

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

**Untersuchungen zur molekularen Interaktion und
Zellkommunikation am Beispiel der Inkompatibilitätsloki
von *Ustilago maydis***

Manuel Tönnis

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Steffen Glaser

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Horst Kessler

2. apl. Prof. Dr. Louis Moroder

Die Dissertation wurde am 05.03.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 16. 04. 2002 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München in der Zeit von Mai 1997 bis November 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Herrn Professor Kessler danke ich hiermit für das mir entgegengebrachte Vertrauen, das interessante und abwechslungsreiche Themengebiet, die große Freiheit in der Ausgestaltung desselben und für die Unterstützung in allen Belangen. Neben den optimalen materiellen Arbeitsbedingungen waren es vor allem die große wissenschaftliche Freiheit, das exzellente und produktive Arbeitsklima und die Gesprächs- und Hilfsbereitschaft aller, die zum Gelingen dieser Arbeit führten.

Mein Dank gilt ferner:

- Frau Prof. Regine Kahmann, an deren Institut ich die biochemischen Arbeiten durchführen konnte.
- Frau Prof. Averhoff, die auch nach dem Umzug des Institutes von Frau Prof. Kahmann die Durchführung letzter Expressionsarbeiten ermöglichte
- Meinen Laborkollegen Niko Schmiedeberg und Dirk Gottschling für die gute Laboratmosphäre und ihre Unterstützung im Kampf gegen Syro, zeitweilige Stimmungstiefs und freie Flächen in meinem Abzug.
- Maria Kranawetter und Burkhard Cordes für die unzähligen Analytiken
- Bobby Arndt für die fruchtbaren Diskussionen über die Tücken der Peptidsynthese und die Befreiung der Welt vom β -Faltblatt
- Georg Voll für die Vermittlung von Einsichten in Insight II und endlose Abende im Computerraum
- Sibylle Gruner für die vielen aufregenden gemeinsamen Stunden
- den Teilnehmern des A-Praktikums, Andreas Enthart, Stefan Mitschke, Peter Kaden, Clemens Wagner, Karin Lüdtke, Lina Valis, Wolfgang Kleist, Alexander Schriewer, Anita Miess, Martin Bortenschlager, Elke Mayer, Bernd Kalinowski, Sabine Bräu, die

Sibylle und mich tapfer ertragen haben und durch ihre Synthesen ebenfalls zu dieser Arbeit beitragen

- meinen Platzpraktikanten, die alle wirklich mitarbeiteten und mir bislang sogar größtenteils die Korrektur der Ausarbeitungen ersparen.
- Rainer Haefßner für seine Kompetenz bei ‚einfachen‘ NMR-Problemen wie virtuellen Kopplungen höherer Ordnung über den quartären Stickstoff
- Angelika Kühlewein und Gerd ‚Gustav‘ Gemmecker für die East/West-Spektren
- Zalan Szabo und Michael Feldbrügge für die vielen Pheromon-Bioassays und das Schreiben von multikulturellen Artikeln
- Allen hier nicht namentlich genannten Arbeitskollegen für ihren Beitrag zum hervorragenden Arbeitsklima
- Allen Korrekturlesern dieser Arbeit
- Meinem Pferd Goldadler ‚Goldi‘, der mir in allen Schlachten gegen widerborstige Proteine, instabile Kurzkettenmoleküle und Stutenbesitzer als ruhender Pol zur Seite stand.

Und natürlich ganz besonders meiner Familie.

Meinen Freunden
und Goldi (23.04.1981 – 20.02.2002)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Zellkommunikation durch Pheromone	3
2.2	<i>Ustilago maydis</i>	7
2.2.1	Grundlagen <i>Ustilago maydis</i>	7
2.2.2	Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i>	9
2.2.3	Die Inkompatibilitätsloki	11
2.2.3.1	Der a-Lokus	11
2.2.3.2	Der b-Lokus	14
2.3	Posttranslationale Modifikationen	16
2.3.1	Die Bedeutung der Lipidmodifikationen	17
2.3.2	Weitere Möglichkeiten der Lipidderivatisierung	20
2.4	Biochemische Grundlagen rund um die Proteinexpression	22
3	Der b-Lokus von <i>Ustilago maydis</i>: Expression und Reinigung der b-Proteine	24
3.1	Vorarbeiten	24
3.2	Eigene Vorarbeiten	24
3.3	Expression mit dem IMPACT-System von NEB	25
3.4	T7-Promotor für die IMPACT-Vektoren	30
3.4.1	Verbesserung der Inteinspaltung	33
3.5	Simultane Co-Expression mit Chaperones	34
3.6	Solubilisierung durch <i>detergent mediated refolding</i>	36
3.7	Co-Expression der b-Proteine als bE/bW-Heterokomplexe	41
3.8	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse.	45

4	Organische Synthesearbeiten in Zusammenhang mit der Proteinexpression	47
4.1	Detergenzien	47
4.1.1	Synthese der Amino-amide	49
4.1.2	Reduktion zu den entsprechenden Amino-aminen	50
4.1.3	Einführung des zweiten Acylrestes	50
4.1.4	Quarternierung mit Propansulton	50
4.1.5	Synthese weiterer Kernstrukturen	51
4.1.6	Verknüpfung von Amino-aminen über Linker	54
4.1.7	Ergebnisse und Diskussion	56
4.2	Synthese von Homöodomänen – Peptiden	57
4.2.1	Silylierung des Peptidbackbones	58
4.2.2	Silylierung unter Verwendung der Mitsunoboreaktion.	59
4.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion	60
5.	Der a-Lokus von Ustilago maydis	
	Systematische Untersuchung beider Pheromone	62
5.1	Aufgabenstellung	62
5.2	Synthese der Pheromonderivate	65
5.2.1	Fmoc-(4'-Hydroxy)-cyclohexyl-alanin	66
5.2.2	L-2,2-Dimethyl-thiazolidin-4-carbonsäure	67
5.2.3	α -Aminohexadecansäure	67
5.2.4	Andere Harze	68
5.3	Durchführung der Bioassays	69
5.4	Ergebnisse	71
5.4.1	Konjugationshyphen	71
5.4.2	Verkürzungen der Sequenz	71
5.4.3	Ala-Scan / Mehrfachsubstitution durch Alanin	73
5.4.4	D- und DD-Scan	74
5.4.5	Tyrosin-Substitutionen im a1 Pheromon	76

5.4.6	Sonstige Derivate	77
5.5	Diskussion der Ergebnisse	78
5.6	Ausblick	87
6	Zusammenfassung	89
7	Praktischer Teil	92
7.1	Klonierungsprotokolle	92
7.2	Puffer und Medien	96
7.3	Detergenziensynthese	101
7.4	Peptidsynthese	110
7.5.	Darstellung der Aminosäuren	114
7.6	Silylierung des Peptid-backbones	118
8	Literatur	120

ABKÜRZUNGEN

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AcOH	Essigsäure
Äquiv.	Äquivalent(e)
Ar	Aromat
AS	Aminosäure
Bel.	Belegung
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
br.	breit
Bu	n-Butyl
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
EDCI	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -[3-(dimethylamino)-propyl]-carbodiimid
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor- <i>isopropanol</i>
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Im	Imidazol
m	Multipllett
n.b.	nicht bestimmt
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PEG	Polyethylenglycol
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett

qn	Quintett
R _f	Retentionsfaktor
R _t	Retentionszeit
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Smp	Schmelzpunkt
t	Triplett
TBDMS-Cl	t-Butyldimethylsilyl-chlorid
TBDMS-Im	1-(t-Butyldimethylsilyl)-Imidazol
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol-Harz
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
theor.	theoretisch
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TMS-Cl	Trimethylsilyl-Chlorid

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den von *Chemical Abstracts* (Chemical Abstracts, "Index Guide", 77, 210.) und den *IUPAC-IUB*-Kommissionen (IUPAC, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 455-477; IUPAC, *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1919; IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Biochemistry* **1974**, 10, 3983; IUPAC-IUB (JCBN), *Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37) empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke, die aus dem Englischen übernommen wurden, sind *kursiv* geschrieben.

1 Einleitung und Themenstellung

In den letzten Jahren wurden die kompletten Genome zahlreicher Organismen, darunter auch das des Menschen selbst, komplett sequenziert. Die vollständige Kenntnis der DNA-Sequenzen stellt jedoch bei weitem nicht das Ende der Forschung dar, sie ist im Gegenteil erst die Grundlage für die eigentliche Arbeit. In der Basenabfolge der Chromosomen müssen die Gene der Proteinsequenzen erkannt und deren Produkte indentifiziert und charakterisiert werden. Doch selbst, wenn von allen Proteinen bekannt ist, *was* sie tun, so gilt das eigentliche Interesse der Forschung dem *wie*. Denn letztendlich beruhen die Grundlagen nahezu aller Lebensvorgänge auf den Wechselwirkungen von Molekülen, die an ihren Bindungsstellen zueinander komplementäre Strukturen aufweisen. Zum Begreifen dieser Vorgänge, seien es 'einfache' enzymatische Reaktionen oder die 'Sprache' der Zellkommunikation, ist das Verständnis der Mechanismen dieser molekularen Wechselwirkung unabdingbar.

Ein Studienobjekt für diesen Bereich der Forschung ist der Basidiomycet *Ustilago maydis*. Durch die Wirkung eines amphiphilen Peptidpheromons geht der Pilz aus einer nicht pathogenen, hefeartig wachsenden Form in einen filamentös wachsenden Zustand über¹. In dieser Form befällt *Ustilago maydis* seine Wirtspflanzen, den Mais, und greift in deren Wachstum ein, ohne Abwehrreaktionen seitens der Pflanze auszulösen.

Ein erster Schritt zur Aufklärung der dabei ablaufenden Vorgänge ist die Untersuchung des auslösenden Pheromons und dessen Wechselwirkungen mit Membran und Rezeptor. Begonnen wurde diese Arbeit von MARCUS KOPPITZ, der die Bedeutung der lipophilen Modifikation am Pheromon aufklären konnte². Die Komplettierung des Projekts, die Analyse des Peptidteils dieses Pheromons und die Relevanz der einzelnen Aminosäuren für dessen Aktivität, ist Teil des Inhalts dieser Arbeit. Das Ziel ist hierbei, durch systematische Analyse der Peptidteile zu klären, wie die Rezeptoren mit ihrem jeweils zugehörigen Pheromon im Detail interagieren.

Beim Übergang zum filamentösen Wachstum ist die Interaktion des Pheromons mit dem Rezeptor jedoch nur der erste Schritt einer ganzen Signaltransduktionskaskade, an deren Ende regulatorische Proteine stehen, die letztlich bestimmte Gene aktivieren. Diese regulatorischen Proteine gehören mit zu den großen Mysterien der aktuellen Forschung, da die gängigen Computermodelle diesen Proteinen nicht einmal die real vorhandene Interaktion zugestehen, geschweige denn deren komplexe Interaktionsmuster erklären können.

Damit sind diese regulatorischen Proteine ein weiteres wichtiges Forschungsziel. Es gilt, diese Proteine für eine gründliche Untersuchung zu isolieren, zu charakterisieren, und letztendlich eine Strukturaufklärung per NMR-Spektroskopie vorzubereiten.

In diesem Projekt wurden die Methoden der organischen Synthesechemie mit denen der modernen Genetik kombiniert. Diese interdisziplinäre Zusammenarbeit stellte dann die Grundlagen bereit, die gestellten Aufgaben möglichst umfassend von allen Seiten zu bearbeiten.

2 Grundlagen

2.1 Zellkommunikation durch Pheromone

Eukaryontische Zellen bedienen sich kleiner Peptidhormone für die interzelluläre Kommunikation³. Dabei hat sich die Methode, kleine und somit leicht diffundierende, hochaktive Peptidhormone zu sekretieren und zu erkennen, im Laufe der Evolution bemerkenswert hoch konserviert. So zeigt beispielsweise der α -Faktor von *Saccharomyces cerevisiae* strukturelle und funktionelle Analogien zum Säuger-hormon GRH (*gonadotropin-releasing hormone*)⁴.

Auch bei Pilzen sind solche Oligopeptide an der sexuellen Entwicklung beteiligt, wobei sie als Pheromone bezeichnet werden⁵. Das wohl am besten untersuchte Beispiel sind die Pheromone des Hemiascomycocyten *S. cerevisiae*⁶. In diesem Modellorganismus werden die Pheromone durch spezifische Rezeptoren erkannt. Letztere gehören zur Klasse der Rezeptoren mit sieben transmembranen Helices, die Signaltransduktion erfolgt über die assoziierten, heterotrimeren G-Proteine und die konsekutive Signaltransduktionskaskade und bewirkt letztlich veränderte Genexpression, Arretieren des Cellcyclus und morphologische Veränderungen^{7,8}. Alle diese Prozesse sind bisher 'im Prinzip' verstanden und erklärbar, nicht jedoch im molekularen Detail. Dabei spielt der erste Schritt, die hochselektive Ligandenerkennung am Rezeptor, eine Schlüsselrolle. Es muß erforscht werden, welche strukturellen Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Denn es geht nicht nur um 'klassische' Molekül-Molekül Interaktionen, also um die Erkennung von Liganden, sondern vor allem um die Unterscheidung dieser einander ähnlichen Moleküle.

S. cerevisiae besitzt zwei solcher Paarungsloki, **a** und α , die zwei Transkriptionsfaktoren kodieren, welche jeweils für die weitere Entwicklung relevante Gene aktivieren. Zellen mit kompatiblen Loki können sich gegenseitig stimulieren und erkennen. Die Kompatibilität wird durch die Expression konjugierter Elemente eines Pheromon-Erkennungssystems

sichergestellt: Zellen mit dem α -Apparat exprimieren MF α 1 und MF α 2, Vorstufen des jeweiligen α -Faktors, sowie STE2, einen Rezeptor für den **a**-Faktor; Zellen mit dem **a**-System produzieren MFA1 und MFA2, wiederum beides Pheromonvorstufen, und über STE3 einen α -Faktor Rezeptor. Die endgültigen Pheromone des **a**-Faktors sind Dodecapeptide, die des α Faktors Tridecapeptide. Obwohl beide in ihrer Wirkungsweise einander sehr ähnlich sind, unterscheiden sie sich doch gravierend in ihrer Prozessierung und Sekretion. Der α -Faktor, ein unmodifiziertes Tridecapeptid, wird auf dem klassischen Weg über das endoplasmatische Retikulum und Secretionsvakuolen aus der Zelle freigesetzt, während der **a**-Faktor am C-terminalen Cystein farnesyliert, carboxymethyliert und über den Peptidexporter Ste6p aus der Zelle transportiert wird^{9,10}.

Im Gegensatz zu den Ascomyceten benutzen die Basidiomyceten eine andere Strategie, was die Expression des Pheromon-Erkennungssystems angeht. Hier sind die Gene von Pheromon und Rezeptor integrale Bestandteile eines Paarungs- oder Inkompatibilitätslokus. Die bisher komplexeste Situation hat sich dabei bei den Homobasidiomyceten *Corpinus cineris* und *Schizophyllum commune* entwickelt. Bei diesen Pilzen sind die Pheromone nicht an den einleitenden Phasen der Zellfusion beteiligt, sondern spielen erst nach deren Abschluß bei der Zellkernwanderung und Aufrechterhaltung des filamentösen Wachstums eine Rolle. Beim holzverwertenden *S. commune* wurden neun Allele identifiziert, die je zwei Loki enthalten, welche ihrerseits jeweils bis zu drei Pheromone und einen Rezeptor codieren^{11,12}. Bei *C. cineris* sind die Pheromon- und Rezeptorgene auf einem einzigen Lokus von ungefähr 17 kbp geclustert. Jedes Allel codiert drei Unterfamilien mit den Genen von zwei Pheromonen und einem Rezeptor^{13,14,15}. In beiden Fällen können nur Pheromone anderer Allele Reaktionen auslösen, es gibt keine Selbst-Stimulation. Dies bedeutet, daß im Gegensatz zur Situation bei *S. cerevisiae*, wo der Rezeptor Ste2p nur zwischen **a** und α Faktor unterscheiden muß, die Rezeptoren hier hochselektiv eine ganze Reihe 'eigener' Pheromone von noch mehr 'fremden' (jeweils bezogen auf das Allel des Rezeptors) unterscheiden müssen¹⁶. Um dieses hochentwickelte

Erkennungssystem verstehen zu können, müssen die strukturellen Grundlagen der Pheromonerkennung durch den Rezeptor auf molekularer Ebene erforscht werden.

In dieser Arbeit wurden die Untersuchungen zur Pheromonerkennung am Basidiomycocyten *Ustilago maydis*, dem Erreger des Maisbeulenbrandes durchgeführt^{17,18,19,20}. Wie auch andere Basidiomyceten besitzt *Ustilago maydis* ein vierpoliges Fortpflanzungssystem, bei dem zwei Inkompatibilitätsloki, bezeichnet als a und b, sicherstellen, daß das pathogene Stadium nur nach erfolgreicher Zellfusion mit einem genetisch verschiedenen Partner eingeleitet wird. Der biallelische a-Lokus kodiert je eine Pheromonvorstufe und einen Rezeptor. Der multiallelische b-Lokus kodiert zwei Homöodomänen-Transskriptionsfaktoren²¹.

Ustilago maydis ist eine der wenigen Ausnahmen, bei der die Pheromone charakterisiert wurden. Die Sequenzierung der Peptide ergab, daß zwischen dem a1 Tridecapeptid und dem a2 Nonapeptid keine sequenziellen Ähnlichkeiten zu bestehen scheinen. Die einzige offensichtliche Gemeinsamkeit ist in beiden Fällen die CaaX-Box am C-Terminus der Pheromonvorstufen, analog zum a Faktor von *S. cerevisiae*²². Aufgrund dieser Signalsequenz werden auch die C-terminalen Cysteine der Pheromone von *Ustilago maydis* modifiziert¹. Eine wesentliche Voraussetzung für die Aufreinigung der nativen Pheromone war die Entwicklung eines reproduzierbaren Testsystems zur Bestimmung der Pheromonaktivität. Dies wurde mit sogenannten Pheromontesterstämmen realisiert. Diese diploiden Laborstämme, FBD11-7 (a1a1b1b2) und FBD12-17 (a2a2b1b2) enthalten heteroallelische und damit funktionsbereite b-Loki (Auf die genaue Funktionweise beider Loki wird im folgenden Kapitel 2.2.3 detailliert eingegangen, siehe dort). Dennoch verhalten sich diese Stämme wie die haploiden hefeartig, da zur b-Aktivierung Pheromonstimulation erforderlich ist. Erst durch Zufuhr des essentiellen Pheromons gehen diese Stämme in den filamentösen Zustand über. Diese Veränderung in der Morphologie kann leicht an der Bildung weißer, watteähnlicher (*fuzzy*) Kolonien auf den durch ihren Aktivkohlegehalt schwarzen Nährmedien erkannt werden²³. Mittels

dieses Bioassays konnte gezeigt werden, daß das synthetische, aber nicht prenylierte Peptid a1 Pheromon 1000fach weniger wirksam war, als das native². Im weiteren Verlauf konnten durch Einsatz S-alkylierter Cysteine und durch synthetische Analoga Derivate synthetisiert werden, die die natürliche Aktivität erreichen oder sogar um Größenordnungen übertreffen²⁴. Dabei zeigte sich jedoch, daß die native Prenylierung keine Farnesylierung ist, wie ursprünglich postuliert, da das entsprechende synthetische Derivat um einen Faktor 10 weniger wirksam war als das native, welches sich zudem auf der HPLC als etwas polarer erwies. Es wird daher vermutet, daß die nativen Pheromone einen ω -Hydroxygeranylgeranyl-Rest tragen. Durch die hohe Aktivität und die gute synthetische Zugänglichkeit setzte sich letztlich α -Aminohexadecansäure (Ahds) als Mimetikum der Wahl durch.

Die Verfügbarkeit eines Testsystems und die Kenntnis um die Bedeutung der Lipidmodifikation schufen die Grundlage, um mit einer systematischen Analyse des Peptidteils der Pheromone von *Ustilago maydis* zu beginnen. Das Ziel war dabei, die für die Pheromonbindung, Rezeptoraktivierung und Rezeptorspezifität verantwortlichen Bereiche zu lokalisieren und deren Wirkungs- und Interaktionsmechanismen zu verstehen.

2.2 *Ustilago maydis*

2.2.1 Grundlagen *Ustilago maydis*

Deutscher Name: Maisbrand, Maisbeulenbrand

Botanischer Name: *Ustilago maydis*

Familie: Ustilaginaceae

Ordnung: Ustilaginales

Klasse: Heterobasidiomyceten

Wirtsspektrum: Mais (*Zea mays*), Theosinte (*Euchleria mexicana*)

Abbildung 1: *Ustilago maydis* im Überblick.

In fast allen Maisfeldern lassen sich bei genauem Hinsehen im Sommer Pflanzen ausmachen, die durch weiße bis braunschwarze Verunstaltungen, kleine Gallen bis hin zu großen Geschwulsten, auffallen. Bekannt dürfte diese als Maisbrand oder Maisbeulenbrand bezeichnete Erscheinung schon den ersten Maisbauern in Ecuador um 5800 v. Chr. gewesen sein, ebenso den Europäern, die Mais seit dem 17. Jh. feldmäßig anbauten. Erstmals schriftlich geschildert wurde diese Erscheinung im Jahre 1768 von BECKMANN²⁵, und erst fast 70 Jahre später, 1836, gelang es UNGER²⁶, einen Pilz als den Auslöser dieser Symptome zu identifizieren.

Das Wirtsspektrum des Maisbrandes beschränkt sich auf Mais und Theosinte, eine in Mittelamerika beheimatete Pflanze, die als die Urform des kultivierten Mais' diskutiert wird²⁷ (Abbildung 1).

Die Bedeutung von *Ustilago maydis* als Ernteschädling ist eher gering. Auch toxikologisch hat dieser Pilz, etwa im Vergleich zu den Mutterkornpilzen, die durch ihren LSD-Gehalt Teile der Ernte unbrauchbar machen können, keine Bedeutung. Durch Pilzmycelium veränderter Mais zeigt einen erhöhten Proteinanteil bei reduziertem Stärkegehalt. Dies, in Verbindung mit der

veränderten Farbe der Produkte, wird je nach Land und Region unterschiedlich gewertet. Hierzulande gilt der Pilz als ‚lästig‘, in Mexiko hingegen sind ‚schwarze Tortillas‘ eine Spezialität, für deren Produktion Mais gezielt infiziert wird²⁸. Selbiges gilt für die Gewinnung von Ustinsäure und anderen Inhaltsstoffen des Pilzes. Darüber hinaus könnte auch hierzulande der ‚befallene‘ Mais als natürliche Proteinquelle Futtermittel aus tierischem Eiweiß ersetzen.

Der Grad des Befalls hängt im Wesentlichen von der Witterung ab, da gängige landwirtschaftliche Fungizide bei *Ustilago maydis* kaum Wirkung zeigen und auch lange Fruchtwechselferioden wegen der grossen Lebensdauer der Sporen im Boden (>10 Jahre) keinen Schutz bieten. Allerdings führt im umgekehrten Fall wiederholter Maisanbau auf derselben Fläche zu einem von Jahr zu Jahr stärkeren Befall. Dies zeigte sich z. B. auf dem Versuchsfeld, auf dem das Institut für Genetik der LMU München zur Saatgutgewinnung spezielle Maissorten kultivierte.

Die im Grunde gutmütigen Eigenschaften von *Ustilago maydis* erleichtern die Arbeiten mit dem Pilz. Forschungen an bislang nicht charakterisierten Genen des Pilzes unterliegen der Sicherheitsstufe 2, sonstige Arbeiten werden niedriger eingestuft.

2.2.2 Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis* kann in drei Kernphasen eingeteilt werden²⁹ (Abbildung 2): Die Teliosporen, die im Boden überwintern, keimen aus und vermehren den Pilz durch hefeartiges Wachstum. Die haploiden Zellen dieses Stadiums wachsen außerhalb der Pflanze, lassen sich auf diversen Medien in vitro halten (Suspensionskultur, saprophytisches Wachstum) und sind nicht pathogen. Durch Fusion zweier kompatibler Sporidien entsteht ein durch filamentöses Wachstum gekennzeichnetes Dikaryon. Diese Form ist das zweite Lebensstadium von *Ustilago maydis*. In dieser Form ist der Pilz auf die Pflanze als Nährboden angewiesen, wobei er die beschriebenen Symptome des Maisbeulenbrandes - Tumore im Pflanzengewebe - induziert.

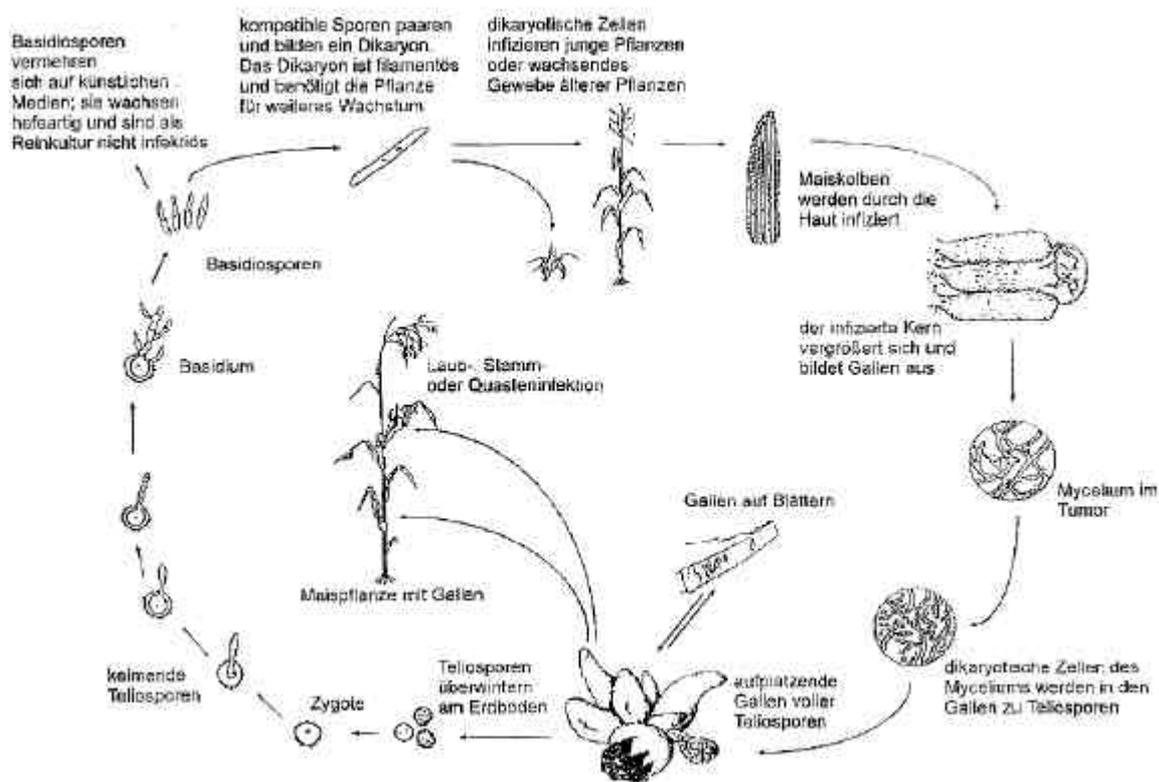


Abbildung 2: Lebenszyklus von *Ustilago maydis*. Die Pheromone sind für die Paarung der Sporen verantwortlich (oben, 2. von links). Quelle: Lit².

In diesen Tumoren vermehrt sich das Pilzmaterial massiv, gefolgt von Karyogamie und Sporulation, bis nach einigen Wochen die Tumore absterben und vertrocknen. Der dabei entstehende braune Staub enthält

Myriaden von Teliosporen, die sich mit dem Wind verbreiten. Dies ist die dritte Phase, die den Lebenszyklus dieses Pilzes vollendet.

Das diploide Stadium des Pilzes kann nur auf speziellen Festmedien kultiviert werden, die Aktivkohle enthalten. Ohne Aktivkohle oder in Flüssigkultur wächst der Pilz nicht filamentös. Es wird diskutiert, inwieweit in vivo Pflanzenfaktoren neben den Pheromonen eine Rolle spielen. Das Verhalten von *Ustilago maydis* in vitro zeigt jedenfalls, daß für das filamentöse Wachstum mehr als nur ein entsprechendes Nahrungsangebot und die Pheromone nötig sind.

2.2.3 Die Inkompatibilitätsloki

Eine der entscheidenden Phasen im Lebenszyklus von *Ustilago maydis* ist die Fusion zweier haploider Sporen zum Dikaryon. Diese wird durch zwei Inkompatibilitätsloki a und b kontrolliert^{30,31,32}. Beide Loki haben die Aufgabe, bei der sexuellen Vermehrung des Pilzes Inzucht zu vermeiden, indem sie sicherstellen, daß nur genetisch unterschiedliche Zellen verschmelzen. Die Funktionweisen beider Loki basieren auf dem selben Grundprinzip. Rein phänomenologisch entstehen bei der Zellfusion aus den Allelen der Fusionspartner Genpaare, die, sofern sie sich aus den Genen verschiedener Allele zusammensetzen, über die von ihnen kodierten Proteine aktiv werden und die ihnen obliegenden Funktionen ausführen³³. Die Art und damit die Funktionsweisen dieser Proteine sind jedoch sehr vielfältig. So arbeiten sogar die beiden Inkompatibilitätsloki von *Ustilago maydis* nach völlig unterschiedlichen Prinzipien.

2.2.3.1 Der a-Lokus

Vom a-Lokus existieren zwei Allele, die als a1 und a2 bezeichnet werden. Jedes dieser Allele enthält zwei Gene, die jeweils eine Pheromonvorstufe und einen Rezeptor kodieren. Bei den Pheromonvorstufen handelt es sich um 40 (a1) bzw. 38 (a2) Aminosäuren lange Peptide, die als mfa1 (mating factor encoded by the a1 allele) bzw. mfa2 bezeichnet und zum jeweiligen Pheromon prozessiert werden (Abbildung 3). Das andere Gen pra1 (pheromon receptor encoded by the a1 allele) bzw. pra2 codiert die Sequenz des jeweiligen Pheromonrezeptors. Dabei erkennt der Rezeptor des einen Lokus nur das Pheromon des anderen Lokus, nicht jedoch das eigene. Auf dieser Abhängigkeit vom jeweils anderen Pheromon für die Rezeptorstimulation beruht die *self- / nonself-recognition* des a-Lokus.

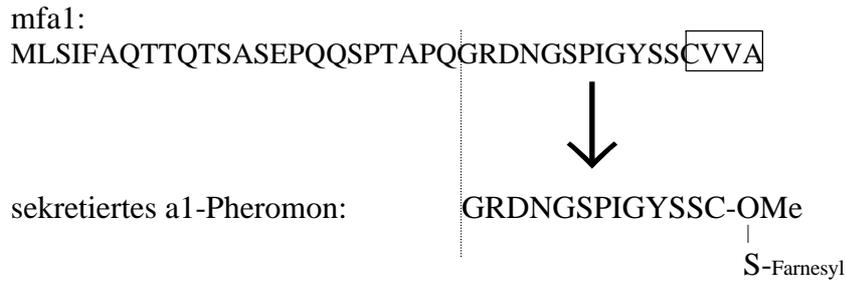


Abbildung 3: Die Sequenz von mfa1 und dem fertigen Pheromon.

Im Lebenszyklus von *Ustilago maydis* obliegt dem a-Lokus die Kontrolle über die Fusion zweier haploider Zellen zum filamentös wachsenden Dikaryon. Dabei ist der Pilz auch nach erfolgter Zellfusion auf die ständige Zufuhr beider a-Pheromone angewiesen. Dies ergab sich aus Co-Kultur verschiedener stabiler diploider Stämme, die jeweils einen Locus heteroploid und den anderen diploid enthalten (etwa: a1 a1 b1 b2, a1 a2 b1 b1, etc.), mit haploiden Stämmen (Abbildung 4). Es zeigte sich, daß die diploiden Stämme zur Aufrechterhaltung ihres filamentösen Wachstums auf die externe Zufuhr des jeweils fehlenden Pheromons angewiesen sind. Dies kann z. B. durch Co-Kultur mit einem entsprechenden haploiden Stamm geschehen. So wird etwa ein a2 a2 b1 b2-Stamm durch einen a1 b1-Stamm zum filamentösen Wachstum angeregt.

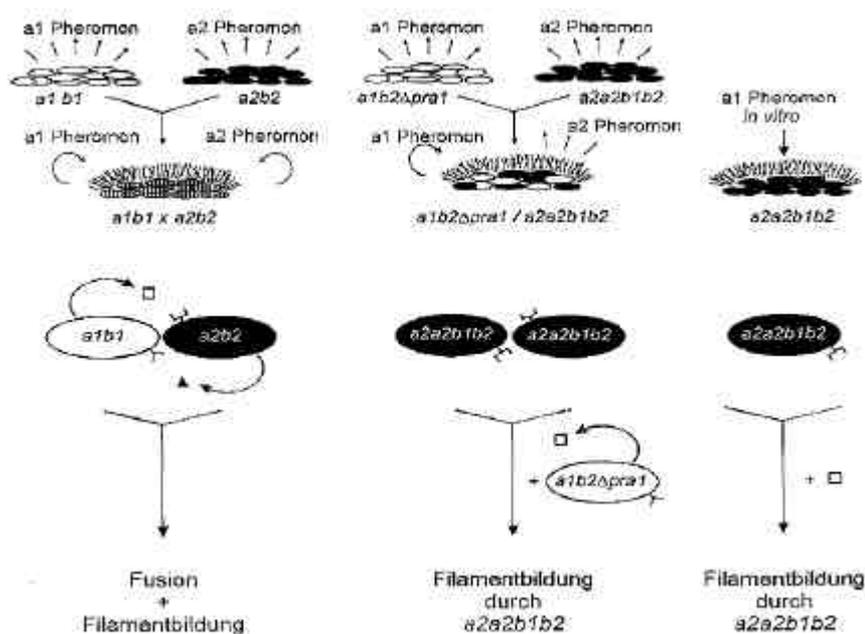


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Pheromonwirkung. a1-Zellen sind weiß und a2-Zellen schwarz dargestellt. Durch Anwesenheit beider Pheromone tritt der Pilz in sein filamentöses Stadium.

Um in der Praxis sicherzustellen, daß wirklich der diploide Stamm stimuliert wird, benutzt man haploide Stämme mit defektem oder fehlendem Pheromonrezeptor (ΔprX), für das eben genannte Beispiel etwa $a1\ b1\ \Delta pr1$ (Pheromonrezeptor $pr1$ erkennt Pheromon $a2$). Statt indirekt durch Co-Kultur kann das fehlende Pheromon auch als Substanz dem Pilz zugeführt werden. Basierend auf diesem Prinzip können die diploiden Stämme auch zum Test synthetisch hergestellter Pheromonderivate genutzt werden, ihr filamentöses Wachstum ist dann ein Maß für die Aktivität der Verbindung.

Die fertig prozessierten, aus *Ustilago maydis* isolierten Pheromone konnten durch Edman-Abbau bis auf die C-terminale Aminosäure sequenziert werden. Da die entsprechenden Genloki eine CaaA-Box aufweisen, wurde auf einen farnesylierten Cysteinmethylester als C-Terminus geschlossen, zumal diese Modifizierung bei Pilzpheromonen weit verbreitet ist³⁴. Dennoch war das synthetische Pheromon mit dieser Modifizierung um etwa zwei Größenordnungen schwächer wirksam als das native. Auch HPLC-Untersuchungen zeigen Unterschiede zwischen dem nativen Pheromon und dem synthetischen Derivat, wobei allerdings das native etwas polarer ist. Somit ist die Lipidderivatisierung des nativen Pheromons nach wie vor nicht aufgeklärt, und es wird spekuliert, daß es sich um einen ω -Hydroxygeranylgeranylrest handeln könnte².

Nach der Modifizierung des C-Terminus wird das N-terminale MLSIF-Motiv, das beide Pheromonvorstufen besitzen, prozessiert. Dieses Motiv wirkt als Erkennungssequenz für einen Enzymapparat, der das so markierte Peptid aus der Zelle ausschleust³⁵. Dabei wird der N-Terminus im Rahmen der Sekretion durch eine Endopeptidase verkürzt. Beim $a1$ -Pheromon werden 24 N-terminale Aminosäuren abgespalten, beim $a2$ -Pheromon sind es 26, und der jeweilige Rest, das eigentliche Pheromon, wird durch die Zellmembran nach außen transportiert.

