aromatische organische Radikale und Ionen oder Komplexe von Übergangsmetallen wie sie in Hämen oder Eisen-Schwefel-Clustern vorkommen. Zu den organischen Radikalen gehören Chinone, Amino- oder Nucleinsäuren, die einen paramagnetischen Übergangszustand in Elektronentransfer-Reaktionen annehmen können.<sup>[13a]</sup> Diese Verbindungen weisen ein ungepaartes Elektron auf und gehören zu  $S = \frac{1}{2}$  Spinsystemen. Ionen oder Komplexe von Übergangsmetallen wie Mangan oder Eisen besitzen in einigen Oxidationsstufen mehr als ein ungepaartes Elektron, was zu einem High-Spin-Zustand ( $S > \frac{1}{2}$ ) führen kann. Dabei tritt zusätzlich die Nullfeldaufspaltung (zero-field splitting, ZFS) auf, die zwar Information über die Koordinationssymmetrie des Metallions enthält, in der Regel jedoch zu komplexen EPR-Spektren führt.<sup>[13a, 15]</sup>

In der Natur machen Metallzentren einen Großteil der paramagnetischen Markierungen aus. Organische Spinlabels wie Tyrosinradikale sind kurzlebig, können aber in biologischen Makromolekülen stabilisiert werden.<sup>[7, 16]</sup> Sie machen nur einen Bruchteil der natürlichen Markierungen aus. Synthetische organische Spinlabels basieren vorwiegend auf stabilen Nitroxidradikalen.

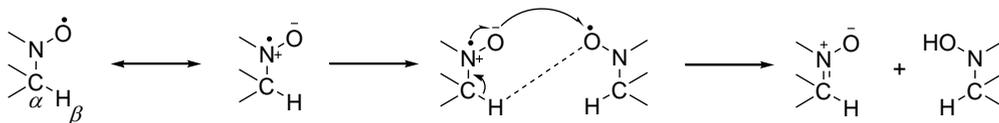
Die Stabilität einer Nitroxidgruppe beruht auf der starken Dreielektronen-Stickstoff-Sauerstoffbindung, in der die Elektronen delokalisiert sind. Entscheidend für die Stabilität ist die Wahl der Substituenten am Stickstoffatom. Eine erweiterte Konjugation durch einen

Phenylring wirkt sich destabilisierend aus, da das Radikal über den Ring delokalisiert wird und so für Abbauprozesse zur Verfügung steht (Abbildung 1).<sup>[17]</sup>



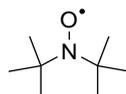
**Abbildung 1:** Abbauprozess von *tert*-Butylphenylnitroxid.

Heteroatome wirken sich als Substituenten ebenfalls destabilisierend aus. Die Stabilität der Nitroxide mit  $sp^3$ -hybridisierten  $\alpha$ -Kohlenstoffatomen als Substituenten ist sehr von der Verfügbarkeit der  $\beta$ -Wasserstoffatome abhängig. Diese ermöglichen eine Disproportionierung der Nitroxide zu Nitronen und Hydroxylaminen und führen zum Abbau der Radikale (Abbildung 2).<sup>[18]</sup>



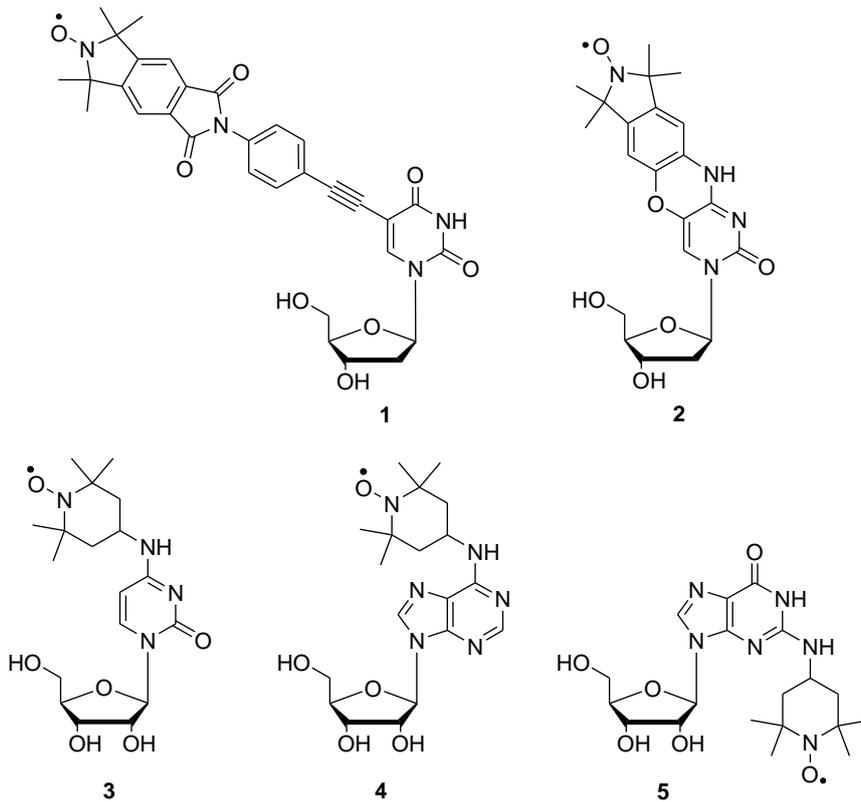
**Abbildung 2:** Disproportionierung der Nitroxide zu Nitronen und Hydroxylaminen.