NMR-spektroskopische Strukturuntersuchungen am $a1$ -Pheromon zeigen weder in DMSO/Wasser noch in SDS/Wasser eine bestimmte Sekundärstruktur. Die Verbindungen liegen als random-coil vor, die

Amidbindungen sind trans, lediglich die Bindung Ser⁶-Pro⁷ zeigt eine gewisse Tendenz zur cis-Konfiguration. Der Anteil der cis-Konformation ist im Medium SDS/Wasser etwas größer als in DMSO/Wasser². Damit zeigen sich gewisse Ähnlichkeiten zum α -Faktor von *Saccharomyces cerevisiae*³⁶, einem Peptid mit ebenfalls 13 Aminosäuren.

Die Gene der Pheromonrezeptoren zeigen ebenfalls signifikante Homologien zum Rezeptor des α -Faktors von *Saccharomyces cerevisiae*³⁷ (STE3-Gen), sowie zum M-Faktor Rezeptor map3+ von *Schizosaccharomyces pombe*³⁸. Diese Rezeptoren gehören zur großen Familie von Rezeptoren mit sieben transmembranen Helices. Das durch die Ligandbindung erzeugte Signal führt zum Zerfall eines im Cytosol membranständigen G-Proteins³⁹ in seine drei Untereinheiten. Die so für kurze Zeit freie und damit aktivierte γ -Untereinheit steht am Beginn einer Signaltransduktionskaskade, die letztendlich im zellinneren Effektoren aktiviert^{40,41}.

2.2.3.2 Der b-Lokus

Wie beim a-Lokus sind auch auf dem b-Lokus 2 antiparallele Gene lokalisiert. Deren 5'-Enden sind etwa 400 bp voneinander entfernt. Doch mit dem analogen Muster der Genanordnung ist die Ähnlichkeit zwischen beiden Loci auch schon erschöpft, die Funktionsweise dieser Allele ist gänzlich anders als beim a-Lokus.

Vom b-Lokus sind mindestens 30 verschiedene Allele bekannt. Sequenzvergleiche zwischen den Allelen ergaben Homologien von über 90%, jedoch mit Ausnahme einer etwa 1000 bp langen Region, in der die Homologie nur zwischen 60% und 90% liegt. Diese hypervariable Region in der Mitte des Allels umfasst neben der *non-coding region* auch jeweils etwa 300 bp an den 5'-Enden der beiden Gene.

Somit unterscheiden sich die b-Proteine der verschiedenen Allele hauptsächlich in ihren ersten 100 Aminosäuren, während der Rest der 480 (*bEast*) bzw. 650 Aminosäuren (*bWest*) großen Proteine praktisch unverändert vorliegt. Diese Proteinpaare wurden 1991 als *bEast* und *bWest* bezeichnet, eine Anspielung auf die Wiedervereinigung von Ost- und Westdeutschland.

Jedes der verschiedenen *bEast* Proteine formt mit jedem der *bWest* Proteine einen funktionalen Komplex und umgekehrt jedes *bWest* mit allen *bEast*. Allerdings besteht die bemerkenswerte Ausnahme, daß bE und bW desselben Allels nicht miteinander interagieren. Somit resultiert auch hier nur zwischen genetisch verschiedenen Individuen eine erfolgreiche Paarung. Bei dem bE/bW-Komplex handelt es sich um ein regulatorisches Protein, die Aktivierung der b-Targets erlaubt den Eintritt in das sexuelle, pathogene Stadium im Lebenszyklus von *Ustilago maydis*⁴².

Bemerkenswert ist, daß hier die möglichen Restriktionen des Inkompatibilitätslokus erst dann greifen, wenn die Paarung der Zellen bereits abgeschlossen ist. Somit besteht die Möglichkeit, daß sich individuell durchaus vermehrungsfähige Zellen, die aber gleiche b-Allele tragen, durch eine Fusion gegenseitig in eine Sackgasse manövrieren können. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit einer Fehlfusion umso kleiner, je mehr verschiedene b-Allele im Genpool vorhanden sind. Es wird daher spekuliert, daß *Ustilago maydis* quasi als evolutionäre Notlösung eine Methode zur Vermehrung der b-Allele entwickelt hat. Damit wäre die heutige Vielzahl der b-Allele auf die fortlaufende Diversifizierung eines einstmals wesentlich einfacheren Systems, vielleicht ähnlich dem a-Lokus, zurückzuführen.

2.3 Posttranslationale Modifikationen

Nach der ribosomalen Translation werden viele Proteine noch weiter modifiziert. Alle Formen dieser posttranslationalen Modifikationen laufen nach demselben Grundschema ab, auch wenn die Palette der möglichen Variationen sehr reichhaltig ist. In allen Fällen besitzen die Proteine, die modifiziert werden, Erkennungssequenzen für Enzyme bzw. Enzymapparate, die dann die jeweilige Prozessierung durchführen.

Die Gene von *mfa1* und *mfa2* codieren am C-Terminus der Peptide ein CaaX-Motiv. Dieses Strukturelement löst eine dreistufige posttranslationale Modifikation^{43,44} aus. Zuerst erfolgt an der Thiolgruppe des Cysteins eine Prenylierung, dann wird das Tripeptid aaX abgespalten und zuletzt die so freigelegte Carboxylfunktion des Cysteins mit Methanol verestert (Abbildung 5). Das a im CaaX-Motiv steht für eine beliebige aliphatische Aminosäure. Die Untersuchungen am *ras*-Onkogen ergaben, daß die Aminosäure X für die Art der Prenylierung entscheidend ist. Ist X = Ser, Met, Gln oder Ala, so wird am Cystein farnesyliert, ist X eine andere Aminosäure, so wird geranylgeranyliert, insbesondere im Fall von X = Leucin.

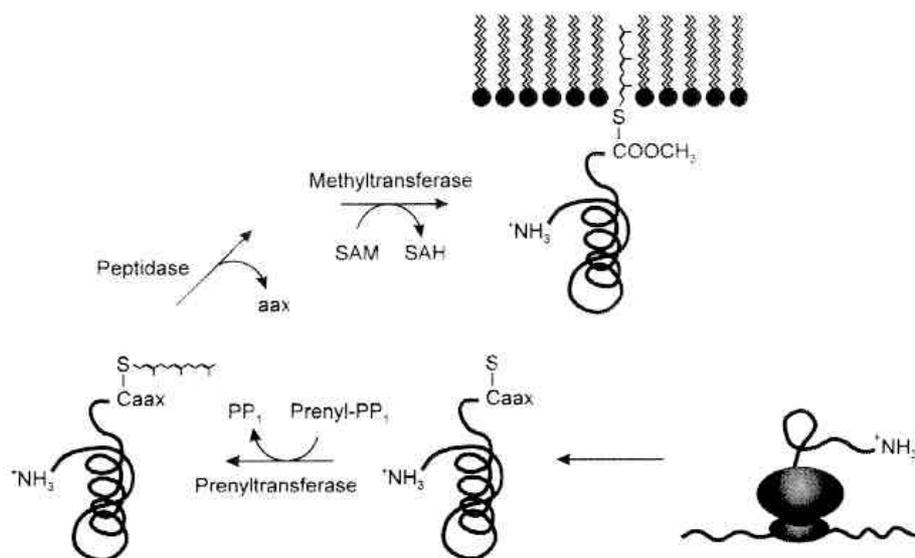


Abbildung 5: Die Prozessierung der Pheromone. Von unten rechts: ribosomale Proteinsynthese, Prenylierung, Proteolyse und Veresterung. Die letzten drei Schritte werden durch die CaaX-Box induziert. Nicht dargestellt ist die Prozessierung des N-Terminus im Rahmen der Sekretion der Pheromone.

Derartige Modifikationen beschränken sich nicht nur auf niedrigere Organismen, sondern finden sich bei etwa 0.5 % aller tierischen Zellen⁴⁵. Besonders gründlich wurde dabei in den letzten Jahren das ras-Protein untersucht. Das ras-Protein ist ein farnesyliertes, membranständiges G-Protein, das ins Blickfeld der Forschung rückte, weil bei ca. 20% aller Fälle von Human-Krebs Fehlfunktionen dieses Proteins beobachtet werden^{46,47}.

2.3.1 Die Bedeutung der Lipidmodifikationen

Den ersten Schritt zur Klärung der Frage nach dem Grund der Lipidmodifikation von Peptiden lieferte Anfang der 80er Jahre die Erforschung der Enkephaline. Alle derartigen Opiat-Peptide besitzen N-terminal dasselbe Bindungsmotiv (Y-G-G-F-L/M), binden jedoch selektiv an verschiedene Rezeptoren. Die jeweils unterschiedlichen C-Termini dieser Verbindungen gehen jedoch keine spezifischen Wechselwirkungen mit dem Rezeptor ein⁴⁸. Von den Arbeitsgruppen um SCHWYZER und KAISER wurde daher vorgeschlagen, die Molekülstruktur in einen *address*- und einen *message*-Teil zu unterteilen. Im Fall der Enkephaline wäre der C-Terminus der *address*-Teil, der durch unterschiedlich tiefes Eintauchen in die amphiphile Membran den *message*-Teil an bestimmte Rezeptoren dirigiert. Die unterschiedlichen Eintauchtiefen werden durch spezifische Wechselwirkungen der Peptide mit der amphiphilen Zellmembran gesteuert. Nach diesem Modell erfolgt die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung nicht direkt, sondern in zwei diskreten Stufen. Im ersten Schritt tritt der Ligand mit der Zellmembran in Wechselwirkung. Nach SINGER und NICOLSON müssen Zellmembrane als Flüssigkeiten aufgefaßt werden. Dies bedeutet, daß in der Zellmembran fixierte Strukturen zwar diese nicht verlassen

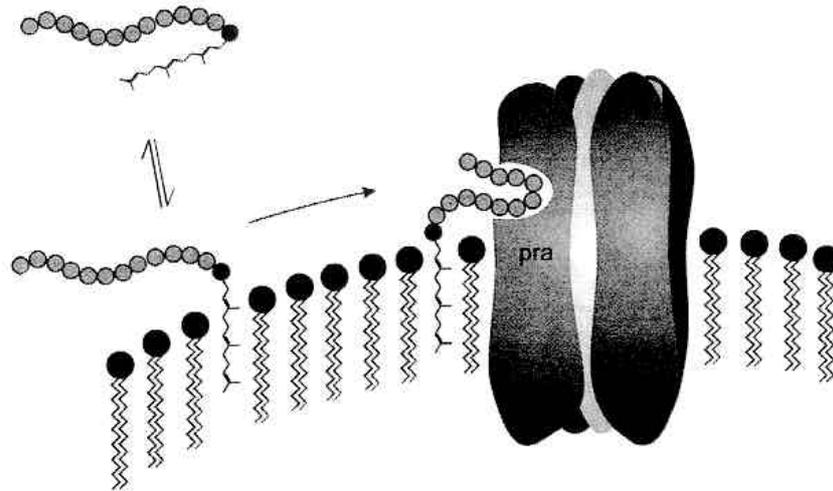


Abbildung 6: Der lipophile Teil bindet das Pheromon an die Zellmembran, ohne im Peptidteil eine bestimmte, feste Vorzugskonformation zu erzeugen. Durch Diffusion in der Membran erreicht es den Rezeptor.

können (zumindest nicht ohne weiteres), sich dafür aber frei zu jedem Punkt innerhalb der Membran bewegen können. Erst danach erfolgt durch diese zweidimensionale Diffusionsbewegung die Bindung an den Rezeptor (Abbildung 6). Die Membran kann dabei bis zu drei verschiedene Aufgaben erfüllen (Abbildung 7):

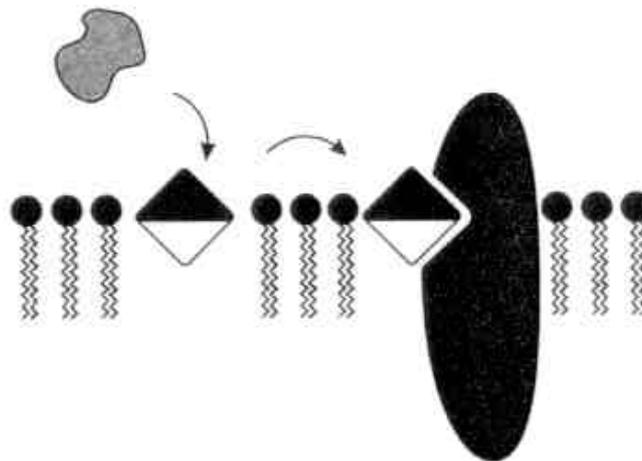


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Modells von SCHWYZER. Der Ligand wird an die Membran gebunden und dabei angereichert, orientiert und konformationell verändert. Erst danach erfolgt die zweidimensionale Diffusion zum Rezeptor.

Durch den regioselektiven Effekt wird die effektive Konzentration des Liganden erhöht, weil durch die Membranbindung die Diffusion des Liganden von drei auf zwei Dimensionen reduziert wird, denn alle Moleküle, die in den membranumschlossenen Bereich hineindiffundieren würden, werden nun auf dessen Oberfläche konzentriert. Setzt man in dieses sogenannte GUGGENHEIM-Modell realistische Werte für Zelldurchmesser ($r = 10 \mu\text{m}$) und Membran-dicke ($d = 3 \text{ nm}$) ein, so erhält man für eine kugelförmige Zelle eine Anreicherung von $(\text{Volumen})/(\text{Membranvolumen}) = (4/3 r^3\pi)/(4r^2\pi d) \approx 1000$.

Auch kinetische Modellrechnungen zeigen, daß bei einer Folge von konsekutiven Bindungsschritten i ($i=1,2,3\dots$) mit jeweils n_i Bindungsstellen die $j=i+1$ Stufe eine um den Faktor $\Pi n_i / n_j$ geringere Sättigungskonzentration des Liganden aufweist⁴⁹. Nimmt man also an, daß 1000mal mehr Membranbindungsstellen als Rezeptoren existieren und der Rezeptorbindung eine Membranbindung vorgeschaltet ist, so erhält man auch hier eine effektive Sättigungskonzentration, die um einen Faktor 1000 unter der realen Konzentration liegt. Sprechen Messungen also für eine *high affinity/low capacity* Bindung, so muß dies nicht auf einer besonders starken Affinität zwischen Ligand und Rezeptor beruhen, sondern kann auch das Ergebnis einer vorgeschalteten *low affinity/high capacity* Bindung an die Membran sein.

Durch die orientierungsselektive Funktion, die sich durch spezifische elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen postulieren läßt, können membrangebundene Liganden je nach Eintauchtiefe in bestimmte räumliche Anordnungen gebracht werden, so daß diese für die Wechselwirkung mit bestimmten Rezeptoren vororientiert sind (vgl. Enkephaline).

Unter dem konformationsselektiven Effekt versteht man die Induktion einer anderen, an die Verhältnisse im Rezeptor besser angepaßten Konformation, als sie im nativen Zustand vorliegt. Die Grundlage dieser Annahme ist, daß Rezeptortaschen häufig hydrophobe Regionen darstellen, die durch die Lipidmembran durchaus simuliert werden könnten. Unter optimaler

Wechselwirkung mit der Umgebung können so Energien von 1-3 kJ/mol pro Aminosäure freigesetzt werden⁵⁰, so daß auch in Wasser nicht erreichbare, weil energetisch höher liegende, Strukturen populiert werden können.

2.3.2 Weitere Möglichkeiten der Lipidderivatisierung

Neben der hier besonders ausführlich besprochenen Prenylierung stehen der Natur noch eine Reihe anderer posttranslationaler Modifikationen zur

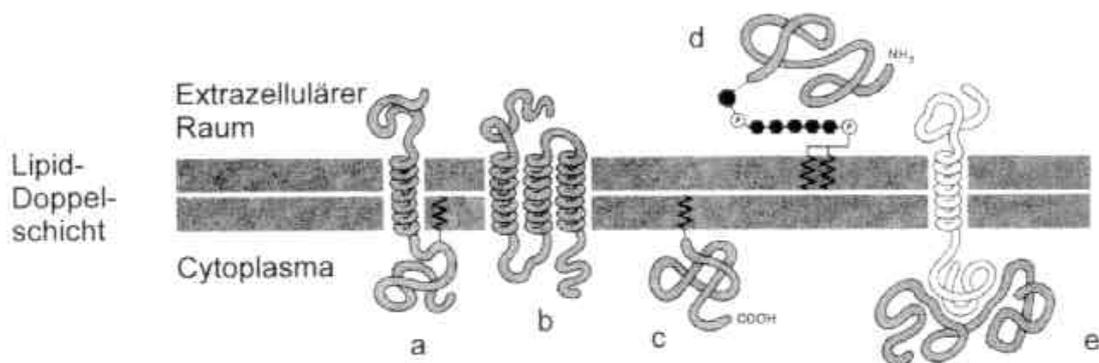


Abbildung 8: Methoden der Membranfixierung von Proteinen: a) einzelne 'singlepass' α -Helix. b) mehrere 'multipass' α -Helices. c) lipidverankertes Protein, hier cytoplasmatisch. d) GPI-verankertes extrazelluläres Protein. e) über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit einem membranständigen Protein fixiertes Protein. Diese Art von Membranproteinen weist keine der sonst üblichen Modifikationen auf.

Verfügung, um Peptiden bzw. Proteinen lipophile Eigenschaften zu verleihen (Abbildung 8). In allen Fällen resultiert daraus eine feste Anbindung an die Zellmembran. Auf diese Weise werden zum Beispiel membranständige Proteine, i. a. Rezeptoren aller Art, in ihrer Position gehalten, um ihrer Funktion nachkommen zu können.

Die Grundlage für die Membranfixierung von Rezeptoren bilden zwar in der Regel lipophile Aminosäuresequenzen (Ala, Val, Phe, Leu, Ile, etc.), die i. a. als Helix die Membran durchdringen, dennoch werden nach Schätzungen 10

bis 50% aller membranständigen Proteine posttranslational lipidmodifiziert, um sie an ihren Bestimmungsort zu dirigieren⁵¹.

Dabei werden besonders bei den Liganden, also Peptiden bis ca. 200 Aminosäuren oder nichtpeptidischen Strukturen, Alkylierungen und Acylierungen am Cystein sowie an N-terminalen Glycinen vorgenommen, während die 'größeren' Rezeptoren hauptsächlich eine oder mehrere transmembrane Domänen oder exklusiv lipophile Glycosylierungen an nicht näher spezifizierten Positionen der Aminosäuresequenz nutzen. Daneben können Proteine noch durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit Ankerproteinen 'indirekt' membranfixiert werden.

Die bislang identifizierten Lipidmodifizierungen lassen sich in vier Gruppen einteilen:

- Modifikation am N-Terminus: N-terminales Glycin wird N-myristoyliert (n-C₁₃H₂₇CO-NH-Gly).
- Modifikation am C-Terminus: Dies sind die durch die CaaX-Box induzierten S-Prenylierungen.
- Interne Acylierung am Cystein, i. d. R. als S-Palmitoyl-Cystein (n-C₁₅H₃₁CO-S-Cys).
- Interne Glykosylierungen mit komplexen Strukturen aus Zuckern, Ethanolamin und Phosphatidylinositol.

Daneben erlangen in der Pharmakologie auch unnatürliche Lipidmodifikationen zunehmend Bedeutung, da durch sie viele sonst nur schlecht resorbierbare Wirkstoffe besser aufgenommen werden, bzw. besser zu ihrem Wirkungsort gelangen können (etwa: Blut-Hirn-Schranke). Eines der ältesten Beispiele hierfür ist die Acetylierung von Salicylsäure, eines der modernsten die Synthese von zyklischen RGD-Sequenzen zur Hemmung der GII-Adhäsion unter zusätzlicher Verwendung unnatürlicher lipophiler Aminosäuren².

2.4 Biochemische Grundlagen rund um die Proteinexpression

Dieses Kapitel soll einige Sachverhalte darstellen, die aus der Sicht eines Mikrobiologen/Genetikers zum Grundwissen zählen, jedoch für andere Berufsgruppen durchaus kurz erläutert werden sollten.

Nicht der gesamte Enzymsatz einer Zelle wird zu jedem Zeitpunkt exprimiert. Die Zellen produzieren nur Enzyme, für deren Vorhandensein eine Notwendigkeit besteht. Beispielsweise werden bestimmte Nährstoffe im Medium durch Oberflächenrezeptoren der Zelle erkannt, die dann über eine Signaltransduktionskaskade mit entsprechenden regulatorischen Proteinen und Promotoren die Produktion der für die Verwertung dieser Nahrung erforderlichen Enzyme einleiten. Eines dieser Systeme reagiert auf Lactose, der dazugehörige Promotor heißt entsprechend Lac-Promotor.

Dieser Promotor wird relativ häufig genutzt, um bestimmte Gene, die (statt der normalerweise dort vorhandenen Lactose-verwertenden Enzyme) unter die Kontrolle dieses Promotors gestellt wurden, zu exprimieren. Die Stimulation erfolgt dabei nicht durch Lactose selbst, sondern durch IPTG (Isopropylthiogalactopyranosid), einen Agonisten, der jedoch im Gegensatz zur Lactose nicht abgebaut wird.

Während es sich beim Lac-Promotor also um einen zelleigenen Promotor handelt, der die nachfolgenden Gene über den 'üblichen' Aktivierungskomplex für die Transskription vorbereitet, beruht der T7-Promotor auf einem wesentlich einfacheren, viralen System des T7 Bakteriophagen. Der T7-Promotor stellt die Erkennungssequenz für die T7-RNA-Polymerase dar, die, nachdem sie an die DNA gebunden hat, ohne Unterstützung zelleigener Proteine hocheffektiv RNA erzeugt, bis sie bei Erreichen des T7-Terminators wieder vom DNA-Strang abfällt. Die Aktivierung des T7-Promotors erfordert somit die Präsenz dieser Polymerase. Dies geschieht klassisch durch Infektion der Bakterien mit dem Bakteriophagen.

Durch die Entwicklung neuer Expressionsstämme hat sich dies jedoch weiter vereinfacht. Expressionsstämme stellen spezielle Laborstämme natürlich vorkommender Zelllinien dar, die sich vom ursprünglichen Organismus zum Teil recht gravierend unterscheiden. Im Falle der *E. coli* Bakterien wurden im Rahmen dieser Arbeit, neben vielen anderen existierenden Laborstämmen, hauptsächlich zwei verwendet. Dies sind DH5 α und BL21. Beiden Stämmen fehlen die Restriktionsendonukleasen der nativen *E. coli*-Stämme. Weiterhin fehlen bei DH5 α alle im Zusammenhang mit DNA-Veränderung stehenden Enzyme. DH5 α eignet sich somit zur sicheren Vermehrung von Plasmid-DNA, ohne z. B. den Einbau der Plasmide in die chromosomale DNA befürchten zu müssen. Im Rahmen dieser Manipulationen vermag der im Hause Kahmann verwendete DH5 α -Stamm auch nicht mehr auf Minimalmedium zu wachsen, die tatsächlichen DNA-Schäden (= Inaktivierung von Enzymen) reichen also teilweise über das beabsichtigte Maß hinaus. BL21 stellt einen Expressionsstamm dar. Hier fehlen viele der zelleigenen Proteasen, so daß sich exprimierte Proteine in der Zelle anreichern können, ohne abgebaut zu werden. Dafür jedoch verfügen BL21-Zellen über einen intakten Apparat zum Plasmidaufbau und -abbau, Plasmide sind in diesen Zellen also nur unter striktem Selektionsdruck und auch dann nur kurzfristig stabil. Eine Variante dieses Stammes, BL21 (DE3), hat inzwischen mehr Bedeutung als BL21 selbst. Hier ist in der chromosomalen DNA des Bakteriums das Lac-induzierbare Gen der T7-RNA-Polymerase verankert. Somit können in diesem Stamm die sehr starken T7-Promotoren durch IPTG-Induktion aktiviert werden.

3 Der b-Lokus von *Ustilago maydis*:

Expression und Reinigung der b-Proteine

3.1 Vorarbeiten

Am Institut für Mikrobiologie und Genetik der LMU München unter Frau Prof. Regine Kahmann wurden die b-Loki von *Ustilago maydis* sequenziert und charakterisiert. Einige der bE und bW-Gene wurden über c-DNA isoliert und kloniert. Im Rahmen der Arbeiten, die die bE/bW Interaktion untersuchten, wurden Vektoren hergestellt, die nurmehr die für diese Interaktion relevanten N-Termini enthielten.

Theoretische Untersuchungen und Sequenzanalysen für diese sehr leucinreichen Proteine (ca. 15% Leu) ergaben, daß sie alphahelikel vorliegen sollten, was Interaktionen auf der Basis von Leucin-*zippern* (Leucinreißverschlüssen) wahrscheinlich macht. Allerdings konnten derartige potentielle *zipper* nicht identifiziert, geschweige denn eine (sinnvolle) Strukturvorhersage gemacht werden. Gemäß den Strukturvorhersagen interagieren diese Proteine nicht miteinander (AK-Kahmann interna - nicht publiziert). Somit stellen diese N-Termini ein hochinteressantes Objekt für Strukturuntersuchungen dar.

Ziel war es nun, diese Proteine für die NMR-Strukturuntersuchung zur Verfügung zu stellen. Im Rahmen einer Praktikumsarbeit wurden auch erste Versuche in diese Richtung unternommen, deren Ergebnisse vielversprechend erschienen.

3.2 Eigene Vorarbeiten

Bei den vorangegangenen Untersuchungen zur bE/bW Interaktion wurden zwei verschiedene bEast-Fragmente von verschiedenen Allelen verwendet,

diesem System erfolgt die Reinigung dadurch, daß das Protein unter einem Lac-Promotor als Fusionskonstrukt mit einer Inteinsequenz und einer Chitin-Bindedomäne exprimiert wird. Nach Anbindung des Fusionskonstruktes an eine Chitinsäule kann durch Zusatz von Thiol die durch die Inteinsequenz induzierte Abspaltung des Zielpeptides aktiviert werden, so daß man anschließend nur dieses Protein in reiner Form von der Säule eluieren kann, während das 55 kDa große *tag* auf der Säule gebunden bleibt (Abbildung 10).

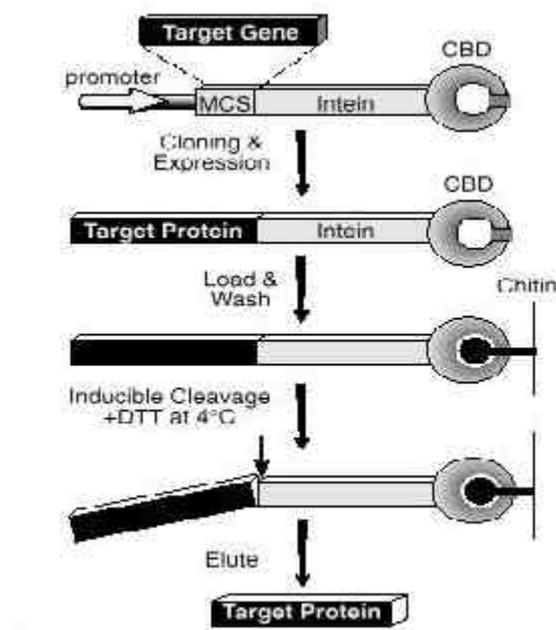
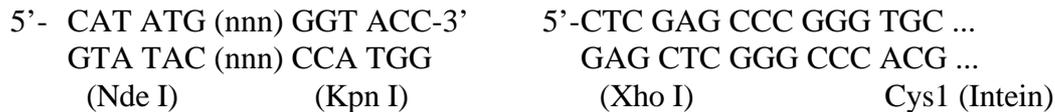


Abbildung 10: Proteinreinigung mit dem IMPACT-System. Das Zielprotein wird als Fusionskonstrukt exprimiert an eine Chitinsäule gebunden. Durch eine Inteinspaltung wird das Protein anschließend vom Linker getrennt und kann isoliert werden.

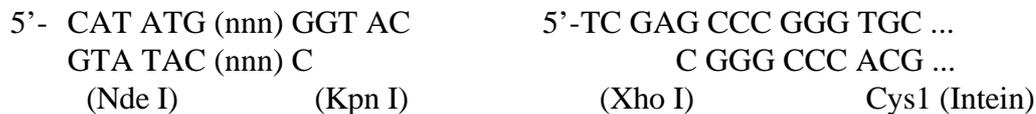
Die Klonierung der Vektoren erfolgte durch Ausschneiden der vier Zielsequenzen aus den pET-Vektoren und Ligation in den geöffneten IMPACT-Vector. Der Übergang zwischen dem 3'-Ende der b-Proteinfragmente und der Inteinsequenz des Vektors wurde dabei durch einen 'fill in'- bzw. 'fill up'-Prozeß in den selben Leserahmen gebracht, während am 5'-Ende alle Proteine über eine *Nde I site* verfügten (Abbildung 11, Abbildung 12).



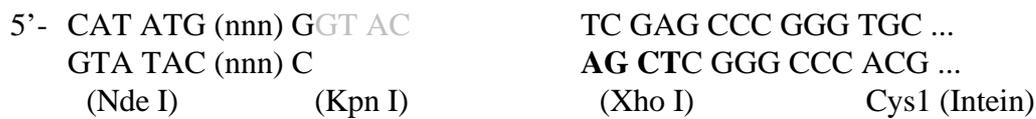
Abbildung 11: Der Polylinker des Impact-Vektors (pCYB4). Die Insertation der Zielsequenzen erfolgte unter Benutzung der Nde I und der Xho I sites.



Restriktionsverdau mit Kpn I / Xho I



Fill in / Fill up



Ligation



Abbildung 12: Schematische Darstellung zur Klonierung der Vektoren. (nnn) repräsentiert die Triplets der Protein-DNA. Die inkompatiblen Enzymsites wurden durch *fill in / fill up* in *blunt*-Enden umgewandelt, welche eine *in-frame*-Ligation erlauben.

Bei der Durchführung dieser geplanten Klonierungen zeigte sich, daß *der fill in / fill up*-Prozess und die folgende *blunt*-Ligation erhebliche Probleme bereiteten (nachdem dieselben Schritte später in anderem Zusammenhang reibungslos abliefen, dürfte wohl ein zu diesem Zeitpunkt verwendetes Enzymen oder Puffer nicht in Ordnung gewesen sein). Wesentlich schwerwiegender war allerdings, daß diese unwegsame Route Konstrukte ergab, die am Zielprotein vier Aminosäuren Artefakte hinterließen. Aus diesem Grund wurde noch ein zweiter Weg eingeschlagen, um die Zielproteine in den IMPACT-Vektor zu klonieren. Dabei wurden die DNA-

Sequenzen der Zielproteine per PCR mit einem neuen Linker versehen, der es erlaubte, die Sma I-site im Impact Vektor zu verwenden. Jedoch wurde nicht Sma I verwendet (dieses Enzym liefert *blunt*-Enden), sondern dessen Isoschizomer Xma I, das einen vier Basen langen 5'-Überhang erzeugt (Xma I G|GG CCC). Somit konnten die Protein-Sequenzen mit zwei verschiedenen *sticky-ends* (Nde I und Xma I) erhalten werden, eine für die Ligation sehr günstige Situation. Bei genauer Betrachtung der Sequenzen von E2₉₇ und W2₁₁₆ fiel auf, daß diese auf GCC bzw. TCC enden. Diese beiden Tripletts können durch palindromische Ergänzung zu Erkennungstellen für zwei Enzyme erweitert werden (Ngo M I: G|CC GGC, Bsp E I: T|CC GGA), die beide ebenfalls einen vier Basen langen 5'-Überhang erzeugen und somit mit Xma I kompatible *sticky-ends* erzeugen. Somit konnten diese beiden Gene mit nur einer Aminosäure Artefakt in den Vektor kloniert werden, bei E1₉₈ und W2₁₃₁ waren es zwei.

Theoretisch wäre es auch möglich gewesen, mit nur geringfügig höherem Aufwand völlig ohne Artefakte zu klonieren. Da jedoch der Erfolg der Intein-spaltung ganz erheblich von der dem Cystein vorangehenden Aminosäure abhängt, und das sich hier ergebende Glycin sehr günstig für diesen Prozess ist, wurde wie beschrieben verfahren. Alle vier Vektoren ließen sich auf Anhieb klonieren.

Die resultierenden Fusionsproteine haben Massen von 66 kDa (E1 und E2), 68 kDa (W2₁₁₆) und 69 kDa (W2₁₃₁) und erscheinen in den zur Auflösung der kleinen Zielproteine hochprozentig gewählten Gelen als größenmäßig nur schwer zu unterscheidende Banden. Als Marker wurde der 'broad range' Marker von NEB verwendet, dieser enthält zwei Banden höherer Intensität bei 66 kDa und 26,6 kDa, zwischen denen sich noch drei weitere Bezugsbanden befinden. Dieses recht charakteristische Muster erlaubt in allen Fällen ein schnelles Auffinden der Fusionskonstrukt-banden (Abbildung 13).

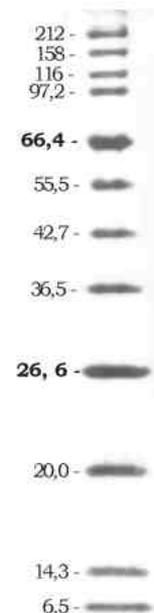


Abbildung 13: Proteingrößen (in kDa) im Broadrange Proteinmaker von NEB.

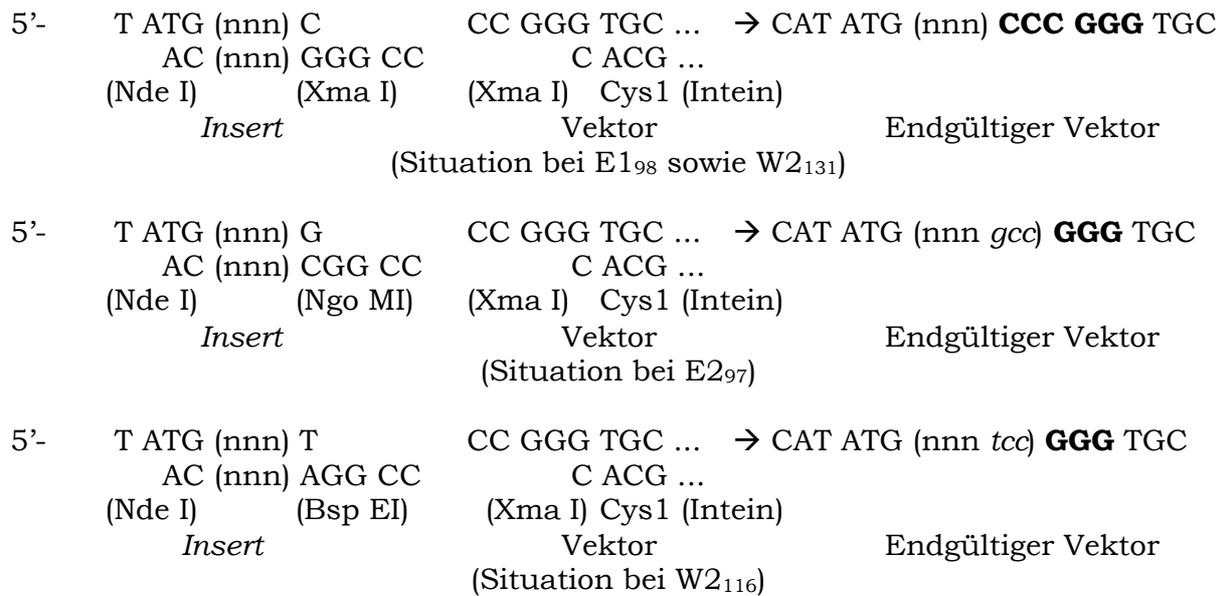


Abbildung 14: Schematische Darstellung zur Klonierung der Protein-DNA-Sequenzen in den IMPACT-Vektor. Dabei repräsentiert (nnn) die Triplets der Proteingene. Die palindromische Ergänzung reduziert die Artefakte auf ein Triplett, kann jedoch nur in zwei der vier Fälle angewandt werden, bei denen enzymatisch zu Xma I kompatible Überhänge erzeugt werden können.

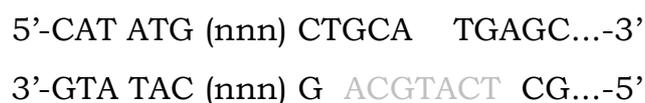
Zur Untersuchung des Expressionsverhaltens der Proteine wurden diese Vektoren in einen Expressionsstamm (BL 21) transformiert, in M9 Minimalmedium bis zu einer optischen Dichte $OD_{600} = 0.5$ herangezogen, mit 1mM IPTG induziert und bei verschiedenen Temperaturen und Expressionszeiten inkubiert. Es zeigte sich, daß die jeweiligen Zielproteine nur in Spuren in den Zellen vorhanden waren. Diese Proteine konnten zwar mit der Chitinsäule für analytische Zwecke praktisch bis zur Homogenität angereichert werden, jedoch waren mit dieser Proteinmenge alle Versuche, eine für die NMR-Untersuchung ausreichende Menge zu erhalten, von vornherein illusorisch. Weiterhin konnte nach der Inteinspaltung das Zielprotein nicht im Eluat nachgewiesen werden.