Bis(1,1-dimethylethyl)nitroxid weist zwei *tert*-Butylgruppen auf, die das Radikal sterisch abschirmen und dadurch zusätzliche Stabilität verleihen (Abbildung 3). Diese Verbindung bildet das Grundgerüst der meisten Nitroxidlabels.



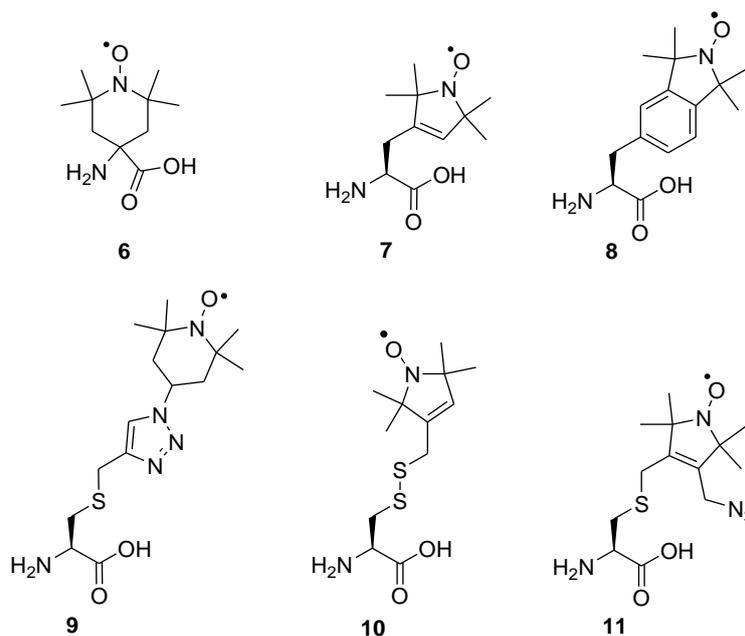
**Abbildung 3:** Struktur von Bis(1,1-dimethylethyl)nitroxid.

Eine Vielzahl von Nitroxid-Markierungen für DNA und RNA (Abbildung 4) sowie für Proteine und Peptide (Abbildung 5) sind bereits bekannt.<sup>[14d, 19]</sup>



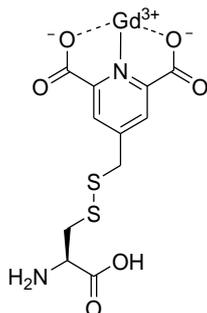
**Abbildung 4:** Einige ausgewählte Spin-markierte Nucleoside **1** bis **5**.

Nitroxid-Bausteine der DNA oder der RNA können direkt durch die Festphasensynthese in die Oligomere eingeführt werden.<sup>[19e]</sup> Häufiger werden funktionalisierte Nucleoside durch die Festphasensynthese in Oligonucleotide eingebaut und diese an der Festphase mit Spinsonden verknüpft.<sup>[20]</sup> Eine positionsspezifische Einführung von Nitroxid-markierten Nucleotiden durch die DNA-Polymerase ist ebenfalls möglich.<sup>[21]</sup>