Primär mußte also die Expression der Zielproteine gesteigert werden, alleine schon um genügend Material zur Erprobung der weiteren Schritte zu erhalten.

3.4 T7-Promotor für die IMPACT-Vektoren

Da die Reinigung der Fusionsproteine über die Chitinsäule sehr gut funktionierte, galt es nun, die vorhandenen Fusionskonstrukte in drastisch stärkerem Maße zu exprimieren. Für diesen Zweck erschien der T7-Promotor in Kombination mit dem BL21(DE3)-Expressionsstamm das Mittel der Wahl. Als Vektor wurde der bereits vorhandene pET22b (+) verwendet, der alle für das T7-System erforderlichen Elemente enthält.

In diesen Vektor mußte nun das gesamte im IMPACT-Vektor aufgebaute Fusionskonstrukt eingebracht werden. Am 5'-Ende der DNA-Sequenz verfügten beide Vektoren über die Nde I *site*, doch am 3'-Ende gab es leider keinerlei Gemeinsamkeiten. Auch das Einführen von neuen Enzym-*sites* per PCR wäre bei einem derartig langen DNA-Abschnitt sehr schwierig gewesen. Somit mußte auf die in den Vektoren vorhandenen *sites* zurückgegriffen werden. Im pEt-Vektor besteht eine Bpu 1102 I *site* (GC|TNAGC; dieses Enzym ist heute nicht mehr auf dem Markt, es wird durch Bln I ersetzt) und im IMPACT-Vektor folgt dem Translations-Stop TGA des Fusionskonstruktes eine Pst I-*site* (CTGCA|G). Somit liegen nach einem entsprechenden Verdau folgende Überhänge an den DNA-Strängen vor (schematisch):



Im *Antisense*-Strang fehlen sieben Nukleotide. Die Ligation des *Inserts* in den pEt-Vektor gelang durch Zusatz dieses synthetisch hergestellten Heptamers (5'-TCATGCA-3') in einer Dreikomponentenligation.

Expressionsversuche mit diesen Vektoren lieferten Zellen mit einem hohen Anteil an Gesamtprotein (ca. 30 %). Bei der Aufreinigung wurden aber schnell zwei Probleme erkennbar.

Die Proteine sind nur zu einem geringen Teil löslich. Der relative Anteil des löslichen Proteins hängt vom Zielprotein und von der Expressionstemperatur

ab. Wird die Expression bei 18 °C durchgeführt, so lässt sich das E1₉₈-Fusionskonstrukt durch Zusatz von Detergenzien, besonders Zwittergent 3-14, solubilisieren (Abbildung 15), ebenso kann W2₁₁₆ zu einem gewissen Anteil noch solubilisiert werden. Doch die beiden anderen Fusionskonstrukte sind völlig unlöslich (Abbildung 16). Selbiges gilt in allen Fällen, wenn die Expression bei 37 °C durchgeführt wird. Unlösliche Proteine ließen sich auch durch 25 % Essigsäure⁵⁴, pH *shifts*, oder Verwendung von TFE-Wasser⁵⁵ als Lösungsmittel, nicht solubilisieren.

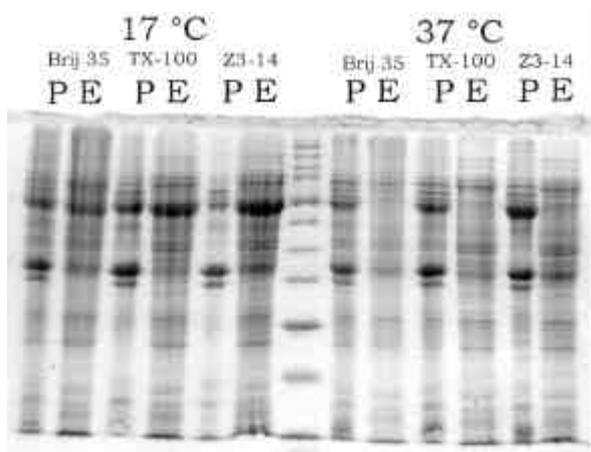


Abbildung 15: Expressions- und Solubilisierungsversuche mit E1. Abgebildet sind nur die (repräsentativen) SDS-PAGEs von E1 und E2 [Pellet (unlöslich), Extrakt (löslich)].

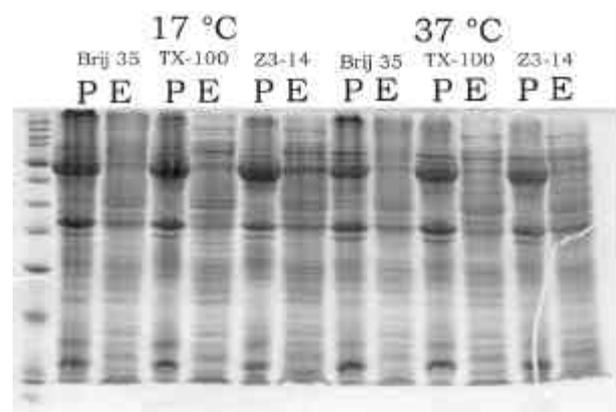


Abbildung 16: Expressions- und Solubilisierungsversuche mit E2. Das Fusionsprotein ist immer unlöslich [Pellet (unlöslich), Extrakt (löslich)].

Nach der Abspaltung vom Linker lässt sich kein Zielprotein von der Säule eluieren. Zum einen lief die Abspaltung an sich auch nach 48 h oder erhöhter Temperatur nicht vollständig, sondern maximal zu 80 %, was allerdings immer zu einer gewissen Zersetzung der Proteine führte (breite, ‚verschmierte‘ Banden). Zum anderen konnte das tatsächlich abgespaltene Protein nicht eluiert werden, erst beim *strippen* der Säule konnten geringe Mengen des eigentlichen Zielproteins (in der Abbildung E1: 11 kDa) neben dem Linker (55 kDa) und intaktem Fusionsprotein (66 kDa) nachgewiesen werden. Zusatz von Detergenzien (Brij 35, Triton X-100, Zwittergent 3-14)

zum Eluationspuffer erlaubte immerhin die Eluation von stark verdünnten Lösungen des Zielproteins, doch auch hierbei verbleibt die Hauptmenge des Zielproteins auf der Säule (Abbildung 17).

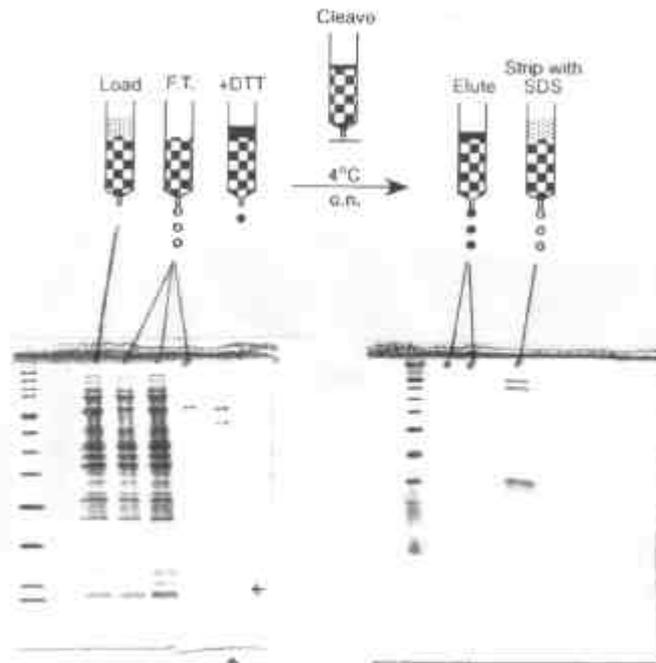


Abbildung 17: Reinigung der Proteine, hier E1. Nur das Fusionsprotein bindet an die Chitinsäule, jedoch lässt sich nach der Spaltung kein Zielprotein eluieren. Erst beim *strippen* der Säule wird es neben dem Intein-*tag* und unverändertem Fusionskonstrukt eluiert. Die 'Doppelbande' der letzten Spur besteht aus dem Fusionsprotein (66 kDa) und dem Intein-*tag* (55 kDa), ganz unten erscheint E1 (11 kDa).

3.4.1 Verbesserung der Inteinspaltung

Unabhängig von den anderen Schwierigkeiten mit den b-Proteinen gelang es, die zu langsam ablaufende Spaltung des Fusionsproteins ganz erheblich zu verbessern. Den Ansatz dazu lieferte der Mechanismus dieser Reaktion. Hierbei wird der durch einen N \rightarrow S Acylschieft am Cystein(1) des Inteins gebildete Thioester durch Zusatz von Thiol (oder ggf. anderen Nukleophilen) gespalten. Beide Teilschritte sind aus der Sicht des organischen Chemikers nukleophile Substitutionen (Acylübertragungen). Derartige Reaktionen werden klassisch durch DMAP (4-Dimethylaminopyridin)⁵⁶ katalysiert. Und tatsächlich verläuft auch die Inteinspaltung bei Zusatz von 1mM DMAP zum normalen Spaltungspuffer wesentlich schneller und mit deutlich weniger Proteindegradation (Abbildung 18).

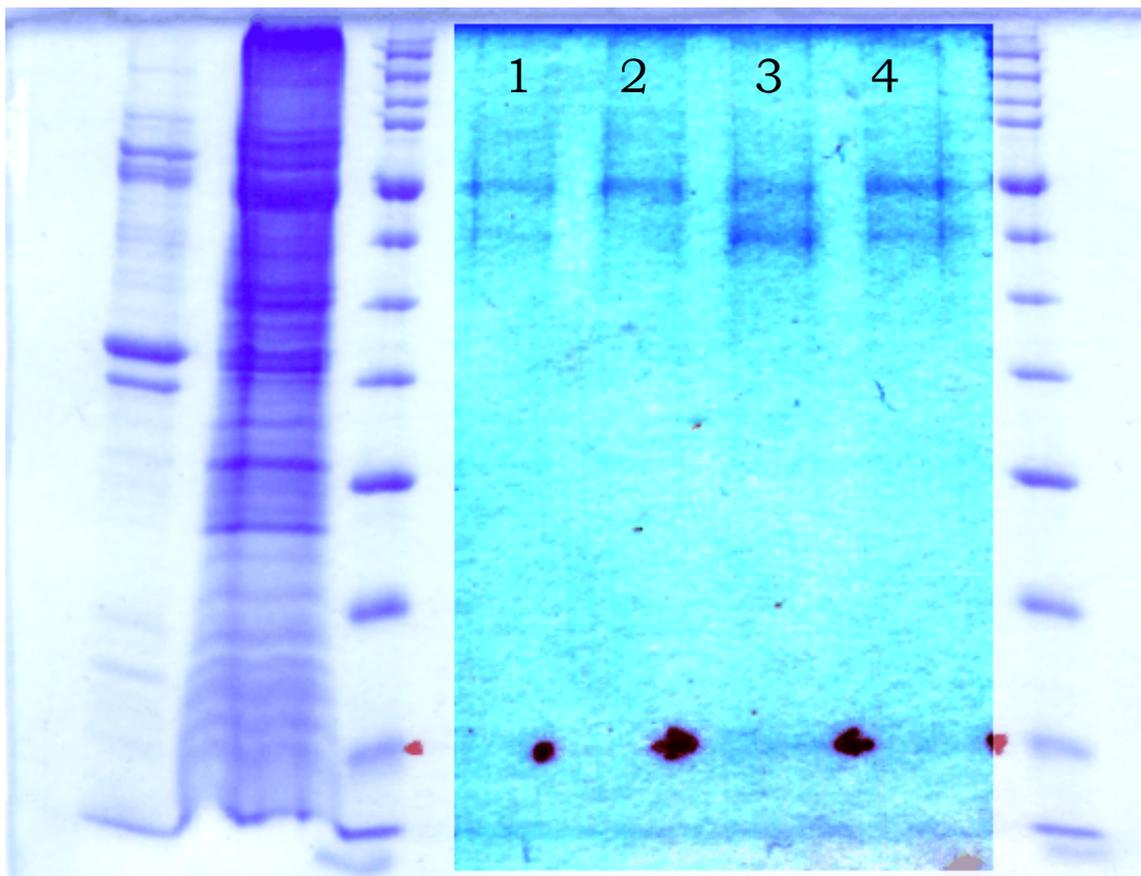


Abbildung 18: Katalytisch unterstützte Inteinspaltung: 1) 50 mM Mercaptoethanol, 2) 1 mM DMAP, 3) 50 mM Mercaptoethanol + 1 mM DMAP, 4) 50 mM Mercaptoethanol + 10 % Octylglycosid (Detergenz). Spur 3 zeigt im Gegensatz zu allen anderen eine deutlich bessere Spaltung. Zur Hervorhebung wurde bei den relevanten Spuren der Kontrast verstärkt.

3.5 Simultane Co-Expression des Fusionsproteins mit *Chaperones*

In der Literatur wurde Co-Überexpression mit *Chaperones*, zelleigenen Faltungshelferproteinen, mehrfach erfolgreich eingesetzt^{57,58}, um wegen Fehlfaltung unlösliche Proteine zu solubilisieren. Um abzuklären, ob unsere Proteine auf Grund von Fehlfaltung oder Lipophilie unlöslich sind, wurden sie zusammen mit zwei verschiedenen Familien von *Chaperones* co-exprimiert. Diese Familien sind Gro ELS (bestehend aus Gro EL mit 56 kDa und Gro ES mit 14 kDa) und Dna J/K (Dna K mit 66 kDa, Dna J mit 36 kDa und Grp E mit 25 kDa).

Für die Co-Expression wurden die BL21 (DE3)-Zellen simultan mit beiden Plasmiden, die orthogonale Immunitäten tragen, transformiert, und in einem Medium mit zwei Antibiotika kultiviert. Die weitere Verfahrensweise erfolgte wie oben, d. h. Expression bei verschiedenen Temperaturen und verschiedene Detergenzien im Lysispuffer.

Auch die Ergebnisse unterschieden sich in keiner Weise von den vorherigen. Zu den Proteinbanden sind lediglich die der – löslichen - Chaperonins hinzugekommen. Da die Zellen neben dem Fusionsprotein zusätzlich die Chaperonins exprimieren müssen, liegt die Ausbeute an Fusionsprotein etwas unter dem Wert, der bei einer Einzelexpression erhalten wird. Beispielhaft sind im folgenden nur die SDS-PAGES⁵⁹ für das E2-Fusionskonstrukt abgebildet (Abbildung 19, Abbildung 20).

Die Bande bei 66 kDa im Extrakt stellt dabei kein lösliches Zielprotein dar, sondern es handelt sich dabei um Dna K. Die auf den ersten Blick nicht triviale Unterscheidung dieser zum Fusionskonstrukt fast identischen Bande gelingt nur über die Chitinsäule - hier bleibt keinerlei Protein aus dem Extrakt haften. Dies zeigt, daß auch die Co-Expression mit Chaperonins die Proteine nicht solubilisieren kann. Somit ist deren Unlöslichkeit nicht auf Fehlfaltung zurückzuführen, sondern auf hohe Lipophilie.

Diese Schlußfolgerung macht es auch illusorisch, die Zielproteine, die noch wesentlich schlechter löslich sind als die Fusionskonstrukte, auf diesem Wege in Lösung zu bringen. Somit wurden die Versuche mit den

Fusionskonstrukten beendet. Für die weiteren Versuche wurde wieder auf Proteine mit His-tag zurückgegriffen, da dieses tag auch eine Reinigung völlig denaturierter Proteine zulässt, die dann mittels *detergent mediated refolding* renaturiert werden können.

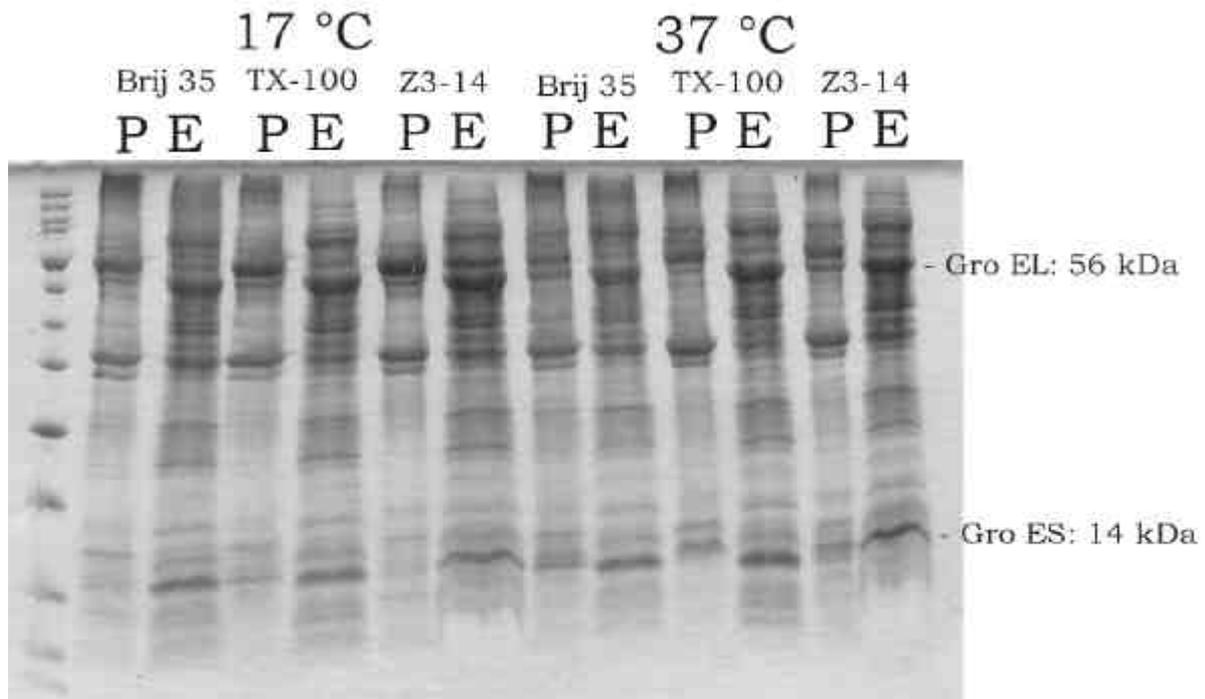


Abbildung 19: Simultane Co-Expression des E2-Fusionskonstruktes mit Gro ELS kann jenes nicht solubilisieren. Bei dem kräftig exprimierten, löslichen 97 kDa-Protein handelt es sich um die T7-RNA Polymerase.

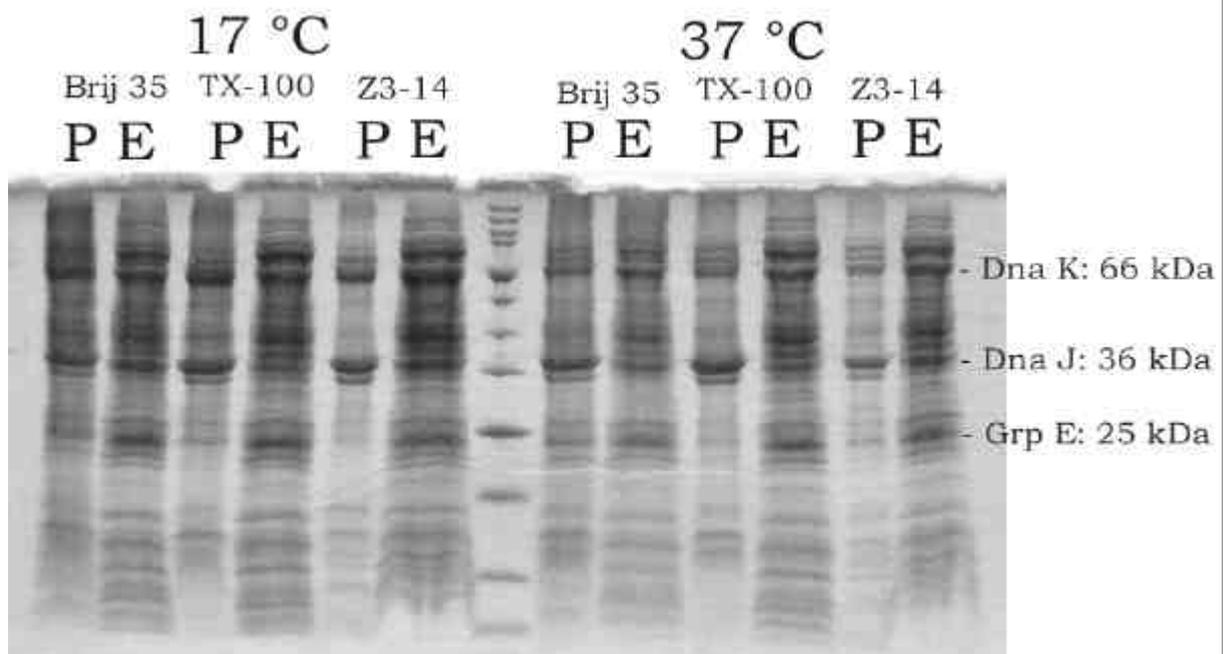


Abbildung 20: Simultane Co-Expression des E2-Fusionsproteins mit Dna J/K. Dna K täuscht lösliches Fusionsprotein vor, da es die gleich Grösse wie dieses besitzt. Bei 97 kDa erscheint auch hier die lösliche T7-RNA Polymerase.

3.6 Solubilisierung der Proteine durch *detergent mediated refolding*^{60,61,62}

Zur Expression der Zielproteine mit His-tag wurde auf die ursprünglichen pET 22 b(+) Vektoren zurückgegriffen. Die Klonierungsartefakte wurden durch Verdau mit Kpn I (G|GT ACC) und Xho I (C|TC GAG) ausgeschnitten, die Strang-Enden durch *Fill in / Fill up* in *blunt*-Enden überführt und anschließend ligiert. Die Expression erfolgte bei 37 °C, die Proteine wurden als die *Inclusion Bodies* isoliert, mit 7.5 molarer Guanidinium-Hydrochloridlösung denaturiert⁶³ (geringere Konzentrationen oder Harnstoff waren unwirksam), über die Nickel-Sepharosesäulen gereinigt und durch Vermischen mit demselben Volumen 10 %-iger Detergenzlösung renaturiert⁶⁴. Die endgültige Reinigung erfolgte über GPC. War die Renaturierung erfolgreich, so erschien das Protein in einem seiner Masse + Micellenmasse entsprechenden Peak^{65,66}, gefolgt vom grossen Peak der leeren Micellen. Schlug die Renaturierung fehl, so erschienen die dann vorliegenden Proteinkonglomerate als 'Vorlaufpeak'.

Die eigenen Experimente ergaben, daß sich E1 mit Detergenzien mit einem Alkylrest von 14 oder mehr Kohlenstoffatomen (Z 3-14, Z 3-16) renaturieren und solubilisieren läßt, während W2₁₃₁ 16 Kohlenstoffatome (Z 3-16) benötigt. Die beiden anderen Proteine ließen sich nicht solubilisieren, da keine Detergenzien mit längeren Alkylresten als C₁₆ kommerziell erhältlich sind (Brij 78 besitzt zwar einen C₁₈-Rest, jedoch bildet es Micellen von 100 kDa, was oberhalb des Ausschlußvolumens der GPC-Säule lag und somit nicht analysierbar gewesen wäre). Diese Beobachtung, daß die Renaturierung durch Detergenzien mit zunehmender Kettenlänge begünstigt wird, deckt sich mit den Beobachtungen von S. TANDON und P. M. HOROWITZ⁶⁷-und steht scheinbar in Widerspruch zu J. STÖCKEL⁶⁸, der genau das Gegenteil beobachtete.

Dieser *scheinbare* Widerspruch führte zur Entwicklung eines Modells zur Protein-Detergenzien-Interaktion. Zwischen diesen beiden Komponenten können drei Arten von Interaktionen auftreten:

- Protein-Protein (pp): Diese *unselektive* Proteinaggregation hängt von der Lipophilie der Proteine (bzw. deren Oberflächen) ab.
- Detergenz-Detergenz (dd): Diese Interaktionen führen zur Micellenbildung, ihre Stärke ist abhängig von der Lipophilie (=Kettenlänge) des Alkylrestes.
- Protein-Detergenz (pd): Taucht das Protein in die Micelle ein, so wird dessen lipophile Oberfläche durch die Detergenzmoleküle maskiert, was allerdings die dd-Interaktionen in der proteinhaltigen Micelle reduziert.

Lipophilie des
Proteins (pp)

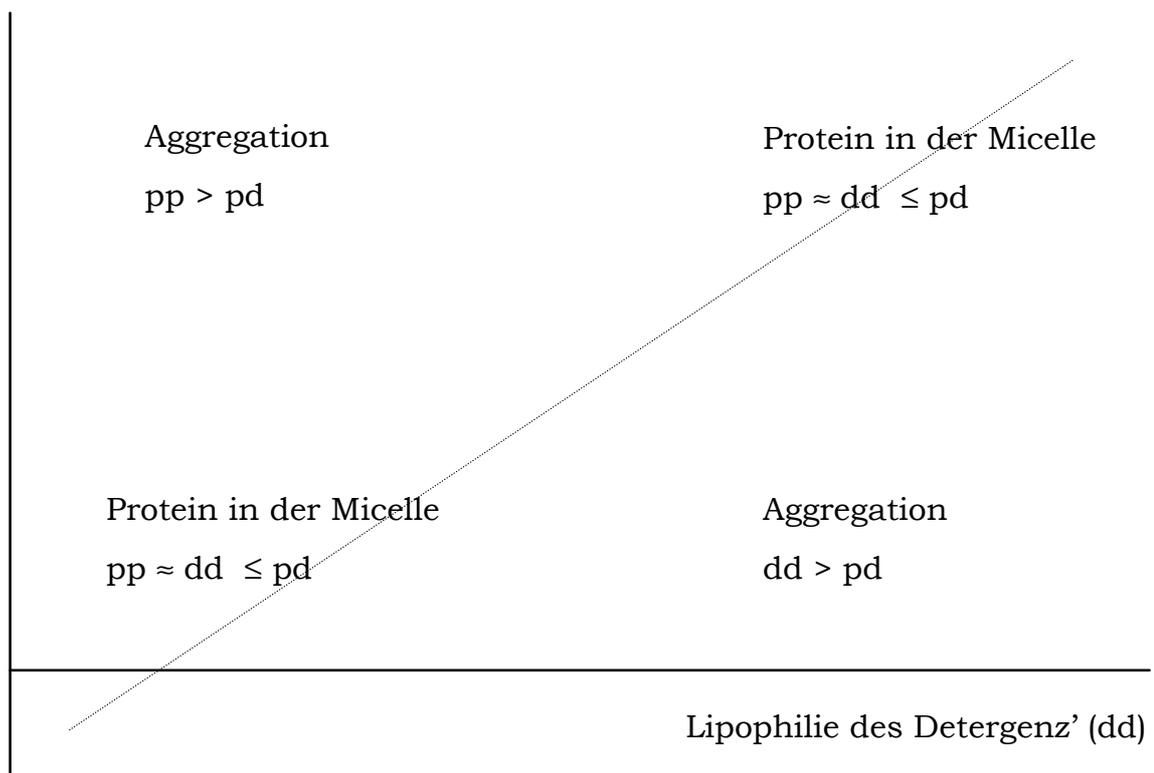


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Protein-Detergenz-Interaktion. Nur wenn Protein und Detergenz kompatibel sind, gelingt die Solubilisierung.

Somit ergeben sich drei Möglichkeiten (Abbildung 21):

- Überwiegen bei sehr lipophilen Proteinen die pp-Interaktionen, so aggregiert das Protein trotz Gegenwart von Detergenzien.
- Wenig lipophile Proteine werden durch starke dd-Interaktionen am Eintreten in die Micellen gehindert.
- Haben alle drei Interaktionen etwa dieselbe Stärke, so kann das Protein problemlos in die Micellen eintreten, dort falten und wird durch Unterbindung unselektiver pp-Interaktionen in Lösung gehalten.

Somit gestaltet sich die Solubilisierung eines 'neuen' Proteins einfacher, wenn man eine Serie von Detergenzien mit verschiedenen langen Alkylresten durcharbeitet, und erst, wenn die richtige Länge gefunden ist, sich dem Einfluß der Kopfgruppen widmet, was besonders bei Membranproteinen durchaus erheblichen Einfluß haben kann. Je nach Lipophilie des Proteins kann sich eine Situation wie bei S. TANDON oder J. STÖCKEL ergeben. Ebenso gibt es Proteine, die von Detergenzien mit mittleren Kettenlängen solubilisiert werden können, nicht jedoch von solchen mit längeren oder kürzeren⁶⁹. In allen Fällen macht sich die zunehmende Entfernung von der 'Ideallinie' durch eine immer höhere Mindestkonzentration von Detergenzien bemerkbar, denn durch Konzentrationserhöhung kann in gewissem Rahmen durch das Massenwirkungsgesetz noch eine Micellenbindung erzwungen werden. Diese Theorie deckt sich auch mit den Beobachtungen, die bei Renaturierungen mit Polyethylenglycol gemacht wurden, und zeigten, daß für lipophilere Proteine höhere Konzentrationen dieses Stoffes benötigt werden, oder aber Polyethylenglycole höherer Molmasse in geringeren Konzentrationen⁷⁰.

Die erfolgreich solubilisierten E1 und W2₁₃₁ Proteine wurden auf ihre Identität und vor allem auf ihre Aktivität (bE/bW-Interaktion) überprüft. Dazu wurden die DNA-Sequenzen dieser beiden Proteine in den pET 3a Vektor kloniert. Dieser entspricht in den für die Expression relevanten Eigenschaften dem pET 22b (+) Vektor, besitzt jedoch kein His-*tag*. Die ungetaggtten Proteine wurden wie ihre His-*tag*-Analoge solubilisiert, natürlich ohne den Reinigungsschritt über die Nickelsepharose. Dies ergab zwar keine homogen reinen, aber für die Interaktionskontrolle brauchbare Proteinlösungen.

Für die Interaktionskontrolle wurden nun die komplementären Proteine jeweils mit und ohne His-*tag* exprimiert und das getaggte Protein nach der üblichen Reinigung wieder an die Nickelsepharose gebunden. Anschließend wurde jeweils das ungetaggte Komplement auf die Säulen gegeben. Nach gründlichem Waschen wurden die an die Säule gebundenen Proteine eluiert und analysiert. Es zeigte sich, daß die ungetaggtten Proteine nur dann nachzuweisen waren, wenn zuvor ihr Partner an die Säule gebunden war. Somit kann es als gesichert gelten, daß auch hier trotz der 'Verkapselung' der Proteine in Micellen selektive Protein-Interaktionen stattfinden^{71,72} und zudem die Proteine korrekt renaturiert wurden.

Lösungen des so erhaltenen E1-Proteins wurden per CD-Spektroskopie weiter analysiert, das α -helikale Protein denaturiert reversibel zwischen 85 und 90 °C. Da die Lösungen viel Detergenz enthalten, das seinerseits um 200 nm breit und stark absorbiert, waren die CD-Messungen nicht von bester Qualität und konnten nicht exakt quantifiziert werden. Dennoch bestätigen sie die vorhergesagte α -helicale Struktur des Proteins.

W2₁₃₁ erwies sich als etwas problematischer. Zuerst zeigte sich, daß das Protein ein Gemisch aus zwei Banden darstellte. Diese Erscheinung kam durch fehlerhafte Erkennung eines zweiten, im Inneren der Proteinsequenz vorkommenden ATG (bzw. AUG)-Kodons als 'Start' (zur Ursache dieser Fehlinterpretation später mehr), was zu einem um etwa 2 kDa kürzeren Protein führte. Beide Varianten hatten jedoch dieselben Interaktionseigenschaften, so daß W2₁₃₁ immer als charakteristische

Doppelbande auftrat. Zweitens hatte der Komplex aus W₂₁₃₁ und Micelle eine Masse von 65 kDa. Dies kann nur durch das Vorliegen von W₂₁₃₁ als Dimer erklärt werden. Als Ursache für diese Homointeraktion kommt nur die hier teilweise vorhandene Homöodomäne in Frage, da E1 diese Eigenschaft nicht zeigt. Weiterhin sind die Lösungen beider Proteine empfindlich gegenüber Luftsauerstoff. Durch Oxidation von Cysteinen entstehen zunächst Oligomere und letztlich aggregiert das Protein.

Zur Durchführung der NMR-Untersuchungen wurden wegen der uneinheitlichen Eigenschaften von W₂₁₃₁ nur Lösungen von E1 benutzt. Diese NMR-Untersuchungen ergaben leider, daß die Protein-Micellenkomplexe mit 46 kDa zu groß sind, um meßbare Signale zu ergeben. Dabei dürfte neben der Größe der Micellen auch die Viskosität der Lösung eine Rolle spielen, die durch den Anteil an überschüssigem Detergenz recht hoch ist (auf 4 Micellen kommt nur ein E1-Protein). Dieser Überschuß kommt durch die schlechte Trennung voller (46 kDa) und leerer (35 kDa) Micellen zustande. Deren Molmassen unterscheiden sich zu wenig, um den Protein-Micellen-Peak von demjenigen des riesigen Überschusses an Detergenz völlig abzutrennen.

Es ergaben sich zwei mögliche Ansätze, dieses Problem zu lösen:

1. Synthese von Detergenzien, die bei gegebener Lipophilie kleinere Micellen formen.
2. Molekularbiologische Lösungen

Zuerst wurde mit den synthetischen Arbeiten begonnen (siehe Teil 4), bis sich schließlich in der Literatur ein erfolgversprechender Lösungsansatz fand.

3.7 Co-Expression der b-Proteine als bE/bW-Heterokomplexe

Vor wenigen Jahren tauchte in der Literatur ein neues Verfahren zur Co-Expression von Proteinen auf⁷³. Bei dieser Methode werden die für sich schlecht löslichen Komponenten von Heterokomplexen simultan in einer Zelle exprimiert und damit durch *in situ*-Komplexierung der lipophilen Oberflächen durch das optimal passende Templat - den natürlichen Interaktionspartner - maskiert. Ähnliches war zuvor im Hause Kahmann versucht worden, allerdings waren die Proteine mit zwei verschiedenen Vektoren in derselben Zelle exprimiert worden – und unlöslich gewesen. Die eigentliche Neuerung des Literaturverfahrens besteht darin, die Proteine von demselben Vektor über dieselbe m-RNA zu exprimieren.

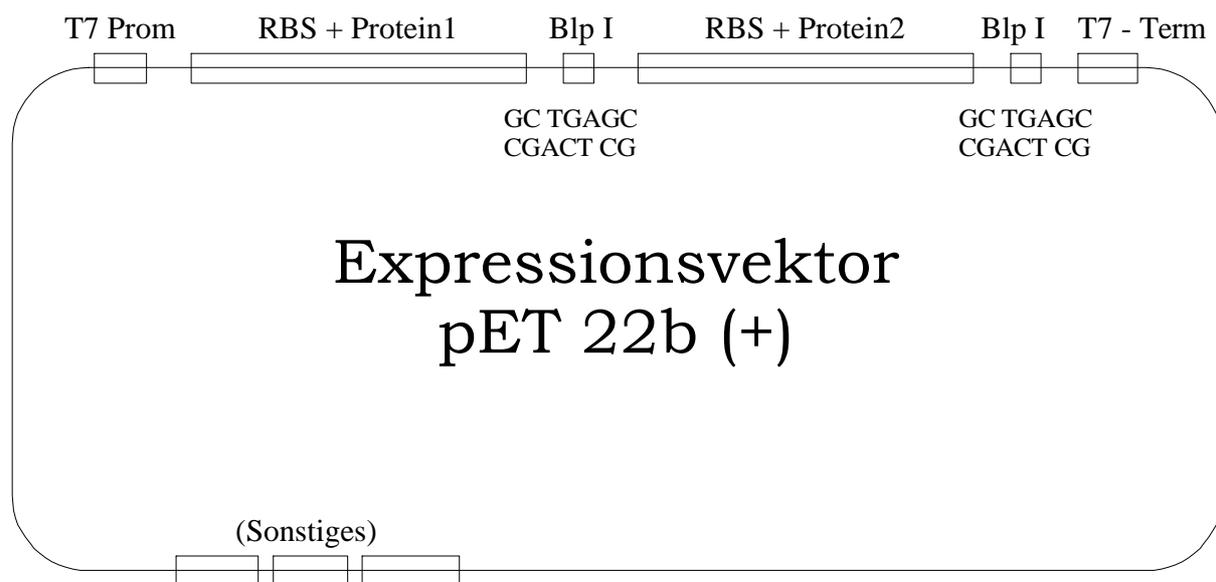


Abbildung 22: Vektor für die simultane Co-Expression. Dieser Vektor transkribiert beide Proteingene in dieselbe m-RNA. Die Klonierung erfolgte hier über die Blp I-sites, die durch das zentrale GC-Paar das eingefügte zweite Gen in der richtigen Richtung orientiert.

Zur Klonierung der neuen Vektoren wurden die zuletzt verwendeten, verkürzten pET 22b (+) Vektoren verwendet. Diese Vektoren weisen zwischen dem Translationsstop und dem T7-Terminator eine Bpu 1102 I-site auf (= Blp I, GC|TNAGC). Neben der exakt richtigen Lage hat dieses Enzym noch den großen Vorteil einer unterbrochenen palindromischen

Erkennungssequenz. Somit kann das in der Mitte des drei Nukleotide langen 5'-Überhangs liegende, 'freie' Nukleotid als Steuersignal benutzt werden, um auch, und gerade bei zwei identischen *sites* eine Insertation in nur einer Richtung zuzulassen. Somit wurden per PCR alle vier Proteinsequenzen samt RBS (*ribosome binding site*, Shine Delgarno-Sequenz) am 5'-Ende mit einer Bsp I-*site* identisch zu der am 3'-Ende versehen. Die *site* am 3'-Ende wurde durch Verwendung des Standard-T7-Terminatorprimers übernommen. Aus diesen PCR-Produkten konnten alle Protein-*inserts* entnommen und in die Bsp I *site* der bestehenden Vektoren eingeführt werden (Abbildung 22).

Von den 16 denkbaren Kombinationen wurden die 8 hergestellt, die eine bE/bW-Kombination ergeben. Die Expression wurden in BL21(DE3) bei 15 bis 18 °C über Nacht durchgeführt. Die bE1/bW2₁₃₁-Kombinationen (also bE1/bW2₁₃₁ und bW2₁₃₁/bE1) ergaben unter diesen Bedingungen praktisch vollständig lösliches Protein. Wichtig für den Erfolg war allerdings, daß die Zellkultur bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 0.4 bis 0.5 herangezogen wurde und dann durch Eintauchen in den vortemperierten Wasserbadschüttler schnell auf ca. 17 °C abgekühlt wurde. Ohne diesen Temperaturschock, der vermutlich die Produktion zelleigener Stressproteine⁷⁴, darunter Chaperones, auslöst, fallen auch diese Proteine unlöslich an.

Alle anderen Kombinationen sind unlöslich. Dies gilt nicht nur für die bE2/bW2-Kontrollvektoren, wo dies zu erwarten war, sondern auch für die bE1/bW2₁₁₆ Kombinationen. Dabei fiel auf, daß das im Vektor jeweils erste Gen verstärkt exprimiert wurde. Die Ursache für diese Beobachtung und ebenso für die vorher beschriebene Fehlinterpretation eines internen ATG-Tripletts könnte darin zu suchen sein, daß die Ribosomen von großen Mengen unlöslichem Protein umgeben sind, was den Nachschub an t-RNA beeinträchtigt. Im Falle der Einzelexpression könnte die Translation durch t-RNA-Mangel abbrechen und am nächsten erreichbaren ATG neu einsetzen, solange die m-RNA sich noch im Ribosom befindet. Produkte solcher unterbrochener Translationen werden als fehlerhaft markiert und in der

letztendlich zur Präzipitation der Proteine.

Messungen zur Temperaturstabilität ergaben, daß der Proteinkomplex bei 40 °C eine Halbwertszeit von etwa 18 h besitzt, bei 25 °C jedoch für >10 Tage 'meßbar' bleibt. Die Ursache für die im Vergleich zu E1 deutlich geringere Thermostabilität dürfte in einer Dissoziation des Komplexes zu suchen sein. Die freien Proteine können entweder wieder selektiv interagieren oder aber aggregieren. Ebenso dürfte auch hier noch Sauerstoff, der in die Probenröhrchen eindringt, noch eine Rolle spielen.

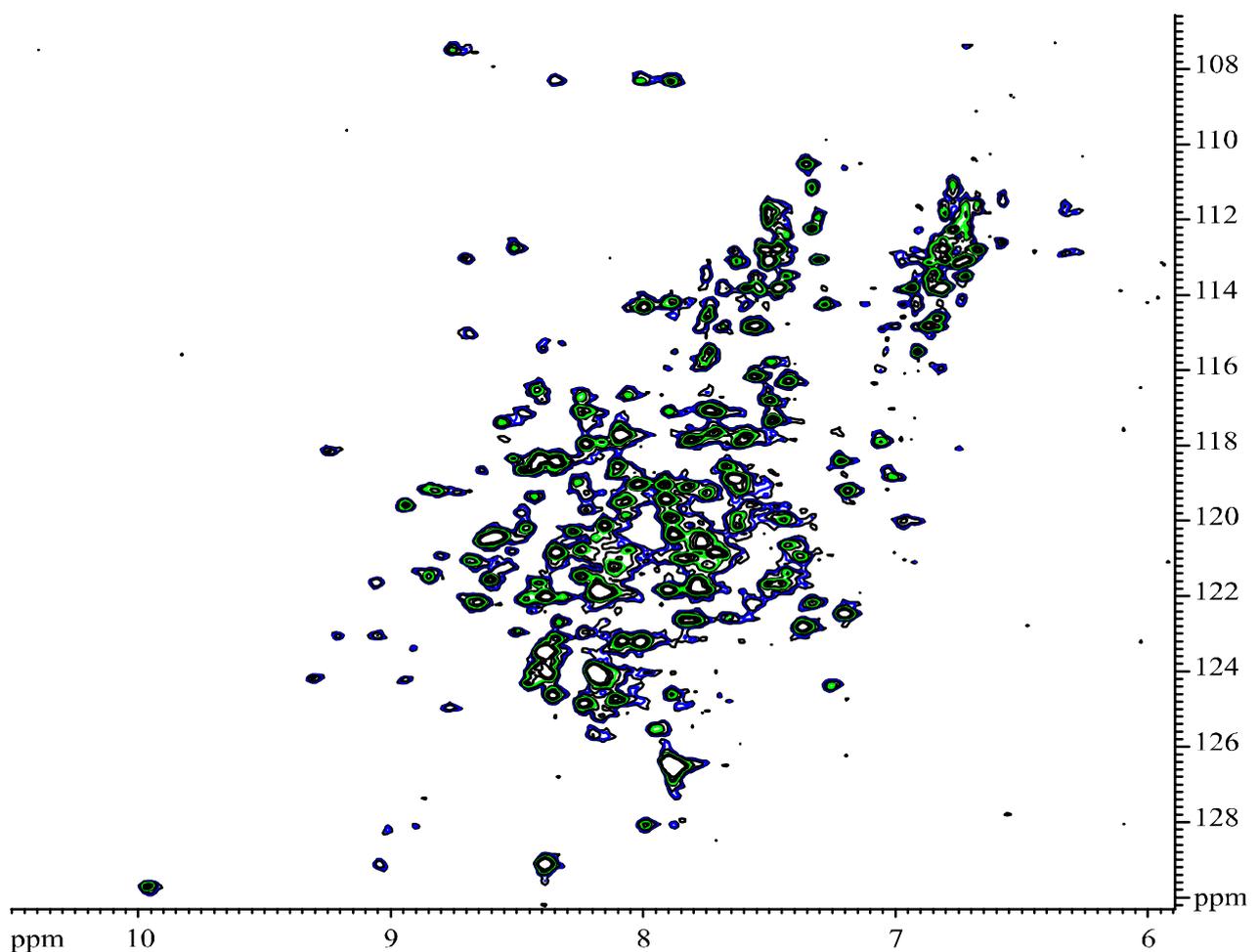


Abbildung 24: ^1H - ^{15}N TROSY des $(\text{bE1}_{98}/\text{bW2}_{131})_2$ -Komplexes. Die Signale sind mit dieser Methode zwar schärfer als bei entsprechenden HSQC-Spektren, aber noch immer wesentlich breiter als für ein 58,8 kDa Protein zu erwarten wäre. Die Signalverbreiterung ist das Ergebnis der Oxidation oberflächlicher Cysteine, was zu einer Oligomerisierung und letztendlich zur Aggregation der sehr sauerstoffempfindlichen Proteine führt.

3.8 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse.

Leider ist es bislang nicht gelungen, brauchbare Proteinproben für die NMR-Strukturaufklärung zu erhalten. Das größte Problem stellt dabei die extreme Sauerstoffempfindlichkeit dar, die Größe des Proteinkomplexes ist von sekundärer Bedeutung. So kann sich die Symmetrie des Proteins positiv auswirken und trotz der Größe die Messung vereinfachen, dazu kommen die kontinuierlichen Weiterentwicklungen in der NMR-Spektroskopie, was Feldstärke und vor allem die Meßmethodenentwicklung angeht. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Interaktion der bE/bW-Dimere über die am $W2_{131}$ vorhandenen Teile der Homöodomäne erfolgt. Somit bietet sich auch hier ein Ansatzpunkt, durch Verkürzung des bW-Fragments diese Domäne zu entfernen und somit dimere bE/bW-Komplexe zu erhalten. Versuche, die Tetramerisierung durch Zusatz synthetischer Peptide zu unterdrücken, wurden leider schon im Vorfeld durch synthetische Probleme verhindert.

Unabhängig von allen gegebenen Möglichkeiten, größenmäßig messbare bE/bW-Komplexe zu erhalten, bleibt immer noch das Problem der Cysteine, die im N-Terminus und nicht in der Homöodomäne positioniert sind. Hier kann nur eine vollständig unter Schutzgas durchgeführte Reinigung die Oxidation und damit den Verfall der Proteinproben verhindern.

Zwar wäre es auch möglich, diese Cysteine durch Mutagenese zu substituieren, doch stellt dies einen riskanten Weg dar, denn über die Relevanz dieser Aminosäuren kann durch die fehlenden Strukturvorhersagen keine Aussagen getroffen werden. Deswegen wurde dieser Weg nicht verfolgt, sondern ausschließlich mit ‚Originalsequenzen‘ gearbeitet.

In Hinblick auf die erzielbare Proteinkonzentration und Lebensdauer der Proben im Spektrometer erscheint bE/bW aussichtsreich. Auch die recht hohen Proteinausbeuten bei der Expression (ca. 120 mg/L) und die stehende und mit ca. 50 % Ausbeute recht gute Reinigungsprozedur stellen ein solides Fundament dar, zumal auch die Anpassung an die Expression vollständig isotopenmarkierter Proteine gelang. Der kinetische Isotopeneffekt macht sich

bei Verwendung isotope-markierter Vollmedien nur durch eine drastisch verlängerte Expressionszeit von 70 Stunden (gegenüber 16-20 h bei unmarkiertem Medium) bemerkbar, nicht aber in schlechterer Ausbeute.

Abschließend kann gesagt werden, daß die Arbeiten an den b-Proteinen von *Ustilago maydis* vom molekularbiologischen Standpunkt aus betrachtet eine ganze Reihe von Erkenntnissen gebracht haben, was Löslichkeitsverhalten und Interaktionen dieser Proteine angeht, besonders in Hinblick auf die zweite Interaktion über die Homöodomane.

Ebenso konnten zwei Ergebnisse erzielt werden, die als Grundlagenforschung von etwas allgemeinerem Interesse sein könnten. Dabei handelt es sich zum einen um den ‚Leitfaden‘ zur Proteinsolubilisierung. Ein systematischer Ansatz wie dieser, der den Arbeitsaufwand zur Solubilisierung von Proteinen reduzieren kann, dürfte im Vergleich zur klassischen, empirischen Methode viel Zeit sparen.

Weiterhin gelang die katalytische Aktivierung des IMPACT-Systems. Dieses Expressionssystem wird zwar häufig verwendet, ist aber nach Aussagen mehrerer ‚Betroffener‘ chronisch ‚spaltungsmüde‘. Somit stellt die Beschleunigung dieser limitierend wirkenden Spaltung durch einen einfachen und problemlos erhältlichen Katalysator eine echte Verbesserung dar.

4 Organische Synthesearbeiten in Zusammenhang mit der Proteinexpression

4.1 Detergenzien

Zur Solubilisierung der β -Proteine wurden Detergenzien mit einer definierten Lipophilie benötigt, die aber zusätzlich zur vorgegebenen Kettenlänge noch möglichst kleine Micellen bilden und proteinverträglich sein sollten. Zusätzlich war es für die geplanten NMR-Untersuchungen wichtig, die Detergenzien volldeutert erhalten zu können. Nach den guten Erfahrungen mit den Detergenzien der Zwittergent-Reihe wurden diese als Leitstrukturen benutzt (Abbildung 25).

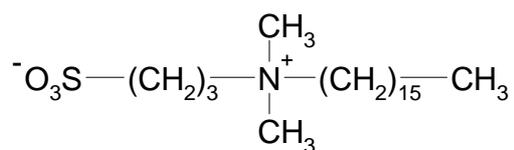


Abbildung 25: Zwittergent 3-16

Die gut proteinverträgliche, zwitterionische Kopfgruppe^{64,75,76} ist synthetisch leicht einzuführen, so daß jedes tertiäre Amin zur Erzeugung dieser Struktur herangezogen werden kann. Die Reduktion der Micellengröße läßt sich durch Verzweigungen in der Kette erreichen, da jedoch die Länge der Alkylkette vorgegeben war, mußte die Verzweigung dieser Hauptkette durch Einführen weiterer Reste erzeugt werden. Als leicht (und vor allem auch volldeutert) zugängliche Quelle von Alkylketten boten sich die natürlichen Fettsäuren an, von denen verschiedene an einem Verknüpfungspunkt angebracht und mit einem tertiären Amin als Vorstufe der zwitterionischen Kopfgruppe versehen werden mußten. Zuletzt sollten alle Synthesen billig und ohne viele Nebenprodukte durchführbar sein, da die Detergenzien auch in größeren Mengen hergestellt werden müßten. Basierend auf diesen Überlegungen wurde folgender Synthesepfad aufgestellt (Abbildung 26):

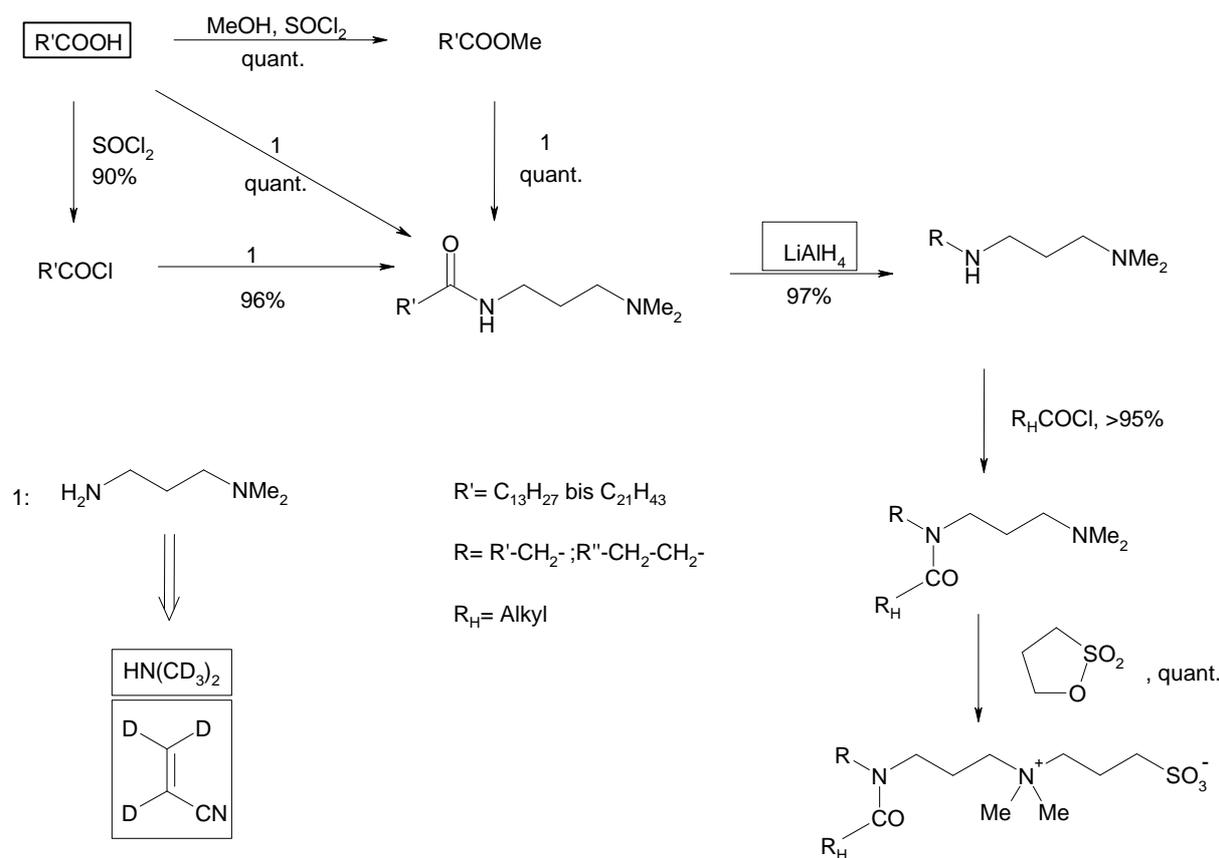


Abbildung 26: Syntheseplanung zur Darstellung der Detergentien. Alle umrandeten Edukte sind voll deuteriert erhältlich. Zur Durchführung der einzelnen Stufen vgl. Text.

Da es bereits zu Anfang fraglich war, ob eine einzelne polare Kopfgruppe ausreichen würde, um die durch ihre sehr langen Alkylreste stark lipophilen Verbindungen zu solubilisieren, wurden weitere, alternative Kernstrukturen neben dem 3-(Dimethylamino)-propylamin ins Auge gefasst (Abbildung 27). Die synthetische Zugänglichkeit dieser Verbindungen mußte jedoch noch überprüft werden, besonders in Hinblick auf deren möglichst volldeuterierte Verfügbarkeit. Das 3-(Dimethylamino)-propylamin selbst ist relativ einfach aus Acrylnitril, Dimethylamin und anschließende Reduktion zugänglich, alle Komponenten sind deuteriert erhältlich.

Weiterhin stellt der bei der Umsetzung mit Propansulton entstehende quartäre Stickstoff eine Abgangsgruppe dar, die, geeignete Nukleophile vorausgesetzt, intramolekular zu unerwünschten Cyclisierungen führen kann. Folglich durften im endgültigen Zielmolekül keine nukleophilen Zentren mehr vorhanden sein.

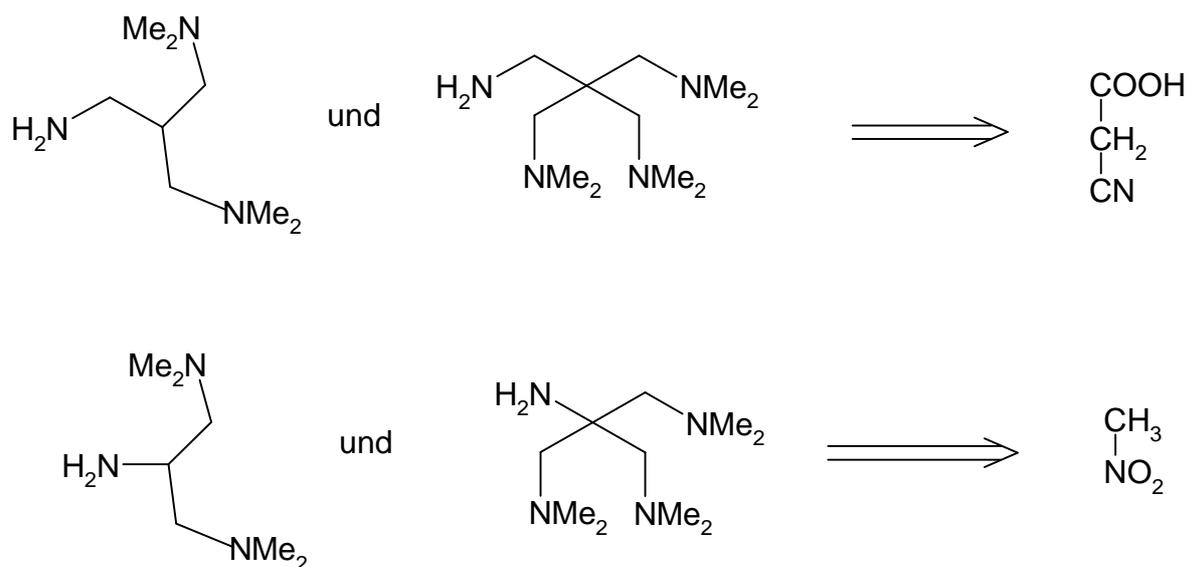


Abbildung 27: Weitere auf ihr Eignung als Kernstrukturen untersuchte Moleküle. Alle lassen sich (theoretisch) durch Aminomethylierung (Mannichreaktion) aus Cyanessigsäure bzw. Nitromethan herstellen.

4.1.1 Synthese der N-[3-(dimethylamino)-propyl]-acyl-amide

(Amino-amid)

Die Anknüpfung des ersten Alkylrests an das 3-(Dimethylamino)-propylamin stellt die an sich triviale Bildung einer Amidbindung dar. Untersucht wurden die Umsetzung des 3-(Dimethylamino)-propylamins mit dem Carbonsäuremethylester (aus der Carbonsäure in Methanol mit Thionylchlorid), mit dem Carbonsäurechlorid (aus Carbonsäure mit Thionylchlorid) und zuletzt die direkte Amidbildung.

Die Umsetzung des Methylesters mit dem Amin verlief nur bei hoher Temperatur und sehr schleppend, so daß dieses Verfahren trotz sehr hoher erzielbarer Ausbeuten rasch verworfen wurde. Die Umsetzung der Säurechloride mit dem Amin gelang problemlos und lieferte auch gute Ausbeuten, war aber als zweistufige Reaktion der letztlich angewandten, direkten Amidsynthese unterlegen. Dazu wurde die jeweilige Carbonsäure mit einem Überschuß des 3-(Dimethylamino)-propylamins und Toluol als Schlepper am Wasserabscheider erhitzt, und anschließend das Amino-amid

durch Kristallisation aus Methanol (C₁₄- bis C₁₈-Alkylreste) oder Destillation (Alkylreste <C₁₂) des Ansatzes im Ölpumpenvakuum in fast quantitativen Ausbeuten erhalten.

4.1.2 Reduktion der Amino-amide zu den entsprechenden

Amino-aminen

Die Reduktion der Amino-amide wurde nach Literaturvorschrift⁷⁷ mit einem doppelten Überschuß Lithiumaluminiumhydrid in Ether durchgeführt und lieferte die Amino-amine in sehr guten Ausbeuten (97%).

4.1.3 Einführung des zweiten Acylrestes

Die Einführung des zweiten Acylrestes erfolgt durch Reaktion des Aminoamins mit dem entsprechenden Acylchlorid in THF. Eine Reaktionsführung unter Rückflussbedingungen ist wegen der starken Schaumentwicklung und Verfärbung des Ansatzes nicht empfehlenswert. Statt dessen gelingt die Synthese bei Raumtemperatur, erfordert aber besonders bei langkettigen Edukten Reaktionszeiten von bis zu drei Tagen. Die Ausbeuten liegen bei 95 – 97 %.

4.1.4 Quarternierung mit Propansulton

Zur Quarternierung wurden die in den Verbindungen vorliegenden Dimethylaminogruppen mit der stöchiometrischen Menge des Propansultons⁷⁸ umgesetzt (über Nacht RT). Diese Reaktion wurde in THF und Chloroform durchgeführt und liefert quantitative Ausbeute.

4.1.5 Synthese weiterer Kernstrukturen

Zur Darstellung von Linkern mit mehr als einer Dimethylaminogruppe wurde auf die literaturbeschriebene Darstellung von 1,3-Bis-(dimethylamino)-2-cyanopropan aus Cyanessigsäure zurückgegriffen⁷⁹. Es gelang, die ursprünglich zweistufige Synthese auf eine Stufe zu verkürzen und das Aminonitril in 72 % Ausbeute zu erhalten. Unter sauren Bedingungen neigt diese Verbindung allerdings in Umkehrung ihrer Bildung zur Eliminierung von Dimethylamin, und es verbleibt das sehr reaktive Dimethylaminomethyl-acrylnitril (Abbildung 28).

Es war nicht möglich, durch eine dritte Mannichreaktion ein Molekül mit drei potentiell quarternierbaren Gruppen zu erzeugen, entsprechende Versuche lieferten nur das bereits bekannte Aminonitril.

Die Reduktion des Nitrils zum entsprechenden Amin bereitete massive Probleme. Reduktion mit Lithiumaluminumhydrid schienen zwar das gewünschte Produkt zu liefern, es war aber unmöglich, dieses aus dem Aluminiumkomplex, in dem es als dreizähliger Ligand fungierte, zu isolieren. Andere Methoden der Nitrilreduktion, wie Boranat/Cobalt^{80,81}, Borankomplexe⁸², Boranat/TFA⁸³, Palladiumphthalocyanin (PdPc – Synthese nach Lit⁸⁴)/boranat⁸⁵, PdPc/Wasserstoff^{86,87} scheiterten. Auch katalytische Hydrierungen unter einer ganzen Reihe von Druck / Temperatur / Lösungsmittel / Katalysator-Variationen⁸⁸ brachten nur schlechte bis bestenfalls mäßige Erfolge, die höchste jemals erzielte Ausbeute betrug 30 % bei Umsetzung mit 5 % Rhodium/Al₂O₃⁸⁹ in Methanol bei RT, 30 bar Wasserstoff und 7 Tagen Reaktionszeit. In diesem Fall war das Produkt sogar sehr rein, andere Katalysatoren ergaben z. T. höchst komplexe Gemische aus (wenig) Produkt, hydrierten Zersetzungsprodukten und durch reduktive Alkylierung gebildetem sekundärem Amin (Abbildung 28).

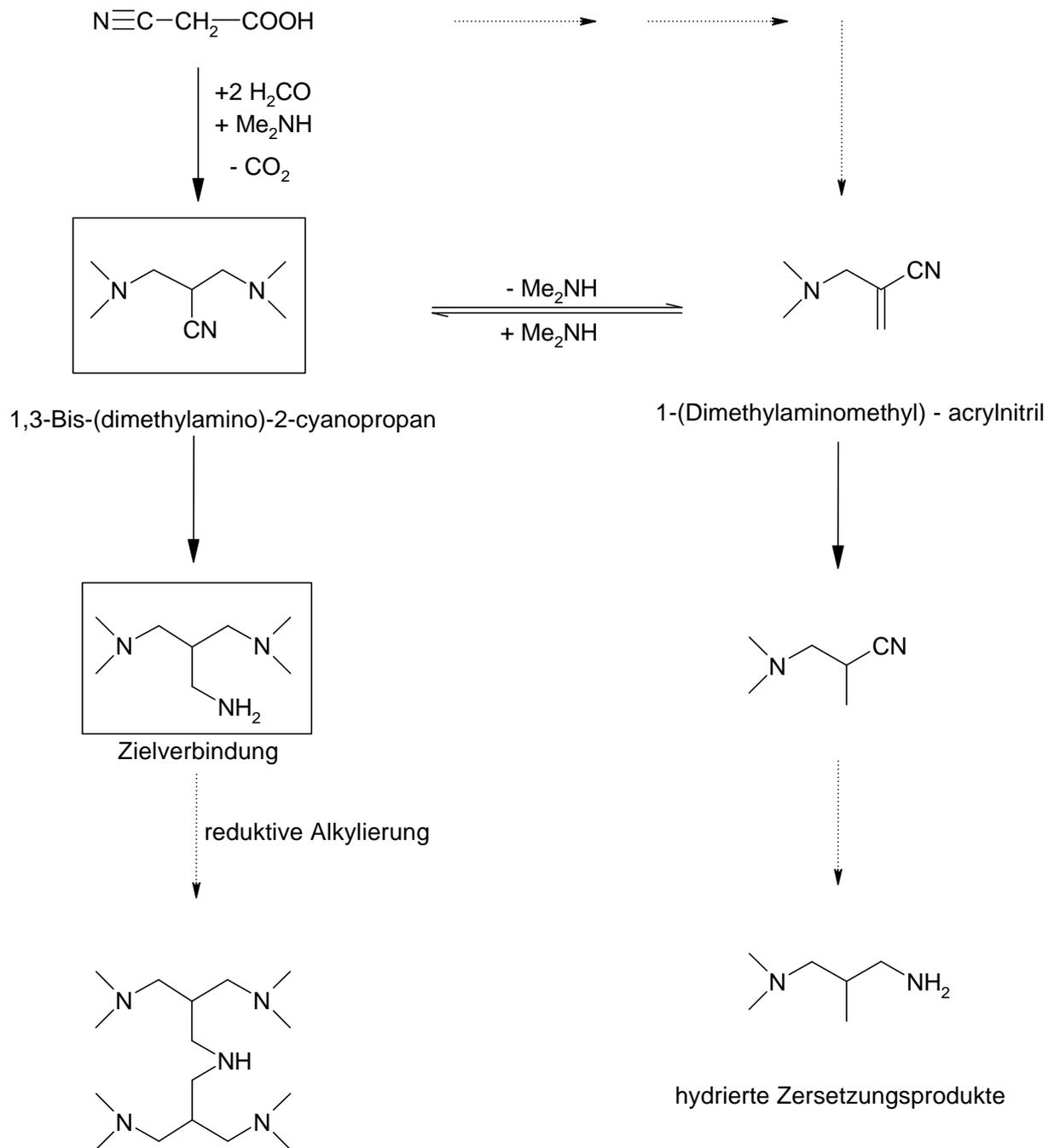


Abbildung 28: Synthese von 1,3-Bis-(dimethylamino)-2-cyanopropan, ausgehend von Cyanessigsäure. Die einzige faßbare und charakterisierte Zwischenstufe ist das Dimethylamino-acrylnitril. Die Hydrierung des Produktes ergibt neben der Zielverbindung auch das Produkt einer reduktiven Alkylierung, ebenso entsteht durch Dimethylamin-Eliminierung wieder die Zwischenstufe des Dimethylamino-acrylnitrils und deren Hydrierungsprodukte.

Analog zu Cyanessigsäure kann auch Nitromethan per Mannichreaktion alkyliert werden, was bereits 1905 beschrieben wurde⁹⁰. Das Bis-(dimethylaminomethyl)-nitromethan wurde damals isoliert und als sehr zersetzliche Verbindung beschreiben, die in schlechter Ausbeute zum entsprechenden Amin reduziert werden konnte. Versuche, Nitromethan mit drei Dimethylaminomethyl-Gruppen zu versehen, ergaben nicht die erhofften Verbindungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese historischen Synthesen wieder aufgegriffen. Es zeigte sich, daß das Bis-(dimethylaminomethyl)-nitromethan, wie beschrieben, leicht und in guter Ausbeute erhalten werden konnte. Wurde es *nicht* im evakuierten Exsikator, sondern dicht verschlossen bei -30 °C gelagert, war es über lange Zeit praktisch unverändert stabil. Ursache für die beschriebene Zersetzlichkeit dieser Verbindung dürfte auch hier die Eliminierung von Dimethylamin zum entsprechenden, hochreaktiven Nitroethenderivat sein.

Wie beim 1,3-Bis-(dimethylamino)-2-cyanopropan gelang es auch hier nicht, das Nitromethanderivat in vernünftigen Ausbeuten zum entsprechenden Amin zu reduzieren (es wurden dieselben Methoden wie zuvor verwendet, zusätzlich Ammoniumformiat / Palladium/Kohle⁹¹), immer entstanden erhebliche Mengen z. T. teerartiger Nebenprodukte.

4.1.6 Verknüpfung der Amino-amine über Linker

Die Literatur kennt viele Beispiele, in denen mehrbasige Säurechloride stufenweise mit sekundären Aminen umgesetzt und vor allem die betreffenden Stufen gefaßt werden können.

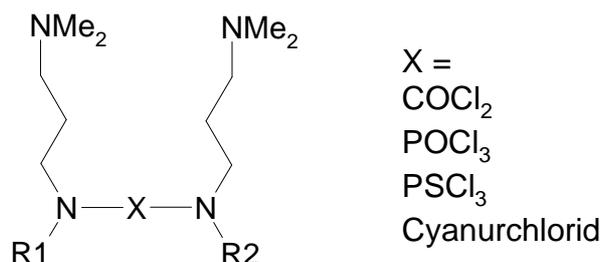


Abbildung 29: Die zweite Möglichkeit, mehrere verschiedene Alkylreste und mehrere Dimethylaminogruppen in ein Molekül zu bringen, besteht darin, die gut zugänglichen Amino-amine über verschiedene Linker miteinander zu verknüpfen.

Diese Synthesen wurden hier benutzt, um Amino-amine mit verschiedenen Alkylresten miteinander zu verbinden. Als Säurechloride wurden Cyanurchlorid⁹², Phosgen, POCl₃ und im weiteren Verlauf auch PSCl₃ und PCl₃ verwendet. In allen Fällen gelang es, ein, zwei, oder ggf. auch drei der Amine am Zentralatom anzubringen.

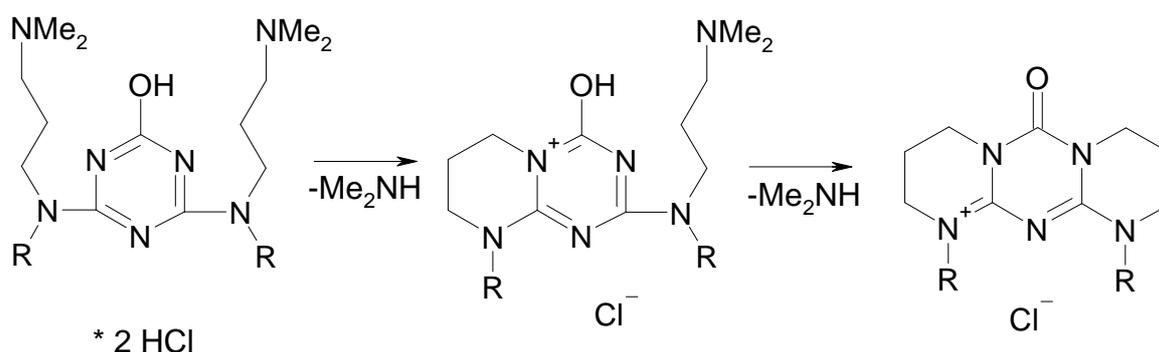


Abbildung 30: Zersetzung der Verbindungen aus Cyanursäure und Alkyl-3-(dimethylaminopropyl)amin, beispielhaft am Disubstitutionsprodukt (nach Hydrolyse des dritten Chloratoms): Die Verbindung eliminiert wiederholt Dimethylamin, was sich in einem breiten Produktspektrum zeigt und sich auch im Massenspektrometer bei der Analyse dieser Produkte widerspiegelt. Basierend auf den beobachteten Molekülmassen und Massenänderungen wurden die Strukturen dieser nicht weiter charakterisierten Nebenprodukte *postuliert*.

Im Fall der Cyanursäure konnten die einzelnen Stufen der Substitutionen sehr gut gefaßt werden, aber die Verbindungen neigten stark zur Eliminierung von Dimethylamin, wohl unter Bildung cyclischer Produkte (Abbildung 30).

Alle anderen Verbindungen waren zwar gegen diese Zersetzung stabil, konnten jedoch nie ganz rein synthetisiert werden. Dies gelang erst, als in Abwandlung einer Literaturvorschrift⁹³ Bis-trimethylsilylacetamid als Säurefänger verwendet wurde. Die Phosphoramide, die aus PCl_3 hergestellt wurden, oxidieren bei Luftkontakt praktisch sofort zum entsprechenden Phosphorsäureamid⁹⁴, die Verwendung von PCl_3 erleichtert die Reaktion gegenüber dem langsamer reagierenden POCl_3 und liefert im Endeffekt dasselbe Produkt.

Triamide der Phosphorsäure und der Thiophosphorsäure stellen stark nukleophile Verbindungen dar, die durch alkylierende Reagentien am entsprechenden Sauerstoff oder Schwefel alkyliert werden können⁹⁵. Somit stellten derartige Linker kein unerwünschtes Nukleophil mehr dar, sondern werden im Zuge der Quarternierung in eine vierte, zwitterionische Gruppierung umgewandelt.