**Abbildung 5:** Einige ausgewählte Spin-markierte Aminosäuren **6** bis **11**.

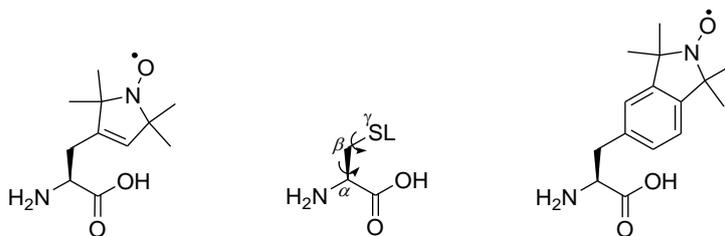
Nitroxid-markierte Aminosäuren können mittels Festphasensynthese in die Peptide integriert werden.<sup>[22]</sup> Proteine werden in der Regel mit dem Methanthiosulfonat-Spinlabel (MTSSL) markiert, das über eine Disulfidbrücke selektiv mit dem Cysteinrest verknüpft werden kann.<sup>[14a]</sup> Ein paramagnetischer  $Gd^{3+}$ -Komplex ( $S = \frac{7}{2}$ ) wurde 2010 von *Potapov et al.* als Spinmarkierung für die Proteine zur Abstandsmessung verwendet.<sup>[14b]</sup> Der Komplex wurde mit dem Cysteinrest über eine Disulfidbrücke verknüpft (Abbildung 6).



**Abbildung 6:**  $Gd^{3+}$ -Spinsonde, verknüpft über eine Disulfidbrücke mit Cystein.

Nur wenige Spinlabels sind in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt, so dass genaue Abstände oder sogar die räumliche Orientierung der Sonden ermittelt werden können. Nukleosid **2** (Abbildung 4), das eine starr mit der Cytosinbase verknüpfte Nitroxidgruppe enthält, wurde erfolgreich zur Untersuchung der wechselseitigen Orientierung von zwei Spinsonden in der DNA verwendet.<sup>[23]</sup>

Mit Ausnahme von TOAC (**6**) sind alle bekannten Spin-markierten Aminosäuren in ihrer Bewegungsfreiheit nicht eingeschränkt (Abbildung 5). Eine Spinsonde (SL) beschreibt durch die Rotation um die  $\alpha C$ - $\beta C$ -Achse bereits einen Kegel (Abbildung 7). Jede weitere Rotation, zum Beispiel um die  $\beta C$ - $\gamma C$ -Achse, erhöht die Beweglichkeit der Sonde und ihr möglicher Aufenthaltsraum wird größer. Eine definierte Ausrichtung der Nitroxidgruppe im Bezug zum Peptidrückgrat ist nicht mehr gegeben.



**Abbildung 7:** Strukturen von zwei Spin-markierten Aminosäuren (rechts und links) und die Rotationsachsen der Spinsonde (SL) (in der Mitte) sind dargestellt.

TOAC (**6**), eine achirale Aminosäure, wurde zur Ermittlung der Orientierung von Membranpeptiden im Bezug zur Lipiddoppelschicht eingesetzt.<sup>[24]</sup> Für diese Untersuchung wurden Kristallstrukturen von anderen Oligopeptiden, in denen die Aminosäure TOAC (**6**) in einer Twist-Konformation vorliegt, zugrunde gelegt.<sup>[25]</sup> Weitere Kristallstrukturen zeigen vier weitere Konformationen der Aminosäure.<sup>[26]</sup> Entsprechend ist der Winkel zwischen der z-Achse der Nitroxidgruppe (Abbildung 8) und dem Peptidrückgrat für jede Konformation der Aminosäure unterschiedlich. Für eine  $\alpha$ -Helix beträgt der Winkel  $10^\circ$  bis  $65^\circ$ , so dass die oben genannte Untersuchung kritisch zu betrachten ist.<sup>[27]</sup> Da das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom von TOAC (**6**) sowohl am Sechsring der Aminosäure als auch am Peptidrückgrat beteiligt ist, wirkt sich das Grundgerüst des Peptides auf die Konformation von TOAC (**6**) aus.<sup>[26, 28]</sup> Außerdem betragen die Energieunterschiede zwischen den Konformationen ca. 1 kcal/mol, so dass unterschiedliche Konformationsisomere gleichzeitig vorkommen können.<sup>[28]</sup> *Milov et al.* haben 1999 mittels PELDOR (bei 77 K) den Abstand zwischen zwei TOAC-Bausteinen in einem Oligopeptid gemessen und eine Unschärfe von ca. 2 Å festgestellt, die sie auf verschiedene Konformationen von TOAC zurückführten.<sup>[29]</sup> Folglich ist noch keine Spinmarkierte Aminosäure bekannt, in der die Nitroxidgruppe so starr mit dem  $\alpha$ -Kohlenstoffatom verknüpft ist, dass die räumliche Orientierung der Sonden in einem Peptid ermittelt werden könnte.