Exemplarisch wurden folgende Verbindungen synthetisiert (Tabelle 1):

COCl_2	PCl_3 (= POCl_3)	PSCl_3
C_8 / C_8	$\text{C}_8 / \text{C}_8 / \text{C}_8$	$\text{C}_8 / \text{C}_8 / \text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$
$\text{C}_8 / \text{C}_{18}$	$\text{C}_8 / \text{C}_8 / \text{C}_{18}$	$\text{C}_8 / \text{C}_{18} / \text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$
$\text{C}_{18} / \text{C}_{18}$	$\text{C}_8 / \text{C}_{18} / \text{C}_{18}$	$\text{C}_{18} / \text{C}_{18} / \text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$
	$\text{C}_{18} / \text{C}_{18} / \text{C}_{18}$	

Tabelle 1: Liste der synthetisierten Verbindungen.

Nach der Reinigung liegen alle Verbindungen als pastöse Massen bzw. Öle ohne definierten Schmelzpunkt vor. Reine C_8 -Verbindungen sind fast farblos, jeder C_{18} -Rest bewirkt jedoch eine Farbvertiefung, bis hin zu dem kräftig gelben $\text{PO}(\text{C}_{18})_3$ – Produkt.

4.1.7 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieses Arbeitsabschnittes konnten eine ganze Palette von Bausteinen durch schnelle, sehr effiziente und einfache Synthesen zugänglich gemacht werden. Diese Bausteine lassen sich zu einer ganzen Bibliothek von möglichen Detergenzienmolekülen kombinieren, die alle denkbaren Kettenlängen und Kettenkombinationen bereitstellen können. Der ursprüngliche Sinn dieser Synthesen war es, geeignete Mittel zur Solubilisierung der β -Proteine zur Verfügung zu stellen. Nachdem dieses Primärziel auf biochemischem Wege erreicht worden war, wurden die Arbeiten an diesem nunmehr sekundären Projekt eingestellt.

In jüngster Zeit wurde jedoch eine ähnliche Arbeit über die Synthese sog. *Geminitenside*⁹⁶ publiziert. Dies sind Detergenzien, bei denen zwei (oder mehr) Alkylreste über lange, flexible Linker verbunden sind und je nach Alkylresten eine große Breite an möglichen Verhaltensweisen zeigen. Trifft dieses breite Spektrum⁹⁷ auch nur teilweise auf die hier synthetisierten Detergenzien mit sehr kurzem Linker zwischen den Alkylresten zu, so dürfte hier ein großes Potential liegen, welches neben der klassischen, runden Micelle auch anisotrope Formen liefern kann, was für die Protein-NMR-Spektroskopie⁹⁸ von Interesse wäre, bis hin zur Bildung von Liposomen und evtl. Gelen. Dies gilt besonders, da die hier synthetisierten Detergenzien zwitterionisch und somit wesentlich ‚proteinfreundlicher‘ als die kationischen *Geminitenside* sind.

4.2 Synthese von Homöodomänen – Peptiden

Die für die Dimerisierung der bE/bW-Komplexe zum Tetramer verantwortlichen Bereiche befinden sich auf der am W₂₁₃₁ vorhandenen Homöodomäne. Bei dieser Interaktion handelt es sich um eine antiparallele Homodimerisierung (Abbildung 23, Seite 43). Es sollte möglich sein, durch Zusatz eines Überschusses synthetischer Homöodomänen auf rein statistische Weise die unerwünschte Dimerisierung der bE/bW-Komplexe zurückzudrängen. Das Ziel dieses Arbeitsabschnittes war die Synthese dieser Peptide. Um einen der natürlichen Homöodomäne gleichwertigen Interaktionspartner bereitzustellen, mußten die synthetischen Peptide beide lipophilen Domänen des Originals enthalten. Da weiterhin nicht bekannt war, ob die Interaktionen mehr als nur diese Bereiche umfassen, erschien es auch nicht ratsam, N- oder C-terminal die Sequenz zu verkürzen. Ziel war also die Synthese der 31 Aminosäuren langen Homöodomäne (Abbildung 31).

Proteinsequenz:	↓101			↓116				↓131
	E	AYDQA	<u>FRNLL</u>	KHVFS	TRSRK	<u>MWYML</u>	LKEAS	
Syntheseposition:	30↑	25↑	20↑	15↑	10↑	5↑	1↑	

Abbildung 31: Aminosäuresequenz der Homöodomäne (lipophile Bereiche unterstrichen). Die Peptidsynthese erfolgt vom C-Terminus beginnend. Aminosäuren, die als Pseudoprolin eingesetzt werden können, sind **fett** markiert.

Die Synthese der Peptidsequenz erfolgte per SPPS nach der Fmoc-Strategie¹⁰⁵ auf TCP-Harz (Pepchem, Tübingen). Der Aufbau des Petides gelang problemlos bis einschließlich des Serins an Syntheseposition 16. An dieser Stelle erfolgte der Kollaps zum β -Faltblatt. Versuche, per Fragmentkupplung (5+15@TCP, 10+10@TCP) längere Sequenzen zu erhalten, scheiterten an massiver Gelbildung, die auch mit chaotropen Salzen nicht zu unterdrücken war. Erschwerend kam hinzu, daß es keine für eine Fragmentkupplung günstigen Glycine in der Sequenz gab.

Als weitere Methode, den Kollaps zu unterdrücken und die Synthese

fortführen zu können, wurde der Einbau von Pseudoprolinen untersucht⁹⁹. Die Zielsequenz zeigt drei Möglichkeiten: Ser an Syntheseposition 16, Threonin Syntheseposition 15 und Serin an Syntheseposition 13. Davon fallen jedoch zwei Möglichkeiten weg, da weder Fmoc-Arg-Ser(ψ -Pro)-OH - Baustein noch ein Fmoc-Phe-Ser(ψ -Pro)-Thr(ψ -Pro)-OH - Baustein synthetisch zugänglich, geschweige denn kommerziell erhältlich sind (in beiden Fällen versagen die sonst üblichen Synthesemethoden^{109,110}. Somit blieb nur der kommerziell erhältliche Fmoc-Phe-Ser(ψ -Pro)-OH - Baustein. Wie bereits beim ersten Syntheseversuch gelang dieser Kupplungsschritt, doch erfolgte nun trotz Pseudoprolin wieder der Kollaps zum β -Faltblatt. Vermutlich kommen die strukturbrechenden Eigenschaften nicht zur Geltung, da das Pseudoprolin am äußerstem Rand und nicht innerhalb der kollabierenden Sequenz positioniert ist.

4.2.1 Silylierung des Peptid-*backbones*

Die Literatur kennt mit der kompletten Silylierung¹⁰⁰ eine weitere, schnelle Methode zur Beseitigung von Sekundärstrukturen bei Peptidsynthesen. Diese klassische Methode verwendet die TMS-Gruppe, die jedoch nicht basenstabil ist. Dies führt zum Verlust der TMS-Gruppen bei jedem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe.

In Anlehnung an dieses Verfahren wurde nun die Verwendung basenstabiler Silylschutzgruppen untersucht, die auch die Bedingungen der Fmoc-Abspaltung tolerieren. Weiterhin sollte bei der *backbone* - Silylierung der N-terminale Stickstoff nicht silyliert werden, um nachfolgende Kupplungsschritte nicht zu behindern. Ein Reagenz, das beide Bedingungen erfüllt, ist TBDMS-Imidazol¹⁰¹ (TBDMS-Im). TBDMS-Im verlangt jedoch sehr drastische Reaktionsbedingungen.

Es gelang allerdings, die Silylierung durch Verwendung geeigneter Katalysatoren¹⁰² auch bei Raumtemperatur durchzuführen. Weiterhin gelang

die Silylierung auch durch Verwendung von TBDMS-Cl/Imidazol¹⁰³ sowie durch Verwendung des entsprechenden Silans¹⁰⁴, welches mit Imidazol und katalytischen Mengen *löslichem* Fluorid aktiviert wurde. Diese Reaktion wird erst durch Verwendung von löslichem Tetrabutylammoniumfluorid für die Verwendung mit der Festphasensynthese nutzbar, die Originalliteratur verwendet Cäsiumfluorid in einem Zweiphasensystem.

Zur Reduzierung des synthetischen Aufwandes wurden diese Untersuchungen an der kürzeren Testsequenz, einem an TCP-Harz aufgebautem Octapeptid (AILAEVIG@TCP) durchgeführt. Wird an diese Sequenz noch Fmoc-Gly-OH gekuppelt, so kollabiert Fmoc-GAILAEVIG@TCP zum β -Faltblatt. Diese Sequenz stammt aus der Arbeit von N. SCHMIEDEBERG, auch hier erschwerte der Kollaps zum β -Faltblatt die Synthese eines längeren Zielpeptides. Die bekannten Eigenschaften und der vorhandene Vorrat dieses Peptides machten es zum idealen Testkandidaten.

Nach der Silylierung gelang in allen Fällen die Kupplung des nächsten Glycins und ebenso die vorher unmögliche Fmoc-Abspaltung. Die Kupplung einer weiteren Aminosäure verlief allerdings nur mit max. 50 % Ausbeute. Durch die Silylierung mit basenstabilen Silylgruppen wurde der Kollaps zum β -Faltblatt zwar erfolgreich verhindert, doch scheint die hohe Lipophilie der silylierten Peptide zu einer lipophilen Aggregation zu führen, was die weiteren Kupplungen erschwert. Zusätzlich erfolgt die Silylierung statistisch. Dies führt zu einer Unzahl von verschiedenen Peptidderivaten und macht eine Analyse bzw. Reaktionskontrolle unmöglich. Erst nach Entfernung der Silylschutzgruppen erhält man wieder einheitliche Substanzen.

4.2.2 Silylierung unter Verwendung der Mitsunobureaktion.

Um definierte und damit analysierbare silylierte Peptide zu erhalten, wurde untersucht, ob sich die Aminbindungen der Testsequenz mit 2-Trimethylsilyl-ethanol / Triphenylphosphin / DEAD alkylieren lassen. Optisch

konnte der Reaktionsverlauf durch die Aufhellung des durch DEAD tiefgelben Reaktionsansatzes verfolgt werden. Allerdings ließen sich *nach dem Abspalten* der Peptide vom Harz nur Spuren silylierter Peptidbindungen nachweisen. Da nach den einschlägigen Erfahrungen im AK Kessler die Mitsunobureaktion bislang immer hohe Ausbeuten lieferte, und sie auch hier offensichtlich abgelaufen war, kann davon ausgegangen werden, daß die eingeführte Trimethylsilyl-ethylierung beim Abspalten mit Hexafluoroisopropanol (HFIP) ebenfalls entfernt wurde. Dies ist insofern denkbar, als HFIP durchaus mit Fluorid vergleichbare Eigenschaften in punkto Nukleophile und Härte haben könnte.

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion

Die hier durchgeführten Synthesen sollten dazu dienen, die bE/bW-Proteine in einer für die NMR-Strukturaufklärung geeignete Form zu bringen. Da sich die Syntheseroute inzwischen aber schon durch die siliziumorganische Chemie schlängelte, und vor allem, da bei den bE/bW-Proteinen nicht mehr die Größe des Komplexes, sondern die Sauerstoffempfindlichkeit desselben als das Hauptproblem identifiziert worden war, wurde dieser Syntheseversuch eingestellt.

Vom synthetischen Standpunkt lassen sich die Ergebnisse dieser Versuche bei den bislang gemachten Silylierungsversuchen einreihen. Es ist möglich, die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu unterbinden, aber dieses Verfahren erzeugt seinerseits wieder andere Probleme. Besonders schwerwiegend ist, daß durch die Erhöhung der Lipophilie die Kompatibilität zum etablierten Verfahren der Peptidsynthese gestört wird (ionische Kupplungsreagentien in polarem DMF).

Eventuell könnte die Verwendung polarerer Silylschutzgruppen helfen, die Vorteile dieser Methode zu erhalten und die Kompatibilität zu den etablierten Reagentien zu gewährleisten, doch dies erfordert mit Sicherheit langwierige Forschungen und Optimierungen. Somit dürfte die Silylierung des

Peptidbackbones auch in naher Zukunft nicht zur Methode der Wahl werden, wenn es um die Überwindung schwieriger Sequenzen geht.

Die Homöodomäne konnte synthetisch bis zu einer Länge von 16 Aminosäuren aufgebaut werden. Dies umfaßt die zweite der beiden lipophilen Domänen. Zu Testzwecken wurde dieses Peptid zu einer NMR-Probe des bE₁₉₈/bW₂₁₃₁-Komplexes zugesetzt, was innerhalb kürzester Zeit zur Bildung eines dicken Niederschlags führte. Dieser Niederschlag bestand allerdings nicht aus dem Protein, sondern es war das Peptid, das aggregierte, sobald die wässrige Lösung des bei der Synthese erhaltenen Peptid-Trifluoroacetats durch den Proteinpuffer auf einen ‚physiologischen‘ pH-Wert gebracht wird. Dies bestätigt zumindest, daß die nicht durch Interaktion maskierten, lipophile Domänen der Proteine für die Aggregation verantwortlich sind.

5 Der α -Lokus von *Ustilago Maydis*: Systematische Untersuchung beider Pheromone

5.1 Aufgabenstellung

Anhand des bereits durchgeführten Ala-scans und der D- und DD-scans konnte die aktive Sequenz des $\alpha 1$ -Pheromons auf das PIGY-Tetrapeptide eingegrenzt werden, das über einen zwei Aminosäuren langen Spacer (-SS-) mit dem essentiellen Membrananker (Ahds-OMe) verbunden ist. Dabei zeichneten sich einige Aminosäuren im Molekül aus, deren große Bedeutung für die Aktivität weitere Untersuchungen dieser Positionen nahelegten. Diese Aminosäuren waren besonders die Glycine im Inneren des Pheromons, Prolin (7), das möglicherweise eine cis-Peptidbindung induziert, sowie Tyrosin (10), welches für die Rezeptoraktivierung absolut essentiell ist, wobei aber unbekannt war, wie es mit dem Rezeptor wechselwirkt. Weiterhin galt es zu untersuchen, ob im rezeptorgebundenen Pheromon bestimmte Schleifen oder andere Peptidrückgratstrukturen identifiziert werden können. Ebenso war das $\alpha 2$ -Pheromon bislang noch in keinerlei Weise untersucht worden, so daß auch hier ergänzende Informationen für das Gesamtbild zu erwarten waren.

Des weiteren stand mit dem bis dato entwickelten Nachweis von Konjugationshyphen ein zweites, unabhängiges Testsystem zur Verfügung, mit dem die Ergebnisse des bisherigen Plattentests verifiziert werden konnten. Somit wurden zur Durchführung aller Detailuntersuchungen folgende Peptide synthetisiert (Tabelle 2) und anschließend durch Pheromonbioassays getestet.

Liste der Peptide

# Verbindung (Bemerkungen)	Sequenz:
Ala-Scan $\alpha 1$	
101	GRDNGSPIGYSS-Ahds-OMe
102	ARDNGSPIGYSS-Ahds-OMe
103	(D-Ala)RDNGSPIGYSS-Ahds-OMe
104	GADNGSPIGYSS-Ahds-OMe
105	GRANGSPIGYSS-Ahds-OMe
106	GRDAGSPIGYSS-Ahds-OMe
107	GRDNASPIGYSS-Ahds-OMe
108	GRDN(D-Ala)SPIGYSS-Ahds-OMe
109	GRDNGAPIGYSS-Ahds-OMe
110	GRDNGSAIGYSS-Ahds-OMe
111	GRDNGSPAGYSS-Ahds-OMe
112	GRDNGSPIAYSS-Ahds-OMe
113	GRDNGSPI(D-Ala)YSS-Ahds-OMe
114	GRDNGSPIGASS-Ahds-OMe
115	GRDNGSPIGYAS-Ahds-OMe
116	GRDNGSPIGYSA-Ahds-OMe
Sequenzverkürzungen $\alpha 1$	
117 (N-terminal)	Δ RDNGSPIGYSS-Ahds-OMe
118	$\Delta\Delta$ RDNGSPIGYSS-Ahds-OMe
119	$\Delta\Delta\Delta$ RDNGSPIGYSS-Ahds-OMe
120	$\Delta\Delta\Delta\Delta$ RDNGSPIGYSS-Ahds-OMe
121	$\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$ RDNGSPIGYSS-Ahds-OMe
122	$\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$ PIGYSS-Ahds-OMe
123	$\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$ IGYSS-Ahds-OMe
124 (C-terminal)	GRDNGSPIGYSS Δ -Ahds-OMe
125	GRDNGSPIGYSS $\Delta\Delta$ -Ahds-OMe
Sequenzverkürzungen $\alpha 2$	
126 $\alpha 2$ nativ ($\alpha 2$ -Referenz)	NRGQPGYY-Ahds-OMe
127 (N-terminal)	Δ RGQPGYY-Ahds-OMe
128	$\Delta\Delta$ GQPGYY-Ahds-OMe
129	$\Delta\Delta\Delta$ QPGYY-Ahds-OMe
130	$\Delta\Delta\Delta\Delta$ PGYY-Ahds-OMe
131	$\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$ GYY-Ahds-OMe
132 (C-Terminal)	NRGQPGY Δ -Ahds-OMe
133	NRGQPG $\Delta\Delta$ -Ahds-OMe
Mehrfach-Ala-Substitutionen $\alpha 1$	
201	GRDNGAPIGYSA-Ahds-OMe
202	ARDNGSPIGYSA-Ahds-OMe
203	ARDNGAPIGYSS-Ahds-OMe
204	ARDNGAPIGYSA-Ahds-OMe

D-Scan $\alpha 1$ (Gly \rightarrow D-Ala beim Ala-Scan)

301	G(D-Arg)DNGSPIGYSS-Ahds-OMe
302	GR(D-Asp)NGSPIGYSS-Ahds-OMe
303	GRD(D-Asn)GSPIGYSS-Ahds-OMe
304	GRDNG(D-Ser)PIGYSS-Ahds-OMe
305	GRDNGS(D-Pro)IGYSS-Ahds-OMe
306	GRDNGSP(D-Ile)GYSS-Ahds-OMe
307	GRDNGSPIG(D-Tyr)SS-Ahds-OMe
308	GRDNGSPIGY(D-Ser)S-Ahds-OMe
309	GRDNGSPIGYS(D-Ser)-Ahds-OMe
310	GRDNGSPIGYSS-(D-Ahds)-OMe

Doppel-D-Scan $\alpha 1$

311	(D-Ala)-(D-Arg)DNGSPIGYSS-Ahds-OMe
312	G(D-Arg)-(D-Asp)NGSPIGYSS-Ahds-OMe
313	GR(D-Asp)-(D-Asn)GSPIGYSS-Ahds-OMe
314	GRD(D-Asn)-(D-Ala)SPIGYSS-Ahds-OMe
315	GRDN(D-Ala)-(D-Ser)PIGYSS-Ahds-OMe
316	GRDNG(D-Ser)-(D-Pro)IGYSS-Ahds-OMe
317	GRDNGS(D-Pro)-(D-Ile)GYSS-Ahds-OMe
318	GRDNGSP(D-Ile)-(D-Ala)YSS-Ahds-OMe
319	GRDNGSPI(D-Ala)-(D-Tyr)SS-Ahds-OMe
320	GRDNGSPIG(D-Tyr)-(D-Ser)S-Ahds-OMe
321	GRDNGSPIGY(D-Ser)-(D-Ser)-Ahds-OMe
322	GRDNGSPIGYS(D-Ser)-(D-Ahds)-OMe

Spezielle Derivate

401 Fluorescein-Label	Fluorescein -GRDNGSPIGYSS-Ahds-OMe
402	Fluorescein -RDNGSPIGYSS-Ahds-OMe
403	Fluorescein -NRGQPGYY-Ahds-OMe
404 Kassettenaustausch-H-Brücke zw. D und Y?	G- SY -NGSPIG- DR -S-Ahds-OMe
405 Weitere Substitutionen	IRDNGSPIGYSS-Ahds-OMe
406	GRDNGVPIGYSS-Ahds-OMe
407	GRDNGS- Cys (Y ^{Me,Me} - Pro)-IGYSS-Ahds-OMe
408 andere lipophile Reste am $\alpha 1$ -C-Terminus	$\alpha 1$ -N(n-C ₁₄ H ₂₉)-(CH ₂) ₃ -NMe ₂
409	$\alpha 1$ -N(n-C ₁₄ H ₂₉)-(CH ₂) ₃ -NMe ₂ ⁺ -(CH ₂) ₃ -SO ₃ ⁻
410	$\alpha 1$ -N(n-C ₁₆ H ₃₃)-(CH ₂) ₃ -NMe ₂
411	$\alpha 1$ -N(n-C ₁₆ H ₃₃)-(CH ₂) ₃ -NMe ₂ ⁺ -(CH ₂) ₃ -SO ₃ ⁻
412	$\alpha 1$ -N(n-C ₁₈ H ₃₇)-(CH ₂) ₃ -NMe ₂
413	$\alpha 1$ -N(n-C ₁₈ H ₃₇)-(CH ₂) ₃ -NMe ₂ ⁺ -(CH ₂) ₃ -SO ₃ ⁻

Tyrosin-Substitutionen	
501	GRDNGSPIG- Phe -SS-Ahds-OMe
502 (4-Fluoro-phenylalanin)	GRDNGSPIG- (4-F-Phe) -SS-Ahds-OMe
503 (Pentafluoro-phenylalanin)	GRDNGSPIG- (F₅-Phe) -SS-Ahds-OMe
504 (4-Methoxy-phenylalanin)	GRDNGSPIG- Tyr(Me) -SS-Ahds-OMe
505 (4-Pyridyl-alanin)	GRDNGSPIG- (4-Pya) -SS-Ahds-OMe
506 (Cyclohexyl-alanin)	GRDNGSPIG- Cha -SS-Ahds-OMe
507 (4'-Hydroxy-cyclohexylalanin)	GRDNGSPIG- (4'-Hcha) -SS-Ahds-OMe
508	GRDNGSPIG- His -SS-Ahds-OMe
509 (4-Thiazolyl-alanin)	GRDNGSPIG- (4-ThiaA) -SS-Ahds-OMe
510	GRDNGSPIG- Ser -SS-Ahds-OMe
511	GRDNGSPIG- Thr -SS-Ahds-OMe
512	GRDNGSPIG- Pro -SS-Ahds-OMe
513 (Hydroxyprolin)	GRDNGSPIG- Hyp -SS-Ahds-OMe
514	GRDNGSPIG- Glu -SS-Ahds-OMe
515	GRDNGSPIG- Asp -SS-Ahds-OMe

Tabelle 2: Liste aller synthetisierten und getesteten Pheromonderivate. Zu Synthesedetails und Testergebnissen vgl. Text.

5.2 Synthese der Pheromonderivate

Alle untersuchten Pheromonderivate wurden per Fragmentkupplung der entsprechenden Peptidsäuren mit dem C-terminalen Ahds-Methylester dargestellt. Diese Peptidsäuren wurden mittels SPPS nach der Fmoc-Strategie¹⁰⁵ auf TCP-Harz (Pepchem, Tübingen) synthetisiert. Als Kupplungsreagenz diente TBTU/HOBt¹⁰⁶, zur Optimierung der Ausbeute wurden immer Doppelkupplungen durchgeführt. Die Peptidsäuren wurden somit praktisch rein erhalten. Um die Entschützung nach der Fragmentkupplung zu vereinfachen, wurden die N-terminalen Aminosäuren Boc-geschützt eingesetzt, bzw., wenn die entsprechenden Derivate nicht erhältlich waren, die Fmoc-Gruppe noch am Harz entfernt (20 % Piperidin in NMP) und die Aminofunktion mit Boc₂O/DIPEA in DMF umgeschützt. N-terminale Fluorescein-*label* wurden durch Kuppeln der freien Fluoresceinsäure eingeführt. Die vollgeschützten Peptide wurden mit 20 % HFIP in DCM vom Harz abgespalten und nach Entfernen des Lösungsmittels direkt für die Fragmentkupplung verwendet. Die Fragmentkupplungen wurden mit

1.1 Äquiv. Ahds-OMe * HCl, HATU/HOAt als Kupplungsreagenz sowie 3.5 Äquiv. sym. Collidin¹⁰⁷ in NMP durchgeführt und wie beschrieben aufgearbeitet²⁴. Entschützt wurden die Peptide mit 4 % TIPS in TFA und anschließend durch Fällen in kaltem Ether isoliert und durch mehrfaches Waschen mit demselben Lösungsmittel gereinigt. Nach dem Trocknen an der Luft wurden die Pheromonderivate aus t-Butanol/Wasser lyophilisiert. Durch HPLC-MS (Finnigan NCQ-ESI Massenspektrometer mit LCQ Kupplung zu einer Hewlett Packard HPLC Einheit HP 1100 – HPLC, Nucleosil 100 5 C₁₈ Säule) wurden Identität und Reinheit der Verbindungen kontrolliert. Diese lag in allen Fällen über 95%, meistens waren die Derivate praktisch rein.

Neben den natürlichen L- und auch D-Aminosäuren sind auch eine ganze Reihe an unnatürlichen Aminosäuren in Fmoc-geschützter Form kommerziell erhältlich und wurden auch auf diesem Wege beschafft. Doch eine ganze Reihe von Spezialaminosäuren und anderen Synthesebausteinen findet sich nicht in den Angeboten der Hersteller und wurde im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert.

5.2.1 Fmoc-(4'-Hydroxy)-cyclohexyl-alanin

Um die unnatürliche Aminosäure 4'-Hydroxy-cyclohexyl-alanin in Peptide einzubauen, wird als Synthesebaustein das orthogonal geschützte Fmoc-Hcha(tBu)-OH benötigt. Die Synthese von Fmoc-Hcha(tBu)-OH basiert auf der katalytischen Hydrierung von H-Tyr(tBu)-OH mittels eines Rhodium-Katalysators (5% Rh auf Aluminiumoxid). Dieser Katalysator ist in der Lage, auch hochsubstituierte Aromaten ohne Hydrogenolyse der Substituenten selektiv am Ring zu hydrieren. So konnte als Edukt kommerziell erhältliches H-Tyr(tBu)-OH eingesetzt werden, das den als permanente Schutzgruppe benötigten t-Butylrest bereits enthält. Dies erspart die nachträgliche, recht umständliche, weil mehrstufige, Einführung des t-Butylethers am Aromaten. H-Tyr(tBu)-OH ist in Methanol unlöslich, kann aber durch Zusatz einer

equimolaren Menge Lithiumhydroxid in Lösung gebracht werden Lithiumionen bewirken bei Rhodiumkatalysatoren eine Verbesserung der Selektivität und Aktivität. Die Fmoc-Gruppe muß allerdings nach der Hydrierung eingeführt werden, da sie, wäre sie bereits im Edukt vorhanden, als aromatisches System ebenfalls hydriert und unbrauchbar werden würde.

5.2.2 L-2,2-Dimethyl-thiazolidin-4-carbonsäure

H-Cys($\psi^{\text{Me,Me}}$ -Pro)-OH wurde ausgehend von Cystein-hydrochlorid und 2,2-Dimethoxypropan nach Literaturvorschrift synthetisiert¹⁰⁸ und mittels des entsprechenden Fmoc-Aminosäure-fluorides in den für die Peptidsynthese benötigten Fmoc-Dipeptidbaustein umgewandelt^{109,110}.

5.2.3 α -Aminohexadecansäure

Zur Synthese der α -Aminohexadecansäure wurde das von Marcus Koppitz angewendete Verfahren² der nicht-enantioselektiven Synthese mit anschließender Racemattrennung weiterentwickelt, da für den D-Scan neben der L- α -Aminohexadecansäure auch das entsprechende D-Enantiomere benötigt wird.

Die Ausgangssubstanz ist das Acetamido-diethylmalonat. Dieses wird mit Natrium-ethanolat in Ethanol deprotoniert und mit Tetradecylbromid alkyliert. Das rohe Acetamido-alkyl-diethylmalonat wird nicht isoliert, sondern sofort mit konz. Salzsäure versetzt, hydrolysiert und anschließend als freie β -Dicarbonsäure decarboxyliert. Der beschriebene Zusatz von DMF als Lösungsvermittler¹¹¹ unterbleibt ebenfalls, da keine Veränderung der Reaktionszeit festzustellen ist. Demgegenüber könnte ein 'Animpfen' des Ansatzes mit einem Tensid, am besten wohl mit α -Aminohexadecansäure selbst, die Reaktionszeit verkürzen.

Die Trennung in die Enantiomeren erfolgte durch enzymatische Spaltung der Chloracetyl-derivate¹¹². Diese lassen sich direkt aus der Aminosäure und

Chloracetylchlorid ohne Zusatz von Base erhalten. Als Enzym dient *Aspergillus mellius* Acylase I; Acylase I aus Schweinenieren erkennt die langkettigen Aminosäuren nicht²⁴. Da die für die Spaltung benötigten Lithiumsalze von Aminosäuren mit langem Alkylrest nicht sehr gut wasserlöslich sind, gelingt die enzymatische Spaltung nur bis zur Dodecansäure problemlos¹¹³. Für die α -Aminohexadecansäure muß in großer Verdünnung und mit verlängerter Reaktionszeit gearbeitet werden. Die L- α -Aminohexadecansäure fällt aus, das D-Enantiomere wird durch Hydrolyse des unveränderten Chloracetylderivats gewonnen.

Für Aminosäuren mit noch längerem Alkylrest dürften auch mit dem erweiterten Verfahren bald die Grenzen der enzymatischen Racemattrennung erreicht sein, so daß auf andere Verfahren zurückgegriffen werden muß.

Die Veresterung dieser Aminosäure gelingt nach der allgemein bewährten Methode mit Thionylchlorid in Methanol. Obwohl die Säure auch in Methanol nicht nennenswert löslich ist, erfolgt die Umsetzung nahezu quantitativ. Das Produkt, das Hydrochlorid des Methylesters, kann direkt aus der warmen Reaktionslösung auskristallisiert werden.

Bei der Verwendung zur Fragmentkupplung muß der im Hydrochlorid gebundene Chlorwasserstoff durch ein zusätzliches Äquivalent Base berücksichtigt werden, eine explizite Darstellung des freien Aminohexadecansäuremethylsters ist jedoch für den Erfolg der Kupplung nicht erforderlich.

5.2.4 Andere Harze

Alle Peptidsynthesen wurden mit TCP-Harz der Firma Pepchem, Tübingen, durchgeführt. Dieser hypersäurelabile Träger ist mit der Fmoc-Strategie völlig kompatibel und erlaubt es, vollgeschützte Peptidsäuren für die Fragmentkupplung zu erzeugen. Dies bedeutet jedoch, daß eben dieser letzte

Schritt in Lösung durchgeführt werden muß.

Zur Vermeidung der damit eventuell verbundenen Verluste wurde auch ein Harz mit HMBA-Linker^{114,115} untersucht. Dieser Linker erlaubt die Abspaltung der Peptide durch nukleophile Substitution des Linkers, dabei fallen die Peptide je nach Nukleophil als freie Säure, Amid, Hydrazid, etc., oder im konkreten Fall mit Methanol/DIPEA, als Methylester an. Die so gewonnenen Testpeptide (a1, nativ, übliches Protokoll mit Doppelkupplungen) waren von höchster Reinheit, jedoch mit bemerkenswert schlechter Ausbeute. Die Ursache dürfte darin liegen, daß auch das zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe benutzte Piperidin ein starkes Nukleophil ist, gleiches gilt für in den offenen Syro-Reaktoren unvermeidliche Luftfeuchtigkeit, was bereits während der Synthese zu einem ständigen Verlust der Peptidketten vom Harz führt. Folglich ist das HMBA-Harz für lange Peptide und Syntheseroboter praktisch unbrauchbar, kann jedoch bei kurzen Fragmenten und unter speziellen Bedingungen sehr nützlich sein.

Die Verwendung von Harzen mit einem Sulfonamid – *safty-catch-linker*¹¹⁶ sollte diese Probleme beseitigen und die Vorteile der nukleophilen Abspaltung erhalten können.

5.3 Durchführung der Bioassays

Alle biologischen Tests wurden am Institut für Genetik von Frau Prof. R. Kahmann, LMU durchgeführt.

Zur Durchführung der Pheromon Bioassays mit den Testerstämmen FBD11-7 und FBD12-17 wurden die Zellen dieser Stämme in YEPSL Medium (0.4 % Hefeextrakt, 0.4 % Pepton, 2 % Sucrose) bis zur stationären Phase kultiviert. Anschließend wurde 1:1000 mit PD Medium (2.4 % Potatoe dextrose broth, Difco) verdünnt und bei 28 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bis 0.8 inkubiert (ca. 16h) und die Zellen aus 1 mL dieser Kultur durch Zentrifugieren pelletiert. Dieses Pellet wurde in 500 µL Wasser resuspendiert. 9 µl dieser Zellsuspension wurden mit 1 µL einer Lösung des zu testenden Pheromons

in DMSO versetzt und auf eine PD Platte mit Aktivkohle (2.4 % potato dextrose broth, 1 % gepulverte Aktivkohle, 2 % Agar) getropft. Die Platte wurde dann verschlossen (Abdichten mit Nescofilm/Karlan) und für 24 Stunden bei 22 °C inkubiert.

Die Bildung von Konjugationshyphen bei den haploiden Stämmen FB1 (a1b1) und FB2 (a2b2) wurde wie folgt getestet: Ein Zellpellet wie oben (1 mL Kultur) wurde mit 1 mL frischem PD Medium suspendiert, dem 2.5 µg/mL des betreffenden Pheromons zugesetzt waren, und bei 28 °C für vier Stunden geschwenkt (20 r.p.m.). Nach der Inkubation wurde die Ausbildung von Konjugationshyphen lichtmikroskopisch bestimmt (Zeiss Axiophot).

5.4 Ergebnisse

5.4.1 Konjugationshyphen

Das auf der Ausbildung von Konjugationshyphen beruhende Testsystem wurde exemplarisch an einigen ausgewählten Derivaten getestet. In allen Fällen konnte eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Ergebnis des klassischen Plattentests festgestellt werden (Abbildung 32).

5.4.2 Verkürzungen der Sequenz

Bei beiden Pheromonen lassen sich N-terminal eine oder zwei Aminosäuren deletieren, wobei die erste Deletion keinerlei Einfluß auf die Aktivität hat, während die zweite die Aktivität um eine Größenordnung reduziert. Werden die Sequenzen jedoch noch weiter verkürzt, sind die Derivate völlig inaktiv. Lediglich bei a1-Derivaten, die der postulierten Minimalsequenz entsprechen, scheint wieder eine gewisse Restaktivität aufzutreten, die aber um etwa den Faktor 1000 kleiner ist als die der nativen Sequenz.

Im Gegensatz dazu toleriert keines der Pheromone eine C-terminale Deletion vor dem Membrananker. Beim a1 Pheromon sinkt die Aktivität bei einer deletierten Aminosäure um drei Größenordnungen, a2 wird sofort inaktiv, gleiches gilt für alle anderen Derivate mit C-terminalen Deletionen (Abbildung 32).

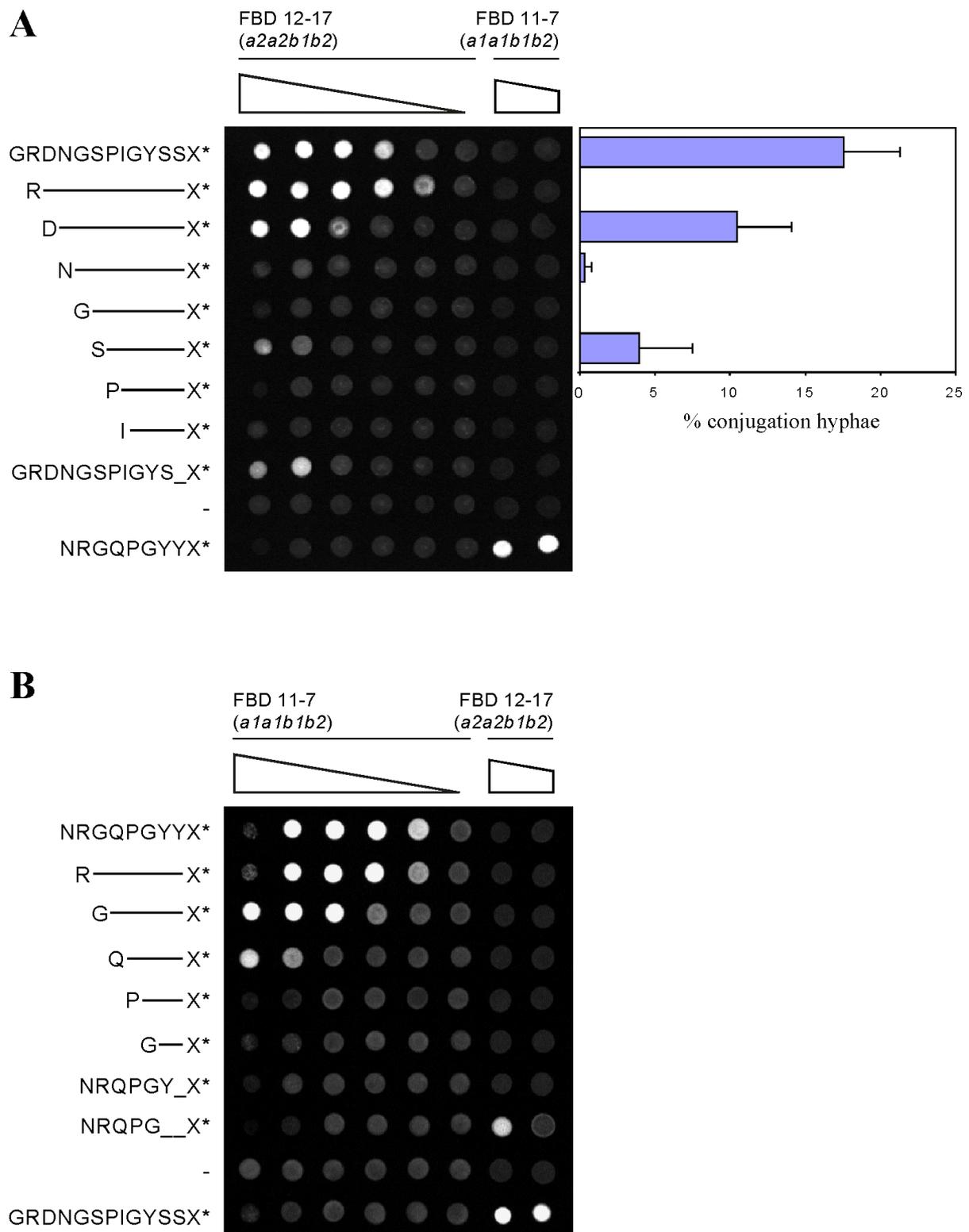


Abbildung 32: Aktivitäten von sequenzverkürzten Pheromonderivaten. Verdünnungsreihen von a1- (A) und a2- (B) Pheromonderivaten wurden mit den Pheromontesterstämmen FBD12-17 und FBD11-7 auf PD Platten mit Aktivkohle untersucht. Kann das Pheromon filamentöses Wachstum auslösen, treten weiße (fuzzy) Kolonien auf. Beim Teststamm FBD12-17 ist die höchste Pheromonkonzentration 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, die niedrigste 2.5 ng/mL . Bei FBD11-7 wurden Konzentrationen von 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ verwendet. X* symbolisiert den C-terminalen Ahd-Methylester. In der vorletzten Reihe wurde jeweils DMSO ohne Pheromonderivate als Nullkontrolle getestet. Oben rechts wurden vier repräsentative Derivate mit dem Konjugationshyphensystem im haploiden FB2-Stamm (*a2b2*) getestet. Die Balken stellen die prozentuale Ausbildung von Konjugationshyphen dar, die Fehlerbalken ergaben sich aus drei unabhängigen Versuchsreihen.

folgende Serin kann wieder problemlos substituiert werden, das entsprechende Derivat scheint sogar hyperaktiv zu sein.

Die beiden folgenden Positionen, Prolin (7) und Isoleucin (8), haben deutlichen Einfluß auf die Pheromonaktivität, ihre Substitution durch Alanin reduziert die Aktivität um eine bzw. zwei Größenordnungen.

Glycin (9) hat maßgeblichen Einfluß auf die Pheromonaktivität, sein Ersatz durch L-Alanin verringert die Aktivität ganz erheblich (auf 0.1%), demgegenüber läßt es sich - im Gegensatz zu Gly (5) - durch D-Alanin substituieren, das entsprechende Derivat ist normalaktiv, evtl. sogar leicht hyperaktiv.

Tyrosin (10) ist absolut essentiell für die Pheromonaktivität. Sein Verlust führt zu Derivaten, die in allen Konzentrationen und Einwirkungszeiten absolut inaktiv sind.

Die beiden folgenden Serine haben keinen Einfluß auf die Pheromonaktivität. Das Ser(12) → Ala-Derivat (#116) scheint sogar hyperaktiv zu sein.

Alle Kombinationen von zwei- und dreifach durch Alanin substituierten Derivaten an den Positionen 1, 6 und 12, die jede für sich zu Hyperaktivität führten, ergaben durchweg Derivate mit normaler oder leicht reduzierter Aktivität. Ein additiver Effekt ist definitiv nicht vorhanden, ebenso scheint es keinen klar erkennbaren Mechanismus für die gegenseitigen Wechselwirkungen der Alanine und ihren Einfluß auf die Aktivität zu geben (ohne Abbildung).

5.4.4 D- und DD-Scan

Läßt man die Störung der Chiralität, die der D-Scan darstellt, vom N-Terminus in die Peptidsequenz hineinwandern, so bewirkt dies einen zunehmenden Aktivitätsverlust. Besonders stark tritt dieser Effekt im

Bereich der Aminosäuren Asn(4) bis Ser(11) auf, hier sind die D-substituierten Derivate um ein bis zwei Größenordnungen weniger aktiv. Erst am C-Terminus bei Serin (12) und Ahds spielt die Chiralität wieder eine geringere Rolle. Die Derivate des DD-Scans zeigen ein ähnliches Bild, das im allgemeinen der ‚Summe‘ der Wirkungen der jeweiligen Einzelsubstitutionen entspricht. Im Bereich des N-Termins zeigen diese massiv strukturbrechenden Substitutionen nahezu keine Wirkung. Im Bereich zwischen Glycin (5) und dem C-Terminus sind jedoch praktisch alle Derivate inaktiv (Abbildung 34).

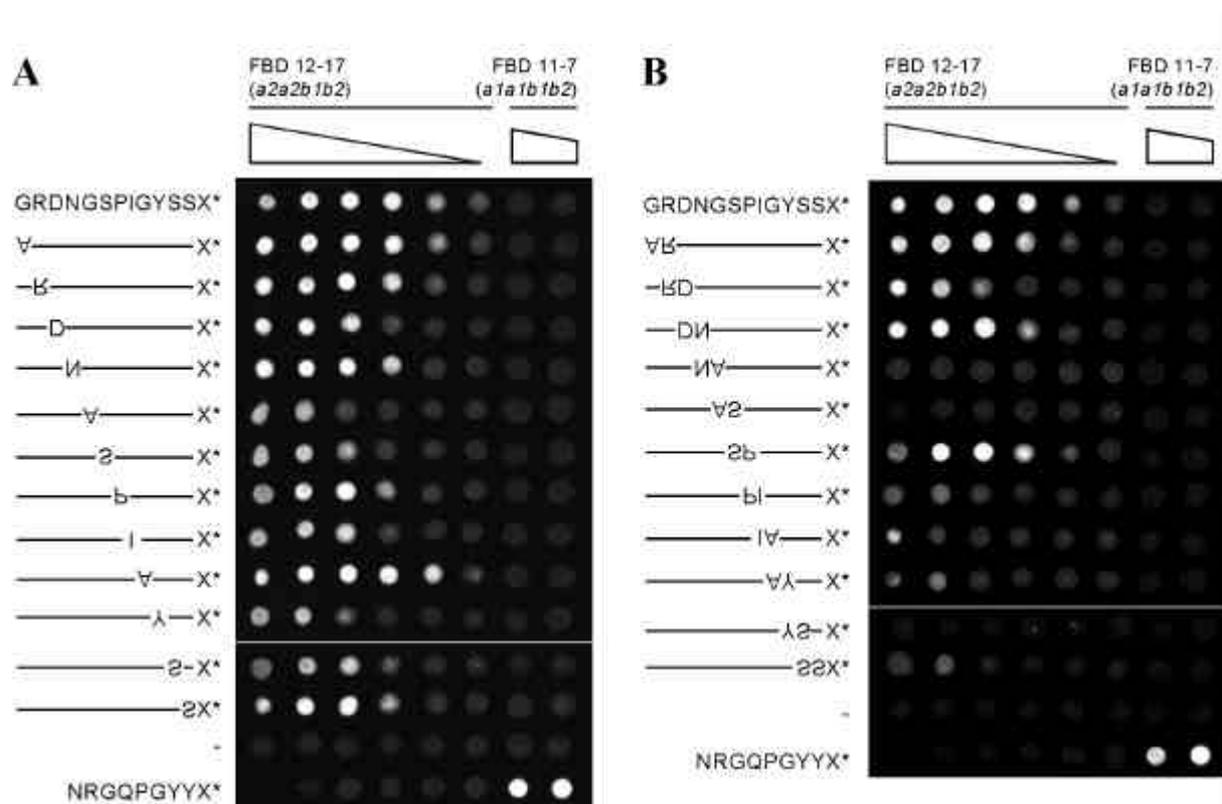


Abbildung 34: Verdünnungsreihen von a1-Derivaten, bei denen Aminosäuren einzeln (A) oder paarweise (B) durch ihre D-Analoga substituiert wurden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden bei der Beschriftung die D-Aminosäuren durch auf dem Kopf stehende Buschstaben symbolisiert.

Es gibt jedoch zwei bemerkenswerte Ausnahmen: Die eine ist die bereits erwähnte Gly(9) Substitution durch D-Ala, das entsprechende Derivat ist sogar hyperaktiv. Demgegenüber sind beide DD-Derivate, die außer der Gly(9) → D-Ala - Substitution noch eine der benachbarten Aminosäuren betreffen, völlig inaktiv.

Phenylalanin, 4-Fluoro-phenylalanin, Pentafluoro-phenylalanin und auch Cyclohexylalanin problemlos toleriert, die letzten beiden Derivate sind sogar hyperaktiv. Demgegenüber führen Substitutionen mit 4-Methoxy-phenylalanin [Tyr(Me)] und 4'-Hydroxy-cyclohexylalanin zu völligem Aktivitätsverlust. Polare Ringe (4-Pyridyl-alanin) und kleinere Ringe (4-Thiazolylalanin) führen zu verminderten Aktivitäten, die Effekte sind additiv (His). Alle anderen Substitutionen mit natürlichen Aminosäuren (inclusive Hydroxy-prolin) lieferten völlig inaktive Derivate (Abbildung 35).

5.4.6 Sonstige Derivate

Neben diesen Tests wurden noch einige Spezialderivate synthetisiert, um bestimmte Aspekte abzuklären. Dazu gehören N-terminal Fluorescein-gelabelte $\alpha 1$ Pheromonderivate, die voll aktiv sind, selbst wenn das Label nicht am N-terminalen Glycin eingeführt wurde, sondern an einer um eben dieses verkürzten Sequenz. Ebenso konnte $\alpha 2$ bei nativer Aktivität mit Fluorescein gelabelt werden.

Prolin (7) wurde durch L-2,2-Dimethyl-4-thiazolyl-carbonsäure [Cys($\Psi^{Me,Me}$ -Pro)] substituiert, welche die Peptidbindung völlig in die cis-Konformation bringt¹¹⁷, das entsprechende Derivat ist normal aktiv, ebenso ein Derivat, bei dem Serin (6) durch Valin substituiert wurde, um zu überprüfen, ob solch voluminöse Seitenketten wie auch bei Cys($\Psi^{Me,Me}$ -Pro) in dieser Region toleriert werden können.

Da Derivate mit N-terminalem Alanin hyperaktiv waren, wurde als weitere, noch lipophilere Aminosäure Isoleucin eingebaut, was jedoch keine gesteigerte Aktivität ergab. Auch C-terminal wurden einige andere lipophile Membrananker mit längeren Alkylketten als Ahds getestet, die jedoch allesamt inaktiv waren (ohne Abbildung).

5.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren durch Pheromone und die resultierende Signaltransduktion in Pilzen ist von allgemeinem Interesse als hervorragendes Studienmodell für die Verhältnisse zwischen Liganden und Antagonisten. Etwa die Hälfte aller modernen Medikamente zielen auf derartige Rezeptorsysteme¹¹⁸, darüber hinaus sind diese Rezeptoren bei einer Reihe von Erbkrankheiten ebenfalls involviert¹¹⁹. Zusätzlich stellt auch die Prenylierung der Pheromone ein wichtiges Studiengebiet dar, wie das Beispiel des kleinen G-Proteins *ras* zeigt^{120,121,122}.

Diese Arbeit dürfte die detaillierteste systematische Analyse sein, die bisher an einem Pilz - Lipopeptidpheromon durchgeführt wurde. Der verwendete Testorganismus *Ustilago maydis* ist dabei besonders geeignet, um den Funktionsmechanismus der Lipopeptid - Pheromone aufzuklären, da hier im Gegensatz zu den Hemiascomyceten wie etwa *S. cerevisiae* oder *S. pombe* nur C-terminal modifizierte Peptide als Pheromone vorkommen. Dies ähnelt den komplexeren Systemen der höheren Basidiomyceten, z. B. *C. cinereus* oder *S. commune*. Doch im Gegensatz zu diesen höheren Basidiomyceten, bei denen die der Pheromone Untersuchungen mangels eines geeigneten Testsystems hauptsächlich in *S. cerevisiae* durchgeführt wurden^{123,124,125}, bot *Ustilago maydis* die Möglichkeit, die Pheromone im homologen System zu untersuchen^{1,2}. Da beide Pheromone identisch prenyliert sind und die Rolle dieser Lipidmodifikation als Membrananker bereits bekannt war, konnte nun der Peptidteil der Pheromone systematisch untersucht werden.

Für diese Untersuchungen wurden alle Derivate synthetisch hergestellt. Dies macht das Testergebnis ausschließlich von der Pheromon-Rezeptor-Interaktion abhängig und umgeht somit alle eventuellen Effekte, die die veränderte Aminosäuresequenz im Rahmen der Peptidprozessierung und Sekretion verursachen könnte. Darüber hinaus wird natürlich nur so der Einbau unnatürlicher Aminosäuren möglich.

Aus den durchgeführten Untersuchungen ergaben sich eine Reihe von Schlussfolgerungen:

Zunächst fiel auf, dass keines der Derivate seine Spezifität änderte. Zwar erzeugten zwei der Derivate scheinbar positive Reaktionen bei der jeweiligen Gegenkontrolle, dies aber nur bei höchster Konzentration. Beim Konjugationshyphentest zeigte sich, dass die Zellen keine Konjugationshyphen ausbilden, dafür aber eine sehr ungewöhnliche Morphologie zeigen. Es dürfte sich somit wohl um eine Streßreaktionen handeln, jedoch mit Sicherheit nicht um eine echte Kreuzreaktivität. Ebenso dürfte das offensichtliche Fehlen von *fuzzy*-Kolonien bei hohen Konzentrationen von Pheromonderivaten, die in geringerer Menge eindeutig positive Resultate ergeben, ebenfalls auf Streß zurückzuführen sein. Nachdem also keine Spezifitätsänderung zwischen a1 und a2 beobachtet wurde, kann die Pheromonerkennung durch Pra1 oder Pra2 nicht von einzelnen Aminosäuren abhängig sein, sondern muß in grundlegenden Unterschieden der gesamten Strukturen zu suchen sein.

Die N-Termini sind deutliche weniger empfindlich gegenüber Variationen als die C-Termini. Dies stellt eine Analogie zu den Ergebnissen dar, die für den **a**-Faktor von *S. cerevisiae* und zu den Lipopeptidpheromonen von *U. hordei* erhalten wurden^{126,127}. Auch in diesen Fällen konnte die ersten beiden Aminosäuren ohne nennenswerten Aktivitätsrückgang deletiert werden. Im Falle der *Ustilago maydis*-Pheromone ist dies keine triviale Beobachtung, da beide Pheromone, die ja mit homologen Rezeptoren interagieren, sich in ihrer Länge bereits um vier Aminosäuren unterscheiden.

Diese cis – Peptidbindung zwischen Ser(6) und Pro (7) des a1-Pheromons wurde bereits von Markus Koppitz postuliert, nachdem diese Bindung schon in Lösung zu 5% in der cis-Konformation vorliegt. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurde zuerst ein Derivat mit einer Val-Pro Sequenz synthetisiert, um zu überprüfen, ob in diesem Bereich voluminöse Substituenten toleriert werden können. Da diese Substitution die Aktivität – wenn überhaupt – nur minimal verminderte, wurde im zweiten Schritt Prolin durch L-2,2-Dimethylthiazol-4-carbonsäure ersetzt. Dieses Pseudoprolin

bringt die Peptidbindung zu 100% in die cis-Konformation. Und auch dieses Derivat ist voll aktiv, was ein deutlicher Hinweis auf das tatsächliche Vorhandensein einer cis-Bindung im rezeptorgebundenen Pheromon ist. Weiter unterstützt wird dies durch die Ergebnisse des D- und DD-Scans. Haben Ser(6) und Pro(7) alternierende Stereochemie, so sind die Derivate kaum aktiv, liegen beide Aminosäuren jedoch in derselben Konfiguration vor (LL oder DD), so ist das DD-Derivat ebenso aktiv wie das native. Bei gleicher Chiralität liegt das Peptid-*backbone* vor und nach der cis-Bindung etwa in einer Ebene, bei alternierender Chiralität ergibt sich dagegen eine ‚windschiefe‘ Anordnung, was im Falle des rezeptorgebundenen Peptides einer Fehlfaltung, beziehungsweise Fehlorientierung des Pheromons gleichkommt.

Die systematische Analyse zeigt, daß die beiden internen Glycine wichtig für die Funktionalität sind. Dabei kann Glycin (9) durch D-Alanin ersetzt werden, bei Glycin (5) wird keine wie auch immer orientierte Seitenkette toleriert. In Analogie zum α - and a-Faktor von *S. cerevisiae* kann man davon ausgehen, daß Glycin(9) die $i+1$ Position eines β II' turns einnimmt^{128,129,130,131}. Dies wird besonders dadurch gestützt, daß beide Derivate des DD-Scans, bei denen eine diesem Glycin – beziehungsweise D-Alanin – benachbarte Aminosäure ebenfalls D-substituiert ist, völlig inaktiv sind. Überhaupt scheint das gesamte Peptid-*backbone* zwischen Asn(4) und Ser(11) in einer sehr definierten Anordnung vorliegen zu müssen, wie die empfindlichen Reaktionen auf D-Substitution und erst recht auf die noch wesentlich stärker strukturbrechenden DD-Substitutionen zeigen. Demgegenüber dürfte der N-Terminus relativ frei sein, auch der äußerste C-Terminus scheint nicht so strikt orientiert zu sein wie die zentralen Molekülbereiche.

Wurde das N-terminale Glycin durch Alanin gleich welcher Chiralität ersetzt, ergaben sich hyperaktive Derivate. Doch konnte dieser Effekt mit anderen Lipophilen (Gly \rightarrow Ile) oder Fluorescein nicht reproduziert werden.

Auch C-terminal wurden einige Membranlinker eingesetzt, die noch

lipophiler sind als Ahds. Überraschenderweise waren alle diese Derivate inaktiv, obwohl MARKUS KOPPITZ gezeigt hatte, das mit zunehmender Kettenlänge bis hin zu Ahds die Aktivität der Derivate immer mehr zunimmt. Als Ursache für dieses Verhalten kann man irreversible Adsorption der lipophilen Peptide an die im Medium enthaltene Aktivkohle diskutieren, ebenso wäre denkbar, daß die Peptide Micellen bilden und mit zunehmender Kettenlänge die cmc (critical micelle concentration) und somit die Konzentration freier Pheromonmoleküle unter den für eine Stimulation benötigten Minimalwert absinkt. Eher unwahrscheinlich bei der Flexibilität der Kohlenwasserstoffketten ist die dritte Möglichkeit, dass die Lipidanker nicht weit genug in die Membran eindringen¹³² und somit den Peptidteil ‚zu hoch‘ fixieren.

Die aromatische Aminosäure in Position 10 des a1 Pheromons ist essentiell für die Aktivität. Die detaillierte Untersuchung dieser Position zeigte, daß hier ein unpolares, sechsgliedriges Ringgerüst für die Aktivität erforderlich ist, das besonders in Hinblick auf Substituenten strikte Volumenrestriktionen einhalten muß. Kleine, unpolare Substituenten werden toleriert (4-Fluoro-Phe^{133,134}, Pentafluoro-Phe) ebenso kann der Aromat durch einen Cyclohexanring ersetzt werden, was sogar zu Hyperaktivität führt. Aber schon Methylierung der OH-Gruppe im Tyrosin oder auch nur das Einführen einer solchen im Cyclohexanring führt zur Inaktivität. Kleinere und/oder polarere Ringe (4-Thiazolyl-Ala, 4-Pyridyl-Ala, His) führen ebenfalls zu geringerer Aktivität, was ebenfalls für eine exakt angepasste, lipophile Bindungstasche spricht.

Bei der Untersuchung des Tyrosins war zu Anfang nicht klar, ob dessen Interaktion mit dem Rezeptor auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht, oder ob eventuell auch eine Wasserstoffbrücke beteiligt ist. Dies kann jedoch durch das Verhalten der polaren Derivate, die zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken fähig wären, ausgeschlossen werden.

Basierend auf diesen Daten kann man für das a1 Pheromon folgendes Modell aufstellen, nach dem der Rezeptor eine Bindungstasche ausbildet, in die das Pheromon nach einem *induced fit* Mechanismus gebunden wird². Im Verlauf der Insertation in den Rezeptor wird das in Lösung als *random coil* vorliegende Molekül durch Ligand-Rezeptor-Interaktionen in eine definierte Struktur mit einer cis Peptidbindung und einem β II' turn gefaltet (Abbildung 36).

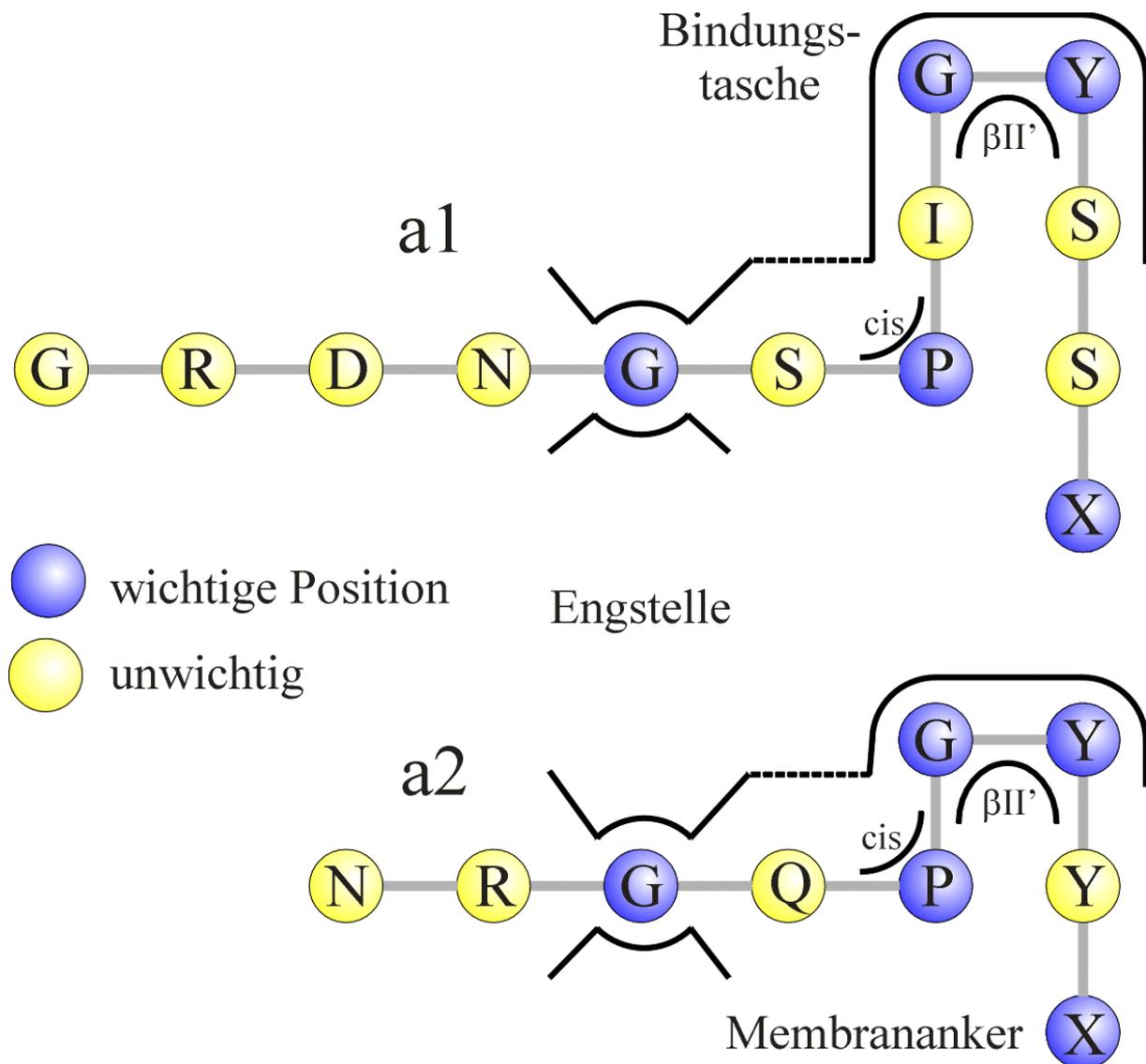


Abbildung 36: Modell für die Struktur der Pheromone im rezeptorgebundenen Zustand. Prolin erleichtert die Bildung einer cis-Peptidbindung, Glycin die eines β II'-turns. Beide Pheromone werden in der Rezeptortasche durch internes Glycin und den Membrananker in völlig analoger Weise fixiert, was letztendlich durch die sehr definierte Struktur den exponierten Tyrosinrest in die richtige Position bringt. Der entscheidende Unterschied zwischen den Pheromonen ist hierbei nur die Tiefe der jeweiligen Rezeptortasche.

Dabei unterstützen die speziellen Eigenschaften bestimmter strukturinduzierender Aminosäuren die Faltung. So liegt bei der Ser(6)-Pro(7) Bindung schon in Lösung zu 5 % eine cis-Konformation vor und Glycin begünstigt die Ausbildung eines β II' turns^{135,136}, was den aromatischen Rest der nachfolgenden essentiellen Aminosäure Tyr(10) in die exponierte $i+2$ Position bringt. Die Bedeutung der exakten Positionierung der C-terminalen Aromaten für die Spezifität zeigt sich besonders am Beispiel des Phb3.2 - Pheromons von *C. cineris* (Tabelle 3). Wird hier die native Anordnung Phe(12)-Trp(13) durch Trp(12)-Phe(13) ersetzt, so führt dies zu einem Spezifitätswechsel^{137,138}.

Glycin (5) scheint ein kritischer Punkt in der Rezeptor-Ligand Interaktion zu sein, da hier keinerlei Seitenketten toleriert werden. Dies deutet eher auf eine Engstelle als auf einen turn. Eventuell wird hier das Peptid-*backbone* fixiert, was über den mit der cis-Bindung verbundenen Knick den β II' turn und damit den aromatischen Rest in die endgültige Position bringt, in der dann die Rezeptoraktivierung erfolgt. Dabei scheint sich die Fixierung des *backbones* über einen etwas größeren Bereich zu erstrecken, da der N-Terminus nicht um mehr als zwei Aminosäuren verkürzt werden darf, doch scheint dieses Glycin eine Art Zentrum für die Fixierung darzustellen.

Beim $\alpha 1$ Pheromon konnten als wichtige Strukturmerkmale in der Peptidsequenz die Aminosäuren Gly(5), Pro(7), Gly(9)-Tyr(10) und natürlich der Ahds-Membrananker erkannt werden. Alle diese Aminosäuren tauchen in exakt derselben Reihenfolge auch im $\alpha 2$ Pheromon auf. Der einzige Unterschied zwischen den Pheromonen besteht darin, daß sich beim $\alpha 1$ ein zusätzliches Ile zwischen Pro und Gly-Tyr befindet und auf der anderen Seite des β II' turns ein zusätzliches Ser zwischen Gly-Tyr und dem Membrananker. Nachdem beim $\alpha 1$ Pheromon gezeigt werden konnte, daß zumindest die Serine nur die Aufgabe eines (wenngleich essentiellen) Spacers erfüllen, könnte man daraus schließen, daß diese beiden Aminosäuren, Ile und Ser, den β II' turn des $\alpha 1$ Pheromons um genau diese Länge tiefer in der Rezeptortasche plazieren, als dies beim $\alpha 2$ Pheromon der Fall ist, dem diese Abstandshalter zu beiden Seiten des β II' turns fehlen

(Abbildung 36). Dies ergibt eine postulierte Pheromonstruktur, in der eine cis-Bindung und ein β -turn sehr eng benachbart sind, dies ist jedoch nichts ungewöhnliches, da sich beide Strukturelemente sogar durchdringen können, wie beim Pseudo- β I-turn¹³⁹ oder auch beim β IV-turn¹⁴⁰. Abgesehen von diesem einen Unterschied in der Bindungstasche ist die generelle Faltung beider Pheromone identisch, was die relativen Positionen der Glycine an der Engstelle, der cis-Bindung und dem Membrananker angeht. Weiterhin wird die effektive Längendifferenz der beiden Pheromone durch die zwei Spacer-Aminosäuren des a1-Pheromons auf nur noch zwei Aminosäuren reduziert. Zusammen mit der Tatsache, daß die Pheromone mit hochgradig homologen Rezeptoren interagieren, stellt dies ein weiteres, interessantes Detail im Gesamtmodell dar.

Die Unterscheidung zwischen a1 und dem a2 Pheromon wird dabei durch die relative Lage der Tyrosinreste in der jeweiligen Rezeptortasche erreicht. Rezeptorgebundenen a1 taucht tiefer in die Tasche ein, bzw. benötigt eine tiefere Tasche als a2. Die Spezifität wird bei diesen beiden Pheromonen dadurch garantiert, daß a2 in der i+1-Position des β II' turns ein Glycin (bzw. eine D-Aminosäure) benötigt, wo in der Sequenz von a1 ein L-Tyrosin ist, und umgekehrt. Schon dies allein macht es für die Pheromone - oder deren Derivate - unmöglich, die Spezifität zu wechseln, ganz abgesehen davon, daß solche Fehlorientierungen durch die Fixierung des N-Terminus bereits im Vorfeld verhindert werden (Abbildung 37, Seite 88).

Im Rahmen dieses Gesamtmodells für die Funktionsweise der beiden Pheromone gibt es noch einige Details, auf die nun näher eingegangen werden soll:

Immer wieder fielen einzelne Derivate auf, die um eine Größenordnung hyperaktiv waren, niemals jedoch um mehrere. Es ist denkbar, dass diese Mindestkonzentration eine Art Schwellenwert darstellt. Somit wäre eine Mindestanzahl Pheromonmoleküle erforderlich, um die benötigte Zahl von Rezeptoren zu aktivieren, so daß es unabhängig von noch besserer Rezeptorbindung immer dieser Minimalkonzentration bedarf, um den

Übergang zum filamentösen Wachstum auszulösen. Klarheit könnten hier nur Versuche mit kürzerem und damit weniger lipophilen Lipidanker bringen. Dadurch reduziert sich der Effekt der Membrananreicherung, was einer Ausschaltung der vorgeschalteten *low affinity/high capacity* Bindung entspricht, und die tatsächliche Rezeptor-Ligand-Affinität könnte stärker in den Vordergrund treten (vgl. GUGGENHEIM-Modell, 2.3.1).

Einige Beobachtungen, die anhand der Daten von RÜDIGER NEEF'S Zufallsmutagenese erhalten wurden, seien ebenfalls noch erwähnt. Nach diesen Daten kann Ser(12) nicht ohne Aktivitätsverlust durch lipophile Aminosäuren ersetzt werden, entsprechende synthetische Derivate mit Alanin an dieser Position sind demgegenüber sogar leicht hyperaktiv. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß der CaaX-Box zur korrekten Prozessierung eine polare Aminosäure vorangehen muß. In allen Sequenzen, die in den Literaturstellen^{141,142} angegeben sind, ist der CaaX-Box immer eine saure, basische oder polare Aminosäure vorangestellt, nur sehr selten Alanin oder Prolin, niemals jedoch andere lipophile Aminosäuren. Ebenso in Zusammenhang mit der Prozessierung der CaaX-Box könnte auch die Tatsache stehen, daß eine Ser(6)→Cys Mutante inaktiv ist, im Gegensatz zu den synthetischen Derivaten, die hier Ala oder Val tolerieren. Hier könnte die native Sequenz (G)CPGY als CaaX mißinterpretiert werden, so daß der entsprechende Mutationsstamm nur den N-Terminus des Pheromons mit der für die Sekretion verantwortlichen Steuersequenz aus der Zelle transportiert, während der der Minimalsequenz entsprechende C-Terminus in der Zelle verbleibt.

Es wird in der Zukunft wichtig sein, die Regeln der Pheromon-Rezeptor-Erkennung zu verstehen. Dies gilt besonders für die höheren Basidiomyceten, bei denen tausende von verschiedenen Kombinationen unterschieden werden müssen. Ebenso kann mit diesem Rüstsatz vielleicht erklärt werden, warum beim humanen Pathogen *C. neoformans* das sexuelle Stadium so eng an die Virulenz dieses Organismus geknüpft ist^{143,144}, oder warum etwa der a-Faktor von *S. cerevisia* Einfluss auf die Pathogenität des

Reis-Schädling *Magnaporthe grisea* nimmt¹⁴⁵. Einige der an dieser Erkennung beteiligten strukturellen Bauelemente konnten im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert werden. Vergleicht man eine Reihe von bekannten, C-terminal prenylierten Pheromonen, so zeigen fast alle wenigstens eines der obigen Merkmale, also interne Glycine, Proline und C-terminale Aromaten, wenn nicht sogar Glycin-Aromat Baugruppen oder zumindest große, lipophile Aminosäuren in dieser Region (Tabelle 3).

Bezeichnung	Sequenz ^a	Herkunft	Literatur
a	YI K GLFWDPAC ^b	<i>S. cerevisiae</i>	146
M	YTPKVPYMC ^b	<i>S. pombe</i>	147
a1	GRDNG <u>S</u> PIGYSSC ^b	<i>U. maydis</i>	1
a2	NRGQPGYYC ^b	<i>U. maydis</i>	1
Rhodotorucine A	Y <u>P</u> EISWTRNGC ^b	<i>R. toruloides</i>	148
Tremerogen A10	EHD <u>P</u> SAPGNGYC ^b	<i>T. mesenterica</i>	149
Tremerogen A13	EGGGNR <u>G</u> DPSGVC ^b	<i>T. mesenterica</i>	149
Tremerogen A9291-1	DSGGSRD <u>P</u> GASSGGC ^b	<i>T. brasiliensis</i>	150
Mfa1	QEA <u>H</u> PGGMTLC ^c	<i>C. neoformans</i>	144
MF1-1	AGARAG <u>P</u> IHYC ^c	<i>M. grisea</i>	151
MF2/1	NSSMGVNGYSYC ^c	<i>C. parasitica</i>	152
Phb1.2	ERHL <u>G</u> FTTKGFC ^c	<i>C. cinereus</i>	14
Phb2.1	ERAG <u>P</u> GDTPGGF ^c	<i>C. cinereus</i>	14
Phb2.2	ERYNANKAYAWC ^c	<i>C. cinereus</i>	14
Phb3.1	DRRL <u>P</u> D ^S YYGGAC ^c	<i>C. cinereus</i>	14
Phb3.2	ERRTH <u>G</u> GNLTFWC ^c	<i>C. cinereus</i>	14
Bap1(1)	ERE <u>G</u> GSDCTAWC ^c	<i>S. commune</i>	11
Bap1(2)	DRSCVEREGC ^c	<i>S. commune</i>	11
Bap1(3)	ER <u>P</u> GGSNCTAWC ^c	<i>S. commune</i>	11
Bbp1(1)	EHWR <u>G</u> GNTTAHGWC ^c	<i>S. commune</i>	11
Bbp1(2)	NHDQIADY <u>G</u> SYC ^c	<i>S. commune</i>	11
Bbp1(3)	EHT <u>E</u> AGEETTARGWC ^c	<i>S. commune</i>	11

Tabelle 3: Aminosäuresequenz von Lipopeptid-Pheromonen. a) C-terminale Aromaten (bzw. lipophile Aminosäuren) und Glycin-Aromat-Motive sind **fett** hervorgehoben, zentrale Glycine sowie Proline unterstrichen. b) experimentell bestätigte Aminosäuresequenz. c) vorhergesagte Aminosäuresequenz.

Man kann mit der gebotenen Vorsicht davon ausgehen, daß die Erkennung einer Vielzahl von Pheromonen nach dem *induced fit* Mechanismus abläuft, wobei strukturinduzierende Aminosäuren bei der Faltung assistieren können, jedoch nicht zwingend erforderlich sind, da zum Beispiel jede Peptidbindung in der cis-Konformation vorliegen werden kann^{153,154,155,156}, und auch andere β -turn-Subtypen nicht auf Glycin in der i+1 Position angewiesen sind¹⁵⁷. Doch auch wenn sich solche für die Strukturbildung

günstigen Aminosäuren in den Pheromonen evolutionär konserviert haben sollten, so muß nicht jede einzelne davon wirklich die ihr angerechnete Rolle erfüllen, kann also im betreffenden Pheromon auch rein zufällig an ihrer Position sitzen.

Gleichwohl zeigen Untersuchungen am α -Faktor der Hefe, daß sich dieser ähnlich den *Ustilago maydis*-Pheromonen verhält. N-terminal können einige Aminosäuren deletiert werden, wobei die Aktivität absinkt, und auch Gly(5) im α -Faktor konnte durch D-Alanin ersetzt werden, was auch hier auf einen β -Turn hindeutet. Dies wurde noch durch die Synthese eines Lactams, das durch Verknüpfung der Positionen 4 und 5 des Pheromons einen β II' turn induziert, unterstützt. Und auch wenn bei einem die Arten übergreifenden Vergleich einige Zurückhaltung angebracht ist, so kann man diese Übereinstimmung durchaus als eine gewisse Bestätigung für das hier aufgestellte Modell betrachten.

Zusätzlich gelang es durch die Bereitstellung synthetischer Pheromone, *Ustilago maydis* auf entsprechend behandelten Kulturmedien gezielt und wesentlich besser reproduzierbar zu stimulieren, was einen erheblichen Fortschritt für die Forschung mit diesem Pilz bedeutet. Durch Einsatz synthetischer Pheromone gelang es, einige 'theoretisch mögliche' Versuche reproduzierbar durchzuführen, die durch Co-Kultur mit pheromonliefernden Stämmen bislang nicht gelungen waren (persönliche Mitteilung von P. Müller/ AG Kahmann).

5.6 Ausblick

Basierend auf den hier vorgestellten Ergebnissen eröffnen sich nun eine Reihe von Perspektiven. Es sollte nun möglich sein, gezielt und zur Überprüfung obiger Hypothese, die Spezifität der Pheromone zu verändern. So kann man beim α_1 Pheromon Ile und Ser deletieren, das resultierende Derivat sollte dann theoretisch α_2 – spezifisch sein, ebenso kann α_2 um eben diese Spaceraminosäuren zu beiden Seiten des β -turns erweitert werden, was eine

a1 Spezifität ergeben sollte.

Basierend auf der These, daß a1 ein L-Tyr an der Stelle benötigt, wo sich bei a2 ein D-Aminosäureäquivalent befinden muss, könnte sich auch die Möglichkeit auf tun, durch Einbau von Azapeptid-Bausteinen, die sowohl i+1 im β II' turn stehen¹⁵⁸, als auch L-ähnlich reagieren können, ein bispezifisches Molekül zu synthetisieren.

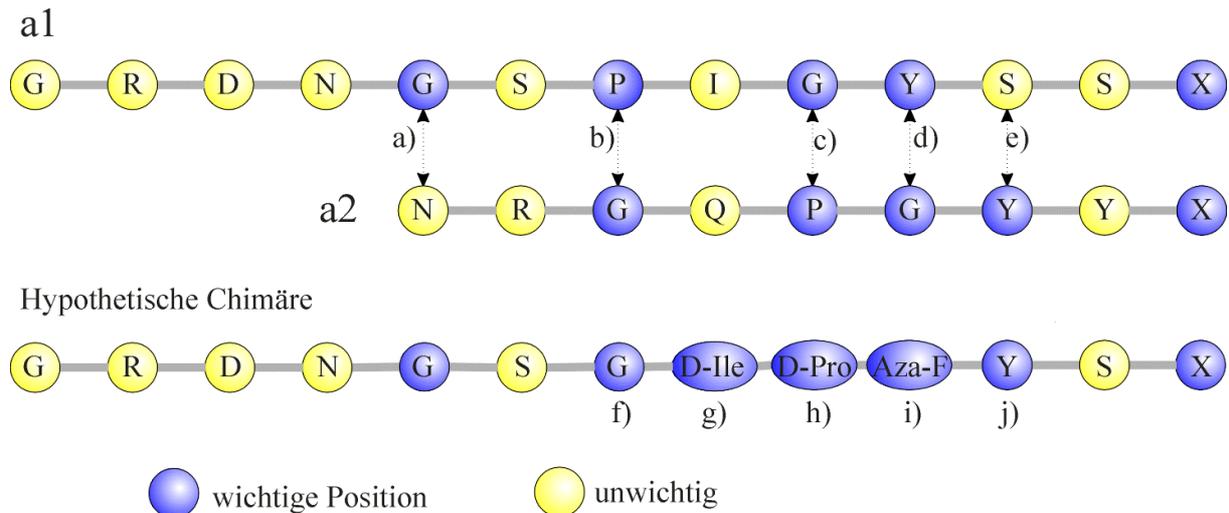


Abbildung 37: Spezifitätskriterien der Pheromone. Die strikte Unterscheidung zwischen a1 und a2 erfolgt über eine ganze Reihe von strukturellen Elementen: a) Engstelle in a1 erfordert Glycin. b) a1 benötigt Prolin zur Induktion der die cis-Bindung, Engstelle bei a2 erfordert Gly. c) a1 benötigt D-Äquivalent für β -turn, a2 ein (L-) Pro für die cis-Bindung! d) a1 braucht L-Tyr, a2 ein D-Äquiv. für den β -turn! e) a2 benötigt Tyr, a1 beliebig. Eine hypothetische Chimäre müßte folgende Bedingungen erfüllen: f) Gly – jede Bindung kann in cis-Form vorliegen, aber nur Gly hat keine Seitenketten. g) Dieselbe Chiralität wie das nachfolgende Pro. h) D-Pro, günstig für cis wie auch β -turn. i) Azaaminosäuren können sowohl i+1 im β -turn einnehmen als auch L-Eigenschaften zeigen. j) a2 benötigt Tyr.

Und zuletzt besteht natürlich nun die Möglichkeit, gezielt cyclische Peptide zu synthetisieren, die per se, durch Einbau von β -turn-Mimetika oder durch Strukturen, die ihrerseits β -turns erzeugen, Konformationen einnehmen, die dem des Pheromons im Rezeptor ähneln und somit aktiv sind. Dies könnte im weiteren Verlauf die Möglichkeit eröffnen, durch NMR-Strukturanalyse dieser starren Peptide weitere Einsichten in den Aufbau der zugehörigen Rezeptoren zu gewinnen.

6 Zusammenfassung

Die beiden Inkompatibilitätsloki von *Ustilago maydis* stellen hochinteressante Studienobjekte für die Erforschung von Mechanismen der molekularen Interaktion dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl das Pheromon – Rezeptor – System des a-Lokus als auch die regulatorischen Proteine des b-Lokus untersucht. So verschieden, wie diese Loci waren, so verschieden waren auch die jeweils angewendeten Mittel. Diese reichen von gänzlich molekularbiologischen Ansätzen bis hin zur rein organischen Synthesechemie. Doch in allen Fällen waren es nicht die klassischen Methoden alleine, sondern immer deren Kombination zu einer interdisziplinären Arbeitsweise, die die Durchführung der Arbeit in dieser Form überhaupt erst ermöglichte.

Die am Pheromon – Rezeptor – System des a-Lokus durchgeführten Arbeiten sind nach bestem Wissen die bislang ausführlichsten auf diesem Gebiet. Es ist gelungen, nahezu alle Aspekte der Interaktion zwischen den beteiligten Partnern aufzuklären. Darüber hinaus konnten auch die Unterscheidungskriterien bestimmt werden, die für die Selektivität der Pheromonerkennung verantwortlich sind.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein umfassendes Modell entwickelt, das beschreibt, wie die Pheromone durch einen *induced fit* - Mechanismus in die Rezeptoren eingepasst werden und wie während dieses Bindungsvorgangs durch eine ganze Reihe von strukturellen Unterschieden die Selektivität der Pheromone sichergestellt wird. Alle Aminosäuren, die zur Ausbildung dieser strukturellen Merkmale beitragen, konnten identifiziert und bezüglich ihrer Funktion charakterisiert werden.

Auf dem Weg von den Genen zur Proteinprobe für die NMR-Strukturaufklärung konnten eine ganze Reihe von Eigenschaften der b-Proteine charakterisiert werden. Es gelang auch, zum Teil die Methoden der Proteinpräparation selbst zu erweitern bzw. zu ergänzen. Die hochlipophilen

und dadurch hartnäckig unlöslichen Proteine konnten durch *detergent mediated refolding*, sowie durch simultane Co-Expression solubilisiert werden. Dabei wurde eine zuvor nur vage vermutete Dimerisierung der Homöodomäne erstmals nachgewiesen und als antiparallele Dimerisierung identifiziert. Somit liegen die b-Proteinkomplexe *in vitro* und *in vivo* als $(bE)_2/(bW)_2$ - Tetramer vor.

Ebenso konnte ein Modell der Protein – Micellen – Wechselwirkung entwickelt werden, das die bisher gemachten, scheinbar widersprüchlichen Beobachtungen auf diesem Gebiet einheitlich zu erklären vermag. Mit den Methoden der organischen Chemie konnte auch die Inteinspaltung verbessert werden. Diese Proteinspaltung wird in der Biochemie zur Proteinreinigung benutzt, war aber bisher nicht immer erfolgreich.

Die organische Peptidsynthese erbrachte auch durch die hier dargestellten Homöodomänen-Peptide einige Anhaltspunkte über die Rolle der nicht durch Komplexierung maskierten, lipophilen Domänen in der Proteinaggregation. Die Probleme, die im Zuge dieser Synthesen durch Peptidaggregation auftraten, wurden zwar nicht endgültig gelöst, aber immerhin konnten hier auch einige neue Ansätze zur Silylierung des Peptid-*backbones* erarbeitet werden.

Ebenfalls im Bereich der organischen Synthesechemie wurde ein Detergenzien – Baukasten entwickelt, der ausgehend von einfachen Edukten den schnellen Zugang zu einer großen Bibliothek mit Molekülen maßgeschneiderter Eigenschaften eröffnet.

Die endgültige Solubilisierung der b-Proteine gelang parallel zu diesen Synthesearbeiten durch simultane Co-Expression. Dieses Verfahren bietet eine Reihe von Vorteilen. Beispielsweise liefert die Co-Expression statt einem durch Micellenanbindung solubilisierten Einzelprotein den vollständigen Komplex aller Partner. Weiterhin stellen Micellen im Rahmen der NMR-Spektroskopie nur störenden Ballast dar. Daher wurde der synthetische Lösungsweg zugunsten der Co-Expression verlassen.

Insgesamt ist es gelungen, alle Schwierigkeiten im Zusammenhang mit der Proteinexpression und Reinigung zu lösen und die b-Proteine in guten

Ausbeuten und mit allen gewünschten Isotopenmarkierungen zur Verfügung zu stellen. Auch in Bezug auf Löslichkeit und Stabilität sind diese Proteine aussichtsreiche Kandidaten für die Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie. Zwei Probleme bestehen jedoch bislang. Dies ist zum einen die Größe des bE/bW-Heterokomplexes, der mit 58.8 kDa alles andere als triviale Messungen erwarten lässt. Das Hauptproblem stellt aber die extreme Sauerstoffempfindlichkeit der b-Proteine dar, denn bei Luftkontakt kann die oxidative Oligomerisierung nicht verhindert werden. Da sämtliche Reinigungsschritte mangels entsprechender Spezialausrüstung nicht unter Schutzgas ausgeführt werden konnten, waren auch die im Rahmen dieser Arbeit vermessenen Proteinproben mehr oder weniger stark oligomerisiert. Weitere Arbeiten zur Strukturaufklärung dieser Proteine können daher nur in einem dementsprechend ausgerüstetem Labor durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteinkomplexe des b-Lokus und das Pheromon – Rezeptor – System des a-Lokus von *Ustilago maydis* untersucht. Mit diesen Forschungen ist es gelungen, wesentliche Beiträge zu den Mechanismen der Zellkommunikation auf der Basis der molekularen Interaktion zu liefern.

7 Praktischer Teil

7.1 Klonierungsprotokolle

7.1.1 Plasmidpräparation

Die Zellen aus 1 mL Kulturlösung werden durch Zentrifugieren abgetrennt und das Medium entfernt. Das Pellet wird mit 25 μ L einer 1% Lösung von Lysozym in TE-Puffer und 250 μ L STET-Puffer versetzt und suspendiert. Die Zellsuspension wird 60sec. Bei 95 °C inkubiert und anschließend sofort 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird mit einem Zahnstocher entfernt. Zum Extrakt gibt man 30 μ L Minilysat III und anschließend 600 μ L Isopropanol. Nach 1 min bei RT wird für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wird mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und wieder 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Ethanol wird ebenfalls entfernt und das DNA-Pellet nach dem Trocknen an der Luft in 50 μ L TE-Puffer mit (10 mg/100ml) RNase aufgenommen.

7.1.2 Restriktionsverdau

2 μ L der DNA-Lösung werden mit 1 U des entsprechenden Restriktionsenzym, 1 μ L des zugehörigen 10* Pufferkonzentrates und Wasser ad 10 μ L für 1 h bei 37 °C (bzw. der für das Enzym angegebenen Temperatur) inkubiert. Die Enzyme können optional durch Phenolextraktion entfernt werden. Reinigung / Kontrolle erfolgt per Gel-Elektrophorese.

7.1.3 *Fill in / Fill up*

2 μ L der DNA - Lösung werden mit 1 μ L des zugehörigen 10*

Pufferkonzentrates, 1 μL dNTP's und 1 U Klenov-Fragment versetzt und für 10 min bei 15 °C inkubiert. Die Enzyme können optional durch Phenolextraktion entfernt werden. Reinigung der DNA erfolgt per Gel-Elektrophorese.

7.1.4 Phenolextraktion

Zur DNA-Lösung wird das entsprechende Volumen Phenol:Chloroform 1:1 gegeben und für 60 sek homogenisiert. 10 min bei 14000 rpm zentrifugieren und die obere Phase mit der DNA vorsichtig abnehmen. Dabei darf kein Phenol verschleppt werden. Die DNA wird durch Ausfällen mit 2 Volumina Isopropanol und zentrifugieren (10 min, 14000 rpm) gefällt. Waschen mit 1 mL 70% Ethanol, wieder zentrifugieren und den Ethanol entfernen. Nach dem Trocknen an der Luft wird die DNA in TE-Puffer aufgenommen.

7.1.5 Isolation von DNA-Fragmenten aus Gelen

Die Banden der DNA werden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA daraus mittel Standard-kits extrahiert.

Alternativ kann das Agarosestück in einer gestopften Pipettenspitze für 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert werden.

7.1.6 Ligation

Lösungen aller DNA - Fragmente werden mit 1 μL Ligase und μL Ligasepuffer (dieser enthält normalerweise ATP, andernfalls muß dieses extra zugesetzt werden) und Wasser auf 10 μL aufgefüllt. Die Ligation erfolgt bei 11 °C üN, alternativ für 1h bei 37°C, was aber schlechtere Ausbeuten erbringen kann.

7.1.8 Transformation

0.5 bis 1 μL Vektor-DNA wird mit 50 μL kompetenten Zellen vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wird für 90 sek auf 42 °C erhitzt und sofort wieder auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 1 mL Medium (ohne Antibiotika) wird für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 50 und 500 μL der Zellkultur plattiert.

7.1.9 Zellkultur und Expression

Eine Einzelkultur wird von der Agaroseplatte in das entsprechende Medium transferiert. Bei 37 °C wird solange geschüttelt, bis die Zellkultur eine OD_{600} von 0.4 bis 0.5 erreicht hat. Dann wird der Kolben in einen auf 15 °C vortemperierten Wasserbadschüttler überführt. Zur Expression der bE/bW-Komplexe ist es wesentlich, daß die Zellen diesem raschen Temperaturwechsel ausgesetzt werden. Erfolgt der Temperaturangleich langsam, so fallen die Proteine unlöslich an. Nach 5 min erfolgt die Induktion der Zellen mit 1 mM IPTG. Die Dauer der Expression wird anhand der Proteinmenge in den Zellen bestimmt, sie liegt i.d.R. bei 16 bis 20 h.

7.1.10 Zellaufschluß

Die Zellen werden durch zentrifugieren der Kulturlösung geerntet (5 min, 5000 rpm). Das Pellet wird in 5 ml Proteinpuffer solubilisiert und im Sonifier 15 min bei 30% Leistung und 30 % ED beschallt. Unlösliche Bestandteile werden durch 15 min zentrifugieren bei 20000 rpm entfernt. Die weitere Vorgehensweise richtet sich danach, ob sich die Zellproteine im Pellet oder im Extrakt befinden.

7.1.11 Reinigungsprotokoll mit *detergent mediated refolding*

Die Inclusion bodies werden nach dem Entwerfen des Extraktes mit 1 mL 7.5 m Guanidiniumchlorid - Lösung versetzt und nochmals für 1 min sonifiziert. Durch Zentrifugieren bei 20000 rpm (10 min) werden alle jetzt noch unlöslichen Anteile entfernt. Die Proteine können nun in denatrimertem Zustand mittels Ni-Spharose Säulen gereinigt werden. Zur Reanturierung wird die Proteinlösung mit demselben Volumen 10% Detergenz - Lösung versetzt und durch vorsichtiges Schwenken vermischt (das ist wirklich alles). Die weitere Reinigung erfolgt durch GPC. Die Proteine erscheinen in einem Peak, der der Summe der Protein- und der Micellenmolmasse entspricht. Schlug die Renaturierung fehl, so erscheinen die aggregierten Proteine als ‚hochmolekularer Vorlaufpeak‘. Aus Gründen der Detergenzien - Löslichkeit kann es angebracht sein, diese Schritte nicht bei 4 °C, sondern bei RT auszuführen.

7.1.12 Reinigungsprotokoll der co-exprimierten Proteine

Zellen aus 300 ml induzierter Flüssigkultur werden geerntet und das Pellet mit 4 mL Binding Buffer sonifiziert. Der Extrakt wird an die Ni-Sephrose Säule mit 1 mL Sepharose-Volumen gebunden und gewaschen. Die Elution erfolgt mit 3.5 mL 0.5* Elute Buffer. 0.5 ml des Eluates werden als Vorlauf verworfen, die restlichen 3 mL gesammelt. Zu diesem setzt man sofort 200 µL Mercaptoethanol und 200 µL 0.5 m EDTA (pH 8.0) zu, und inkubiert für 15 min bei 0 °C.

Anschließend wird die Proteinlösung per GPC gereinigt und umgepuffert. Dabei müssen im Puffer 25 mmol NaCl vorhanden sein, mit geringerer Salzkonzentration erfolgt unselektive Anbindung an die Säule. Der Proteinkomplex wird entsprechend seiner tetrameren Struktur bei einer Molmasse von 60 kDa eluiert.

Die Konzentration der Lösung erfolgt entweder durch Zentricon, was aber zu schweren Schäden durch Oxidation führt, oder per Speed - Vak. In diesem Fall muss durch sorgfältige Einstellung des Vakuums ein Einfrieren der Proteinlösung vermieden werden. Zusatz von 0.3 bis 0.5 % Glycerin zum GPC-eluat sind hierbei hilfreich.

Nach Konzentration per Speed - Vak ist eine Dialyse zwingend erforderlich, das sich alle Salze (und ggf Glycerin) mit anreichern, nach einer Zentriconanreicherung wird sie aus Sicherheitsgründen ebenfalls durchgeführt, obwohl keine Verunreinigungen mehr nachzuweisen waren.

7.2 Puffer und Medien

7.2.1 Antibiotika für *E. coli*

	Stamm- lösung	Flüssig- medium	Fest- medium
Ampicillin	10 mg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml	40 µg/ml	40 µg/ml
Chlor- amphenicol	12.5 mg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml
Tetracyclin	2.5 mg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml

7.2.2 10 mg/ml Ampicillin-Stammlösung

	für: 100 ml	200 ml	400 ml
1.0 % (w/v) Ampicillin-Natriumsalz	1.0 g	2.0 g	4.0 g

Mit H_2O_{bidest} ansetzen, sterilfiltrieren und in Weithalsflasche aliquotieren. Bei 4°C im Kühlschrank in der Medienküche lagern.

7.2.3 dYT-Flüssigmedium

	für: 1000 ml	2500 ml	5000 ml
1.6 % (w/v) Trypton (Bacto)	16.0 g	40.0 g	80.0 g
1.0 % (w/v) Yeast-Extrakt (Bacto)	10.0 g	25.0 g	50.0 g
0.5 % (w/v) NaCl	5.0 g	12.5 g	25.0 g

Mit Seradest-Wasser ansetzen, je 400 ml in 500 ml-Weithalsflaschen aliquotieren, 20 min bei 121°C autoklavieren.

7.2.4 10xM9-Salze

	für: 1000 ml	5000 ml	10000 ml
512,0 mM $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	72.7 g	363.5 g	727.0 g
220,0 mM KH_2PO_4	30.0 g	60.0 g	120.0 g
86,0 mM NaCl	5.0 g	10.0 g	20.0 g
187,0 mM NH_4Cl	10.0 g	50.0 g	100.0 g

Mit Seradest-Wasser ansetzen, je 800 ml in 1000 ml-Mephlat-Flaschen aliquotieren, 20 min bei 121°C autoklavieren.

7.2.5 Minilysat III-Lösung

für: 1000 ml 3000 ml 5000 ml

3.0 M Natriumacetat*3H₂O 408.2 g 1224.7 g 2041.2 g

Mit H₂O_{bidest} ansetzen, pH-Wert mit Essigsäure p.a. auf 4.8 einstellen. Vorsicht, für 1000 ml Lösung nur etwa 600 ml H₂O_{bidest} verwenden und dann schrittweise mit Essigsäure auffüllen.

Je 100 ml in 100 ml-Weithalsflaschen aliquotieren.

7.2.6 Lysozym-Lösung

für: 1 ml 5 ml 10 ml

1.0 % (w/v) Lysozym (Muraminidase) 10.0 mg 50.0 mg 100.0 mg

Lysozym in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8.0 lösen.

7.2.7 0.5 M EDTA-Lösung pH 8.0

für: 1000 ml 3000 ml 5000 ml

0.5 M Na₂-EDTA*2H₂O 182.1 g 546.4 g 910.6 g

Mit H₂O_{bidest} ansetzen, pH-Wert auf 8.0 einstellen. Dazu pro 1000 ml Lösung etwa 15 g NaOH-Plätzchen einwiegen. Dann mit 5 M NaOH pH-Wert genau einstellen. EDTA löst sich nur in einem pH-Bereich >7.0. Je 100 ml in 100 ml-Weithalsflaschen aliquotieren und 20 min bei 121°C autoklavieren.

7.2.8 1xTE-Puffer pH 8.0

für: 1000 ml 3000 ml 5000 ml

10 mM Tris-Base	1.21 g	3.63 g	6.05 g
1 mM Na ₂ -EDTA*2H ₂ O	0.37 g	1.11 g	1.85 g

Mit H₂O_{bideest} ansetzen, pH-Wert mit HCl auf 8.0 einstellen, je 100 ml in 100 ml-Weithalsflaschen aliquotieren und 20 min bei 121°C autoklavieren.

7.2.9 TE-Phenol

für: 250 ml 500 ml 1000 ml

100.0 % (w/v) Phenol kristallin (Roth)	250.0 g	500.0 g	1000.0 g
0.32% (w/v) 8-Hydroxychinolin	0.8 g	1.6 g	3.2 g

Vorsicht: alle Arbeiten unter dem Abzug, immer Handschuhe und Schutzbrille und Schutzkittel tragen. Kristallines Phenol mit 10xTE-Puffer unter Rühren in einem großen Becherglas lösen. Dazu etwa halbes Volumen an TE-Puffer wie Menge an Phenol zugeben. Anschließend das Hydroxychinolin zugeben (Farbumschlag nach gelb-orange). Wenn sich das kristalline Phenol gelöst hat, wird die Lösung in einen Scheidetrichter überführt und lässt sie sich dort absetzen. Die wässrige Phase wird verworfen. Anschließend wird der Phenol noch so oft mit 1xTE-Puffer äquilibriert bis der pH-Wert etwa 8.0 beträgt. Anschließend den äquilibrierten Phenol in braune 500 ml-Weithalsflaschen aliquotieren und mit 1xTE-Puffer überschichten. Bei 4°C lagern.

7.2.10 PD-Charcoal-Festmedium

für: 800 ml 1000 ml 2500 ml

2.4	% (w/v) Potato Dextrose Broth (Bacto)	19.2	g	24.0	g	60.0	g
1.0	% (w/v) Charcoal (Sigma C-9157)	8.0	g	10.0	g	25.0	g
2.0	% (w/v) Agar (Difco)	16.0	g	20.0	g	50.0	g

Mit Seradest-Wasser ohne Agar ansetzen, 800 ml Medium in 1000 ml-Erlenmeyer-Kolben, 1000 ml Medium in 2000 ml-Erlenmeyer-Kolben bzw. 2500 ml Medium in 5000 ml-Erlenmeyer-Kolben aliquotieren und entsprechende Menge an Agar und einen Rührfisch zugeben. 20 min bei 121°C auto-klavieren. Die Platten werden unter einer Sterilbank gegossen. Medium immer wieder leicht schwenken und die Platten nicht stapeln, da sich sonst die Aktivkohle absetzt. Nach dem Erstarren des Mediums Platten mindestens 12 h bei Raumtemperatur zum Trocknen stehenlassen, mit Strichcode versehen und verpacken.

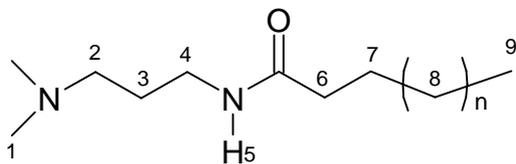
7.3 Detergenziensynthese

7.3.1 Amino-amid aus Carbonsäuremethylester

29.89 g Stearinsäure-methylester	298.5 g/mol	100 mmol
12.78 g 3-(Dimethylamino)-propylamin	102.18 g/mol	125 mmol
33.9 g C ₁₈ -Amino-amid	368.62 g/mol	92 mmol

Ester und Amin werden ohne Lösungsmittel in einer Destillationsapparatur erhitzt, bis kein Methanol mehr entsteht (ü.N.). Die Ölbadtemperatur beträgt anfangs 100 °C, nach etwa 3 h liegt sie bei 160 °C, bei dieser Temperatur wird die Reaktion ü. N. fortgesetzt. Der Rückstand wird in 100 ml Methanol gelöst, bei -80 °C kristallisiert das Produkt aus und wird in einer gekühlten Fritte abgesaugt.

Weisse, wachsartige Kristalle, 92%



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

6.88 (s, 1H), 3.26-3.35 (q, 2H), 2.33-2.39 (t, 2H), 2.22 (s, 6H), 2.08-2.15 (t, 2H), 1.50-1.68 (m, 4H), 1.20-1.35 (s, 28H), 0.84-0.90 (t, 3H)

Zuordnung:

0.97 (CH₃(9)), 1.28 ((CH₂)₁₄(8)), 1.59 (CH₂(3/7)), 2.11 (CH₂(6)), 2.22 (CH₃)₂N(1), 2.36 (CH₂(2)), 3.30 (CH₂(4)), 6.88 (CH₂NHCO)

7.3.2 Amino-amid aus Carbonsäurechlorid

30.4 g Stearinsäurechlorid	302.92 g/mol	100 mmol
13.8 mL 3-(Dimethylamino)-propylamin	102.18 g/mol	110 mmol
35.4 g C ₁₈ -Amino-amid	368.6 g/mol	96 mmol

3-Dimethylamino-propylamin in 100 mL THF vorlegen und das Säurechlorid unter kühlung im Wasserbad langsam zutropfen. Nach beendeter Zugabe wird ohne Kühlung noch 1 h bei RT gerührt.

27.5 mL 4N NaOH werden zu dem pastösen Ansatz gegeben und mit 100 ml Ether extrahiert. Die Etherphase wird mit 50 ml Wasser gewaschen und einrotiert. Trocknen am HV.

35.4 g wachsartige Masse, 96%

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): Siehe oben

7.3.3 Amino-amid durch direkte Amidierung

Allgemeine Vorschrift

28.8 g Stearinsäure	288.48 g/mol	100 mmol
13.0 g 3-Dimethylamino-propylamin	102.18 g/mol	125 mmol
35.7 g C ₁₈ -Amino-amid	368.6 g/mol	97 mmol

0.1 mol Stearinsäure (allg. Carbonsäure), 0.125 mol 3-Dimethylaminopropylamin und 50 mL Toluol werden am Wasserabscheider bei einer Badtemperatur von 140 °C erhitzt, bis sich kein Reaktionswasser mehr bildet (i.d.R. über Nacht, bei Pivalinsäure 3 d).

Aufarbeitung:

Carbonsäuren mit mehr als 12 C-Atomen: Nach dem Entfernen des Ölbad es läßt man etwas abkühlen und gibt den noch warme Ansatz zu 100 ml Methanol. Bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ kristallisiert das Produkt und kann in einer gekühlten Nutsche abgesaugt werden. Dabei ev. Trockeneis auf den Filterkuchen geben, um Erwärmung zu verhindern. Das jeweilige Produkt fällt als weisse, wachsartig/kristalline Masse an.

Kurzkettige Carbonsäuren: Der gesamt ansatz wird im Ölpunpenvakuum fraktionierend destilliert. Das Produkt fällt als zähes Öl an.

Ausbeuten 92-97%

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): Siehe oben

7.3.4 Reduktion zum Amino-amin

Allgemeine Vorschrift

61 g C_{18} -Amino-amid	368.6 g/mol	165 mmol
10 g Lithiumaluminiumhydrid	37.96 g/mol	263 mmol
57 g C_{18} -Amino-amin	354.62 g/mol	160 mmol

In einer Apparatur bestehend aus einem 1 L rundkolben, aufgesetztem Tropftrichter mit Druckausgleich und darauf aufgesetztem Rückflußkühler (= Extraktor) wird im Kolben 10 g Lithiumaluminiumhydrid (mind. 100% Überschuß verwenden. Überschuß und Qualität sind wichtig!) mit 600 mL trockenem(!) Ether übergossen und 61 g Aminoamid in den Tropftrichter gefüllt. Man bringt den Ether zum Sieden, der zurücklaufende Ether löst das Aminoamid allmählich auf.

Achtung: beim C_{18} -Amino-amid muß der Ether zwar weiter erhitzt werden, aber die festen niedereren Aminoamide lösen sich sehr gut in Ether, so das nach dem Einsetzen des Rückflusses eventuell gekühlt werden muß!

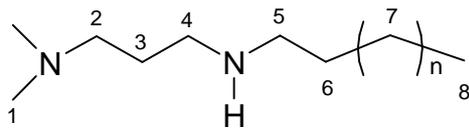
Flüssige Amide werden normal zugetropft.

Nach beendeter Zugabe wird ü.N. unter Rückfluß gekocht. Die Vollständigkeit der Reaktion wird anhand einer Probe kontrolliert (NMR)! Ggf. Weiter erhitzen.

Aufarbeitung: Der Ansatz wird durch Zugabe von konz. Ammoniaklösung durch den Rückflußkühler (Eiskühlung, Anfangs TROPFENWEISE) zersetzt. Solange Ammoniaklösung zugeben, bis die wäßrige Phase rührbar wird. Die organische Phase wird dekantiert und der schleimige Rückstand 2 mal mit Ether durchgerührt und dekantiert. Die vereinigten Etherphasen werden getrocknet und das Lösungsmittel entfernt, zuletzt im Vakuum.

Ausbeute: 97% Farbloses Wachs (C18-Amino-amin), bzw farblose Öle.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

6.88 (s, 1H), 3.26-3.35 (q, 2H), 2.33-2.39 (t, 2H), 2.22 (s, 6H), 2.08-2.15 (t, 2H), 1.50-1.68 (m, 4H), 1.20-1.35 (s, 28H), 0.84-0.90 (t, 3H)

Zuordnung:

0.97 ($\text{CH}_3(9)$), 1.28 ($(\text{CH}_2)_{14}(8)$), 1.59 ($\text{CH}_2(3/7)$), 2.11 ($\text{CH}_2(6)$), 2.22 ($(\text{CH}_3)_2\text{N}(1)$), 2.36 ($\text{CH}_2(2)$), 3.30 ($\text{CH}_2(4)$), 6.88 (CH_2NHCO)

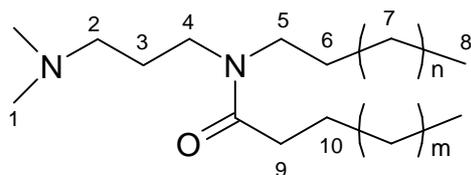
7.3.5 Einführung des 2. Acylrestes

10.0 g C_{18} -Amino-amin	354.62g/mol	28.0 mmol
5.0 g Nonansäure-chlorid	176.68g/mol	28.0 mmol
13.25 g C_{18} -alkyl- C_9 -acyl-aminoamid	494.88g/mol	26.6 mmol

10 g C₁₈-Amino-amin werden in 50 ml THF gelöst. Dazu werden unter Rühren und Kühlung im Wasserbad langsam 5 g Nonansäurechlorid getropft. Nach beendeter Zugabe wird über Nacht bei RT weitergerührt.

Anschließend wird mit 40 mL 1N NaOH versetzt und die org. Phase abgetrennt, durch Kaliumcarbonat filtriert und einrotiert.

Ausbeute: 13.25 g leicht gelbliches Öl, 95.6%



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

3.10-3.35 (m, 4H), 2.23(t, 2H), 2.22(t, 2H), 2.20 (s, 6H), 1.60-1.70 (m, 2H), 1.50-1.60 (m, 2H), 1.40-1.50 (m 2H), 1.1-1.3 (m, 20H), 0.80-0.90 (m, 6H)

Zuordnung:

0.85 (CH₃ (8)), 1.21 ((CH₂)₅ (7)), 1.45 (NCH₂CH₂(CH₂)₅ (6)), 1.55 (COCH₂CH₂(CH₂)₅ (10)), 1.65 (CH₂CH₂N (3)), 2.20 (CH₃N (1)), 2.22 (COCH₂ (9)), 2.23 (Me₂NCH₂ (2)), 3.27 (CH₂NCH₂ (4 und 5))

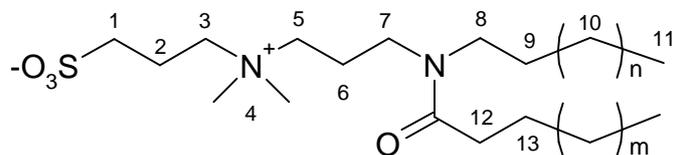
7.3.6 Quarternierung mit Propansulton

4.33 g C ₁₈ -alkyl-C ₉ -acyl-aminoamid	494.88 g/mol	8.75 mmol
1.07 g Propansulton	122.14 g/mol	8.75 mmol
5.13 g "Z 3-3-18-9"	617.02 g/mol	8.31 mmol

4.33 g C₁₈-alkyl-C₉-acyl-aminoamid wird in 20 ml Chloroform gelöst und mit 1.09 g Propansulton versetzt. Anschließend wird ü. N. bei RT gerührt. Abziehen des Lösungsmittels und trocknen am HV ergibt 5.13 g (95%) wachsartiges Produkt, Verluste entstehen nur durch unvollständiges

Auskratzen aus den Reaktionsgefäß.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):



3.75 (m, 2H), 3.40-3.18 (m, 6H), 3.14 (s, 6H), 2.88 (t, 2H), 2.27 (t, 2H), 2.17 (s, 2H), 2.01 (m, 2H), 1.55 (m, 4H), 1.23 (m, 40H), 0.85 (t, 3H)

Zuordnung:

3.75 (3), 3.40-3.18 (7, 8, 5), 3.14 (4), 2.88 (1), 2.27 (12), 2.17 (2?), 2.01 (6), 1.55 (9, 13), 1.23 (10), 0.85 (11)

7.3.7 Bis-(dimethylaminomethyl)-acetonitril

42.53 g Cyanessigsäure	85.06 g/mol	0.5 mol
Formaldehyd	30.03 g/mol	1.0 mol
Dimethylamin	40.09 g/mol	1.25 mol
69.5 g Bis(dimethylaminomethyl)- acetonitril	155.22 g/mol	0.45 mol

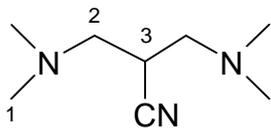
0.5 mol Cyanessigsäure werden in 125 ml Dioxan suspendiert, unter Eiskühlung mit 1.25 mol 40% Dimethylaminlösung versetzt und noch 10 min im Eisbad weitergerührt. Dann werden 1.0 mol eisgekühlte Formaldehydlösung auf einmal zugegeben. Nach etwa 30 sek Gasentwicklung, Erwärmung und leichte Trübung, die aber bald darauf wieder verschwindet. Der Ansatz wird ü.N. gerührt und dabei auf RT erwärmt.

Zur Ausarbeitung wird mit Kaliumcarbonat gesättigt, die organische Phase abgetrennt, das Dioxan am Rotationsverdampfer entfernt und i. Vak.

destilliert.

69.5 g (89.5%) farblose Flüssigkeit (Sdp. 20 mbar: 106-107 °C)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

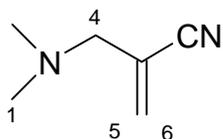


2.72-2.80 (qn, 1H), 2.42-2.59 (m, 4H), 2.24-2.28 (s, 12H)

Zuordnung:

2.26 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.42-2.59 ($\text{CH}_2(2)$), 2.77 ($\text{CH}(3)$)

Nebenprodukt (Spuren): Dimethyl amino acrylnitril



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

5.95 (s, 1H), 5.85(s, 1H), 3.33- (s, 2H), 2.24-2.28 (s, 6H)

Zuordnung:

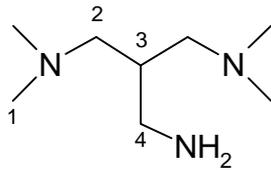
2.26 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.33 ($\text{CH}_2(4)$), 5.85 ($\text{CH}(5)$), 5.95 ($\text{CH}(6)$)

7.3.8 Katalytische Hydrierung zum Bis-(dimethylaminomethyl)-methylamin

9.21 g Bis-(dimethylaminomethyl)-acetonitril und 30 mg LiOH werden in 50 mL Methanol gelöst und mit 0.61 g Katalysator (5% Rh/ Al_2O_3) versetzt. Bei 30 bar Wasserstoffdruck wird für 7 Tage bei RT hydriert. Das Lösungsmittel wird am Rataionsverdampfer entfernt, und das Rohprodukt i. Vak. destilliert.

3.39 g (35.8%) farblose Flüssigkeit, Sdp. (16 mbar): 80 °C

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):



2.70-2.71 (d, 2H), 2.40-2.60 (m, 4H), 2.16 (s, 12H), 1.70-1.80 (m, 1H)

Zuordnung:

1.75 (CH), 2.16 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2(1)$), 2.50 (Me_2NCH_2), 2.70 (CH_2NH_2)

Nebenprodukt (hier nur Spuren, bei anderen Methoden zumeist Hauptprodukt): Dimethylaminopropionitril.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

2.66-2.72 (m, 1H), 2.27-3.32 (d, 2H), 2.24 (s, 6H), 1.25 (d, 3H)

Zuordnung:

1.25 ($\text{CH}_3(4)$), 2.24 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2(1)$), 2.30 (CH_2), 2.67 (CH)

7.3.9 Bis-(dimethylaminomethyl)-nitromethan

12.2 g Nitromethan	61.04 g/mol	0.20 mol
Dimethylamin, 40%	40.09 g/mol	0.50 mol
Formaldehyd, 30%	30.03 g/mol	0.40 mol
Bis(dimethylaminomethyl)- nitromethan	175, 22 g/mol	

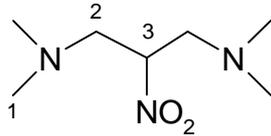
0.5 mol Dimethylamin als 40%ige wässrige Lösung werden unter Eiskühlung langsam mit 0.4 mol Formaldehyd (30%ige wässrige Lösung) versetzt und noch einige Minuten auf dem Eisbad gerührt. Dann werden 12.2 g Nitromethan zugegeben und die entstehende Suspension noch 5 min auf dem Eisbad nachgerührt.

Man Extrahiert mit 100 ml Ether, trocknet mit Kaliumcarbonat und entfernt

den Ether i. Vak., ohne dabei zu Erwärmen.

Ausbeute: 21.5 g (65%) leicht gelbe Kristallmasse. Dicht verschlossen bei -30 °C lagerfähig, in der Wärme und unter Vakuum schnelle Zersetzung.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

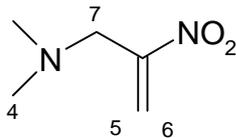


4.81 (dddd, 1H), 2.91 (dd, 2H), 2.42 (dd, 2H) 2.25 (s, 6H)

Zuordnung:

4.81 (CH, (3)), 2.91 und 2.42 (CH_2 (2)), 2.25 (N- CH_3 (1))

Nebenprodukt Dimethylaminomethyl-nitroethen



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

6.50 (s, 1H), 5.75 (s, 1H), 3.39 (s, 2H), 2.28 (s, 6H)

Zuordnung:

6.50 (5), 5.75 (6), 3.39 (CH_2 (7)), 2.28 (N- CH_3 (4))

7.4 Peptidsynthese

7.4.1 AAV 1: Silylierung der Glasgefäße für die Peptidsynthese

Das zu silylierende Glasgefäß wird mit einer Lösung von 1 ml Trimethylchlorsilan und 1 ml Triethylamin in 10 ml Ether 30 min lang geschüttelt. Die Lösung wird entfernt und das Gefäß mit Ethanol und anschließend Aceton gespült.

7.4.2 AAV 2: Koppeln der ersten Aminosäure ans TCP Harz.

Das TCP-Harz (Kapazität ca. 0.9 mmol Cl pro Gramm) wird mit 1.5 Äquivalenten des Fmoc-Aminosäurederivates und DCM (10 ml pro Gramm Harz) in ein Schüttelgefäß ('Ente') gegeben und kurz geschwenkt. Nach Zusatz von 2.5 Äquivalenten DIPEA, bezogen auf das eingesetzte AS-Derivat, wird weitere 60 min bei RT geschüttelt. Dann wird pro Gramm Harz ein ml Methanol zugegeben, um unumgesetzte Tritylchloridgruppen zu cappen.

Nach weitem 30 min wird das Harz abgesaugt, zweimal mit DCM, zweimal mit DMF und einmal mit DCM gewaschen. Dann wird das Harz in DCM aufgenommen und langsam mit MeOH versetzt. Durch partielles Entfernen des Lösungsmittelgemisches und weiteren MeOH-Zusatz geht man schließlich langsam auf reines MeOH über. Nach dem Trocknen kann die Belegung gravimetrisch bestimmt werden:

$$\text{mmol/g} = (m_2 - m_1) * 1000 / (M(\text{AS}) - 36.461) * m_2$$

m_1 = Masse des unbeladenen Harzes

m_2 = Masse des beladenen Harzes

$M(\text{AS})$ = Molmasse des

Aminosäurederivates

7.4.3 AAV 3: Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie

Die Aminosäuren werden nach folgenden Schema angekuppelt:

- einmal 3 min waschen mit DMF
- einmal 3 min entschützen mit 40% Piperidin/DMF
- einmal 15 min entschützen mit 20 % Piperidin/DMF
- viermal 3 min waschen mit DMF
- zweimal 30 min kuppeln mit Fmoc-AS/TBTU/DIPEA
- dreimal 3 min waschen mit DMF

Für den Kupplungsschritt werden nacheinander 2 eq. Fmoc-Aminosäure, 5 eq. DIPEA und 2 eq. HOBt und 2 eq. TBTU in des Reaktionsgefäß gegeben. Es wird keine Voraktivierung durchgeführt.

Nach entsprechender Umsatzkontrolle (Ninhydrin test) kann ev. auf die NachKupplung verzichtet werden.

Diese Schritte können von Synthesizer übernommen werden. Die zu verwendenden Programme richten sich dabei nach den aktuellen Anforderungen.

7.4.4 AAV 4: Abspaltung vom TCP-Harz ohne simultanes Entschützen

Das TCP-Harz wird mit 20 ml Abspalllösung, bestehen aus Eisessig/TFE/DCM (1:1:6), pro Gramm Harz 90 min lang geschüttelt. Nach dem Absaugen wird einmal mit 10 ml und noch zweimal mit 5 ml Abspalllösung nachgewaschen.

Die weitere Reinigung erfolgt durch Einengen i. Vak. und Fällen in Hexan/Ether. Nach dem Abzentrifugieren wird das Peptid noch mehrfach mit Hexan/Ether gewaschen und i. Vak. getrocknet. Dies liefert das Peptidacetat.

Für Fragmentkupplungen wird wie folgt verfahren:

Die Abspalllösung wird i. Vak. so weit wie möglich entfernt. Dann wird das Peptid solange in DCM/TFE (2:1) aufgenommen (ca. 10 ml/g), mit Toluol (50 ml/g) versetzt und diese Lösungsmittel i. Vak. abgezogen, bis es als Pulver anfällt. Ölige/glasige Peptide enthalten noch Essigsäure und bedürfen weiterer Reinigungszyklen.

Alternativ wird mit 20% HFIP in DCM abgespalten. Das Harz wird mit 10 ml Abspalllösung 1 h lang geschüttelt und mit wenig der Lösung nachgewaschen. Alle Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt, das Peptid kann sofort oder nach Lyophilisieren für Fragmentkupplungen verwendet werden.

7.4.5 AAV 5: Entschützen der Peptide, Abspalten vom TCP-Harz und simultan Entschützen

Die Peptide werden mit einem Silanscavenger TFA/TIPS/H₂O (95:4:1) entschützt. Der Anteil des Silans kann bis auf 5% gesteigert werden.

Man setzt 1.5 eq. Silan bezogen auf jede Schutzgruppe ein. Die Lösung darf sich nicht bräunlich verfärben (freie Kationen). In diesem Fall gibt man noch einige Tropfen Silan zu.

Nach 90 min wird durch Umfällen aus kaltem Ether und mehrfachem Nachwaschen gereinigt und i. Vak. getrocknet.

7.4.6 AAV 6: Fragmentkupplung mit HATU/HOAt.

Die Peptidsäure, ca. 100 mg, wird in 2 ml DMF aufgenommen und die Aminkupponente in 1 ml DMF zugesetzt. Zur Kupplung werden bei RT 3 eq. Sym. Collidin, 1 eq. HATU und 2 eq. HOAt eingesetzt.

Nach 24 h wird das DMF i. Vak. entfernt und der Rückstand wie vor entschützt.

7.4.7 AAV 7: Belegung von HMBA-Harz

Das Harz wird mit 1.5 eq. des Aminosäurederivates und 1.5 eq. DCC bei 0 °C 1 h in 10 ml DMF pro Gramm Harz geschüttelt, danach noch eine Stunde bei RT. Das Harz wird abgetrennt und mehrfach mit DMF, DCM und MeOH gewaschen. Trocknen i. Vak., die Belegung kann gravimetrisch ermittelt werden.

7.4.8 AAV 8: Darstellung lipophiler Fmoc-AS-Derivate

10 mmol lipophile AS werden in 75 ml DCM suspendiert und mit 2 eq. TMS-Cl und 2 eq. Triethylamin versetzt und 90 min zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 0 °C werden 10 mmol Fmoc-Cl zugesetzt und über Nacht bei RT gerührt.

Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand mit 100 ml 0.01 M HCl gerührt (ca. 90 min). Extraktion mit DCM (3mal), waschen mit Wasser (3mal), Trocknen mit MgSO₄ und Entfernen des Lösungsmittels liefert das Rohprodukt. Umkristallisieren aus DCM/Hexan.

7.4.9 AAV 9: Darstellung lipophiler AS-Methylester

10 mmol lipophile AS werden in 30 ml MeOH suspendiert und bei 0 °C langsam mit 10 mmol Thionylchlorid versetzt. Nach 30 min wird auf RT erwärmt und noch 2 mmol Thionylchlorid zugegeben. Nach Rühren über Nacht wird 30 min zum Rückfluß erhitzt und heiß filtriert. Das Ausfallende Rohprodukt wird aus geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

7.5. Darstellung der Aminosäuren

7.5.1 AHDS rac

2.30 g Natrium	23.0 g/mol	100 mmol
21.70 g Diethylacetamidomalonat	217.2 g/mol	100 mmol
34.65 g Tetradecylbromid	277.9 g/mol	125 mmol
19.50 g α -Aminohexadecansäure	271.4 g/mol	72 mmol

2.3 g Natrium werden in 100 ml Ethanol gelöst. Zu der warmen Lösung gibt man 21.7 Acetamidomalonester und 34.6 g Tetradecylbromid. Über Nacht wird zum Rückfluß erhitzt. Danach wird die Lösung zur Trockne eingeeengt und der weiße Rückstand im Kolben mit 50 ml Wasser und 150 ml konz. Salzsäure versetzt und wieder zum Rückfluß erhitzt. Nach etwa 3.5 h setzt innerhalb weniger Minuten die CO₂-Entwicklung mit voller Heftigkeit und starkem Schäumen ein. Zu diesem Zeitpunkt ist eine sorgfältige Temperaturkontrolle erforderlich. Man erhitzt den Ansatz, der die Konsistenz von Schmierseife angenommen hat, noch eine weitere Stunde und gießt nach dem Abkühlen in 750 ml Wasser. Nach dem Neutralisieren mit Natron- oder Kalilauge (nicht Carbonat!) wird das Ausgefällene Produkt abgesaugt. Zur weiteren Reinigung wird in 300 ml Ethanol suspendiert, abgesaugt, in 300 ml Hexan suspendiert und wieder abgesaugt. Nach dem Trocknen im Vakuum erhält man 19.5 g α -Aminohexadecansäure als weißes Pulver.

Ausbeute 72 %.

Fp: 235 °C (Zers.)

7.5.2 ClAc-AHDS rac

27.10 g α -Aminohexadecansäure	271.42 g/mol	100 mmol
11.85 g Chloracetylchlorid	112.94 g/mol	105 mmol
22.62 g ClAc-AHDS-OH	347.88 g/mol	65 mmol

27.1 g AHDS werden in 100 ml Acetonitril suspendiert und nach Zugabe von 11.9 g Chloracetylchlorid 2 h zum Rückfluß erhitzt. Die braune Lösung wird zur Trockne eingengt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen, filtriert und einrotiert. Umkristallisieren aus EtOAc/Hexan liefert das reine Produkt. Ausbeute: 65 %

Fp: 93 °C

CI-MS: 349 (M+H⁺). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 8.43 [d, 1H, H^N]; 4.18 [m, 1H, H ^{α}]; 4.10 [s, 2H, ClCH₂-CO-]; 1.65 [m, 2H, H ^{β}]; 1.28-1.22 [m, 24H, C₄H-C₁₅H]; 0.85 [tr, 3H, C₁₆H].

7.5.3 L-AHDS

10.00 g ClAc-AHDS rac	347.88 g/mol	28.6 mmol
3.25 g L- α -Aminohexadecansäure	271.42 g/mol	12.0 mmol

10 g ClAc-AHDS werden in 5l Wasser suspendiert, auf 80 °C erwärmt und mit LiOH auf pH 7 eingestellt. Zu der klaren Lösung wird bei RT 1 g Acylase I von *Aspergillus melliis* gegeben. Um ausgefallenes unumgesetztes Edukt wieder in Lösung zu bekommen, wird einmal am Tag auf 80 °C erhitzt, das Produkt abzentrifugiert und bei RT Acylase I nachdosiert. Bei 5. Mal fällt kein weiteres Produkt mehr aus. Das gesammelte Produkt wird mit Wasser ausgekocht und heiß abfiltriert und anschließend mit EtOAc gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 84 %

Fp: 239 °C (Zers.)

CI-MS: 272 (M+H⁺). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ= 8.38 [bs, 2H, H^N]; 3.82 [m, 1H, H^α]; 1.72 [m, 2H, H^β]; 1.28-1.22 [m, 24H, C₄H-C₁₅H]; 0.85 [tr, 3H, C₁₆H].

7.5.4 D-AHDS

(Lösung) ClAc-D-AHDS 347.88 g/mol (12.3 mmol)

3.21 g D-α-Aminohexadecansäure 271.42 g/mol 11.9 mmol

Die ClAc-D-AHDS enthaltende Lösung wird mit HCl auf pH 2 gebracht. Der ausfallende Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser und getrocknet. Die Verbindung wird in EtOAc aufgenommen, filtriert und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird in 150 ml 3N HCl suspendiert und 8 h zum Rückfluß erhitzt (starkes schäumen). Nach dem Abkühlen wird neutralisiert, das ausgefallene Produkt mit Wasser ausgekocht, mit EtOAc gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 83 %

Fp: 239 °C (Zers.)

CI-MS: 272 (M+H⁺). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ= 8.35 [bs, 2H, H^N]; 3.82 [m, 1H, H^α]; 1.72 [m, 2H, H^β]; 1.28-1.22 [m, 24H, C₄H-C₁₅H]; 0.85 [tr, 3H, C₁₆H].

7.5.5 Fmoc-AHDS

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ= 12.51 [bs, 1H, COOH]; 7.95-7.26 [m, 8H, ArH]; 7.63 [bs, 1H, H^N]; 4.24 [m, 1H, H^α]; 4.24 [m, 2H, CH₂OCO]; 3.93 [m, 1H, CHCH₂OCO]; 1.64 [m, 2H, H^β]; 1.22-1.28 [m, 24H, C₄H-C₁₅H]; 0.85 [tr, 3H, C₁₆H].

7.5.6 AHDS-Ome

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta =$ 8.59 [bs, 2H, H^{N}]; 3.98 [tr, 1H, H^{α}]; 3.75 [s, 3H, CO_2CH_3]; 1.78 [m, 2H, H^{β}]; 1.28-1.22 [m, 24H, $\text{C}_4\text{H-C}_{15}\text{H}$]; 0.85 [tr, 3H, C_{16}H].

7.5.7 Fmoc-Hcha-OH

0.5 g H-Tyr(tBu)-OH werden in 40 ml MeOH suspendiert und furch zusatz von LiOH gerade gelöst. Nach Zugabe von 0.3 g 5%Rh/ Al_2O_3 wird bei 80 bar Wasserstoffdruck 7 d hydriert. Danach wird der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Aus dem Rückstand wird das Produkt nicht isoliert, sondern sofort die Fmoc-Schutzgruppe eingeführt (Fmoc-Cl, Standardprotokoll).

Das so erhaltene Fmoc-Hcha(tBu)-OH wird anschließend per HPLC gereinigt, da die Hydrierung nicht vollständig verläuft, vermutlich ist höherer Wasserstoffdruck erforderlich.

7.5.8 H-Cys^{(Me,Me) ψ} -Pro)-OH

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

4.83 (t, 1H), 3.70 (dd, 1H), 3.55 (dd, 1H), 1.85 (s, 3H), 1.84 (s, 3H)

Zuordnung:

4.83 (CH), 3.70 und 3.55 (CH_2), 1.85 und 1.84 (CH_3)

7.4.9 Fmoc-Ser(tBu)-F

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

7.75 (d, 2H), 7.58 (d, 2H), 7.30 (m, 4H), 5.63 (d, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.44 (m, 2H), 4.23 (t, 1H), 3.88 (dd, 1H), 3.60 (dd, 1H)

Zuordnung:

7.75 bis 7.30 (Fmoc-Aromaten), 6.65 (NH), 4.64 ($C^{\alpha}H$), 4.44 (Fmoc- CH_2), 4.23 (Fmoc-CH, 3.88 und 3.60 ($C^{\beta}H_2$);

$C^{\alpha}H$ (Fmoc-Ser-OH): 4.50, nicht anwesend

7.6 Silylierung des Peptid-backbones

7.6.1 Silylierung mit der TBDMS-Schutzgruppe

16 μmol einer Fmoc-entschützten AILAEVIG-TCP – Sequenz wurden wie folgt silyliert:

1.

75 μL TBDMS-Im

50 μL 0.4 M Saccharin in DMF (5 mol%)

50 μL 0.4 M Pyridin in DMF (5 mol%)

105 μL DMF (ad 280 μL)

2.

75 μL TBDMS-Im

50 μL 0.4 M DMAP in DMF (5 mol%)

155 μL DMF (ad 280 μL)

3.

75 μL TBDMS-Im

50 μL 0.4 M Saccharin in DMF (5 mol%)

50 μL 0.4 M DMAP in DMF (5 mol%)

105 μL DMF (ad 280 μL)

4.

60 μL TBDMS-Cl

220 μL 2 M Imidazol in DMF (110 mol%)

5.

125 μL TIPS

50 μL 2 M Imidazol in DMF (25 mol%)

5 mol% $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^- \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$

Dieser Ansatz entwickelt Wasserstoff!

Alle Ansätze werden ü. N. bei RT geschüttelt. Nach dem Waschen wird Fmoc-Gly-OH gekuppelt. Auf dieser Stufe kollabiert diese Sequenz normalerweise. Nach dem Silylieren kann jedoch die Fmoc-Schutzgruppe entfernt werden, ebenso gelingt eine weitere Peptidkupplung, allerdings nur mit etwa 50% Ausbeute.

Da die Silylierung statistisch erfolgt, ist keine Analytik möglich.

7.6.2 Silylierung durch Mitsunobu – Reaktion

Das trockenen Harz mit dem Fmoc-geschützten Peptid wird je Peptidbindung bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ mit je 2 Äquivalenten Triphenylphosphin (als Festsubstanz), 2-Trimethylsilylethanol (1 M in THF) und DEAD (1 M in THF) versetzt, und geschwenkt, bis der Ansatz RT erreicht. Dabei kann der Reaktionsverlauf am Verbrauch des tiefgelbe DEAD verfolgt werden.

Die Analytik erfolgt durch NMR-Spektroskopie. Der Silylierungsgrad ergibt sich aus den ^1H -Signalen der TMS-Gruppen um 0 ppm in Relation zu Peptid-NH bzw. C^αH . Nach dem Abspalten mit HFIP sind jedoch nur Spuren silylierter Peptide nachzuweisen.

8 Literaturverzeichnis:

-
- ¹ T. Spellig, M. Böhler, F. Lottspeich, R. W. Frank, R. Kahman, *EMBO J.* **1994**, *13*, 1620-1627.
- ² Marcus Koppitz, *Dissertation*, München, **1996**
- ³ M. P. Scott, *Cell* **2000**, *100*, 27-40
- ⁴ E. Loumaye, J. Thorner, K. J. Catt, *Science* **1982**, *218*, 1323-1325.
- ⁵ M. Bölker, R. Kahmann, *Plant Cell* **1993**, *5*, 1461-1469.
- ⁶ W. Duntze, R. Betz, M. Nientiedt, *The Mycoti I, Growth, Differentiation and Sexuality*, Springer Verlag, Heidelberg, **1994**, 381-399.
- ⁷ E. Leberer, D. Y. Thomas, M. Whiteway, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, *7*, 59-66.
- ⁸ E. A. Elion, *Curr. Opin. Microbiol.* **2000**, *3*, 573-81.
- ⁹ G. F. Sprague, J. W. Thorner, *Pheromone response and signal Transduction during the mating process of S. Cerevisiae*, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, **1992**, Vol. II, 657-744.
- ¹⁰ G. A. Caldwell, F. Naider, J. M. Becker, *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 406-422.
- ¹¹ E. Kothe, *Fungal Genet. Biol.* **1999**, *27*, 146-52
- ¹² J. Wendland et al. *EMBO J.* **1995**, *14*, 5271-5278.
- ¹³ S. F. O'Shea et al., *Genetics* **1998**, *148*, 1081-1090.
- ¹⁴ L. A. Casselton, N. S. Olesnicky, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 55-70.
- ¹⁵ J. R. Halsall, M. J. Milner, L. A. Casselton, *Genetics* **2000**, *154*, 1115-1123.
- ¹⁶ A. J. Brown, L. A. Casselton, *Trends Genet.* **2001**, *17*, 393-400.
- ¹⁷ R. Kahmann, C. Basse, M. Feldbrügge, *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 647-650.
- ¹⁸ R. Kahmann, G. Steinberg, C. Basse, J. Kämper, *U. maydis, the causative agent of corn smut disease*, Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, **2000**, 347-371.
- ¹⁹ C. Sánchez-Martinez, J. Pérez-Martín, *Curr. Opin Microbiol.* **2001**, *4*, 214-221.
- ²⁰ M. Bölker, *Microbiology* **2001**, *147*, 1395-1401.
- ²¹ J. Kämper, M. Reichmann, T. Romeis, M. Bölker, R. Kahmann, *Cell* **1995**, *81*, 73-83.
- ²² G. A. Caldwell, F. Naider, J. M. Becker, *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 406-422.
- ²³ F. Baunett, I. Herskowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5878-5882.
- ²⁴ M. Koppitz, T. Spellig, R. Kahmann, H. Kessler, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1996**, *48*, 377-90.
- ²⁵ J. Beckmann, *Hannoversches Magazin* **1768**, *6*, 1329-1340.
- ²⁶ J. J. Christensen, *Amer. Phytophatol. Soc. Monogr. Nr. 2* **1963**, St. Paul, MN.

-
- ²⁷ J. Doebley, *Trends Gene.* **1992**, 8, No. 9, 302-307.
- ²⁸ M. E. Valverde, O. Paredes-Lopez, J. K. Pataky, L. F. Guevara, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1995**, 35, 191-229
- ²⁹ F. Banuett, *Trends Genet.* **1992**, 8, No. 5, 174-180.
- ³⁰ J. E. Puhalla, *Genetics* **1968**, 60, 461-474.
- ³¹ J. B. Rowell, J. E. DeVay, *Phytopathology* **1954**, 44, 356-362.
- ³² R. Holliday, *Genet. Res.* **1961**, 2, 204-230.
- ³³ J. Kämper, M. Reichmann, T. Romeis, M. Bölker, R. Kahmann, *Cell* **1995**, 81, 73-85.
- ³⁴ M. Bölker, R. Kahman, *Plant Cell* **1993**, 5, 1461-1469.
- ³⁵ Rüdiger Neef, *Diplomarbeit*, München, **1996**.
- ³⁶ L. A. Jelicks, M. S. Broido, J. M. Becker, F. R. Naider, *Biochemistry* **1989**, 28, 4233-4240.
- ³⁷ N. Nakayama, A. Miyajima, K. Arai, *EMBO J.* **1985**, 4, 2643-2648.
- ³⁸ T. Tanaka, J. Davey, Y. Imai, M. Yamamoto, *Mol. Cell. Biol.* **1993**, 13, 80-88.
- ³⁹ H.G. Dohlmann, J. Thorner, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, 60, 653-688.
- ⁴⁰ C. D. Strader, T. M. Fong, M. R. Tota, D. Underwood, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63 101-132.
- ⁴¹ A. M. Spiegel, *Curr. Op. Cell Biol.* **1992**, 4, 203-211.
- ⁴² R. Holliday, *Genet. Res.* **1961**, 2, 231-248.
- ⁴³ S. Clarke, J. P. Vogel, R. J. Deschenes, J. Stock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 4643-4647.
- ⁴⁴ J. F. Hancock, A. I. Magee, C. J. Marshall, *Cell* **1989**, 57, 1167-1177.
- ⁴⁵ C. J. Marshall, *Science* **1993**, 259, 1865-1866.
- ⁴⁶ M. S. Brown, J. L. Goldstein, *Nature* **1993**, 366, 14-15.
- ⁴⁷ M. Hoffmann, *Science* **1991**, 254, 650-651.
- ⁴⁸ J. W. Kaiser, E. T. Kaiser, *Pharmacol. Rev.* **1986**, 38, 291-319.
- ⁴⁹ R. Schwyzer; Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., *Peptides: Structure and Function* **1985**, 3-12.
- ⁵⁰ E. T. Kaiser, F. J. Kézdy, *Science* **1984**, 223, 249-255.
- ⁵¹ G. Gross, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1990**, 6, 1-39.
- ⁵² <http://www.novagen.com> (pEt – Vektoren, sowie weiterführende Literatur.)
- ⁵³ <http://www.neb.com> (IMPACT-Systeme, Proteinmarker, weiterführende Literatur)

-
- ⁵⁴ M. Iwakura, K. Obara, T. Kokubu, S. Ohashi H. Izutsu, *J. Biochem* **1992**, 112, 57-62.
- ⁵⁵ N. Wolff, J.-M. Ghigo, P. Delepelaire, C. Wandersman, M. Delepierre, *Biochemistry* **1994**, 33, 6792-6801.
- ⁵⁶ G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* **1978**, 17, 569-583.
- ⁵⁷ P. Casper, M. Stieger, P. Burn, *Cell. Mol. Biol.* **1994**, 40, 635-644.
- ⁵⁸ G. E. Dale, H.-J. Schönfeld, H. Langen, M. Stieger, *Protein Engineering* **1994**, 7, 925-931.
- ⁵⁹ H. Schägger, G. v. Jagow, *Analyt. Biochem.* **1987**, 166, 368-379.
- ⁶⁰ G. Zardeneta, P. M. Horowitz, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 5811-5816.
- ⁶¹ G. Zardeneta, P. M. Horowitz, *Anal. Biochem.* **1994**, 223, 1-6.
- ⁶² D. Rozema, S. H. Gellman, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 3478-3487.
- ⁶³ S. Tandon, P. M. Horowitz, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 9859-9866.
- ⁶⁴ D. Russel-Harde, M. Knauf, E. Croze, *J. Interferon Cyt. Res.* **1995**, 15, 31-37.
- ⁶⁵ O. Vinogradova, P. Badola, L. Czerski, F. D. Sönnichsen. C. R. Sanders, *Biophys. J.* **1997**, 72, 2688-2701.
- ⁶⁶ O. Vinogradova, F. Sönnichson, C. R. Sanders, *J. Biomol. NMR* **1998**, 4, 381-386.
- ⁶⁷ S. Tandon, P. M. Horowitz, *J. Bio. Chem.* **1987**, 262, 4486-2291.
- ⁶⁸ J. Stöckel, K. Döring, J. Malotka, F. Jähnig, K. Dormair, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 248, 684-691.
- ⁶⁹ SFB 369 Progressrepot vom 30. 11. 2001.
- ⁷⁰ J. L. Cleland, S E. Builder, J. R. Swartz, M. Winkler, J. Y. Chang, D. I. C. Wang, *Bio/Technology* **1992**, 10, 1013-1019.
- ⁷¹ H. L. Qi, J Y. Tai, M. S. Blake, *Infection Immunity*, **1994**, 62, 2432-2439.
- ⁷² C. A. S. A. Minetti, J. Y. Tai, M. S. Blake, J. K. Pullen, S.-M. Liang, D. P. Remeta, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 10710-10720.
- ⁷³ C. Li, J. W. R. Schwabe, E. Banayo, R M. Evans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 2278-2283.
- ⁷⁴ E. Pennisi, *Science* **1998**, 281, 1131-1133.
- ⁷⁵ A. Helenius, D. R. McCaslin, E. Fries, C. Tanford, *Methods in Ezymology*, **1979**, 63, 734-749.
- ⁷⁶ K. Shinoda, A. Carlsson, B. Lindman, *Adv. Coll. Inter. Sci.* **1996**, 64, 253-271.
- ⁷⁷ C. V. Wilson, J. F. Stenberg, *Org. Synth. Coll. Vol. IV*, 564-565.
- ⁷⁸ U. Th. Rüegg, J. Rundinger, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1974**, 6, 447-456.

-
- ⁷⁹ G. Adrian, *Bull. Soc. Chim. France* **1971**, 11, 4160-4169.
- ⁸⁰ D. L. Verraest, E. Zitha-Bovens, J. A. Peters, H. v. Bekkum, *Carbohydrate Research* **1998**, 310, 109-115.
- ⁸¹ J. O. Osby, S. W. Heinzman, B. Ganem, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 67-72.
- ⁸² G. W. Gribble, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 395-404.
- ⁸³ N. Umino, T. Iwakuma, N. Itoh, *Tetrahedron Letters*. **1976**, 33, 2875-2876.
- ⁸⁴ P. J. Brach, S. J. Grammatica, O. A. Ossana, L. Weinberger, *J. Heterocycl. Chem.* **1970**, 1403-1405.
- ⁸⁵ H. Eckert, Y. Kiesel, *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* **1981**, 20, 473-475.
- ⁸⁶ H. Eckert, G. Fabry, Y. Kiesel, G. Raudaschl, C. Seidel, *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* **1983**, 22, 881-882.
- ⁸⁷ H. Eckert, C. Seidel, *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* **1986**, 25, 159-160.
- ⁸⁸ Y. Huang, W. M. H. Sachtler, *Applied Catalysis A* **1999**, 182, 365-378.
- ⁸⁹ A. W. Burgstahler, Z. J. Bithos, *Org. Synth. Coll. Vol 5*, 591-595.
- ⁹⁰ L. Henry, P. Duden, G. Pondorf, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, 38, 2027-2044.
- ⁹¹ B. C. Ranu, A. Sarkar, S. K. Guchhait, K. Gosh, *J. Indian Chem. Soc.* **1998**, 75, 690-694.
- ⁹² E. Müller, *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1975**, Vol. E9 758-775.
- ⁹³ E. W. Abel, D. A. Armitage, G. R. Willey, *J. Chem. Soc.* **1964**, 57-61.
- ⁹⁴ V. Mark, *Org. Synth. Coll. Vol V*, 602-604.
- ⁹⁵ H. Tolkmith, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 4246-3252.
- ⁹⁶ F. M. Menger, J. S. Keiper, *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* **2000**, 39, 1906-1920.
- ⁹⁷ J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, *J. Org. Chem. Faraday Trans. II*, **1976**, 72, 1525-1569.
- ⁹⁸ C. R. Sanders, R. S. Posser, *Structure* **1998**, 6, 1227-1234.
- ⁹⁹ T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9218-9227.
- ¹⁰⁰ P. M. Fischer, *Tetrahedron Letters* **1992**, 33, 7605-7608.
- ¹⁰¹ A. Quilliam, J. B. Westmore, *Anal. Chem.* 1978, 50, 59-62.
- ¹⁰² C. A. Bruynes, T. K. Jurriens, *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 47, 3966-3969.
- ¹⁰³ H. Wetter, K. Oertle, *Tetrahedron Letters* 1985, 26, 5515-5518.
- ¹⁰⁴ L. Horner, J. Mathias, *J. Org. Met. Chem.* **1985**, 282, 155-174.

-
- ¹⁰⁵ P. Rovero, L. Quartara, G. Fabberi, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 37, 140-144.
- ¹⁰⁶ L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398.
- ¹⁰⁷ L. A. Carpino, A. El-Faham, *Org. Chem.* **1994**, 59, 695-698.
- ¹⁰⁸ N. J. Lewis, R. L. Inloes, *J. Hes, J. Med. Chem.* **1978**, 21, 1070-1073.
- ¹⁰⁹ J.-N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther, G. Sennyey, *Tetrahedron Letters* **1991**, 32, 1303-1306.
- ¹¹⁰ T. Wöhr et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9218-9227.
- ¹¹¹ W. A. Gibbons, R. A. Hughes, M. Charalambous, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 1175- 1183.
- ¹¹² H. K. Chenault, J. Dahmer, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6354-6364
- ¹¹³ S. M. Birnbaum, S.-C. J. Fu, J. P. Greenstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 333-338.
- ¹¹⁴ W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1295-1300.
- ¹¹⁵ W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 3258-3261.
- ¹¹⁶ L. Yang, G. Morriello, *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, 8197-8200.
- ¹¹⁷ P. Dummy, M. Keller, D. E. Ryan, B. Rohwedder, T. Wöhr, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 918-925.
- ¹¹⁸ D. R: Flower, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1422, 207234.
- ¹¹⁹ A. M. Spiegel, *Annu. Rev. Physiol.* **1996**, 58, 143-170.
- ¹²⁰ P. J. Casey, P. A. Solski, C. J. Der, J. E. Buss, *Proc. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 8323-8327.
- ¹²¹ W. R. Schafer, R. Kim, R. Sterne, J. Thorner, S. H. Kim, J. Rine, *Science* **1989**, 245, 379-85.
- ¹²² F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annu. Rev. Biochem*, **1996**, 65, 241-269.
- ¹²³ N. S. Olesnicky, A. J. Brown, S. J. Dowell, L. A. Casselton, *EMBO J.* **1999**, 18, 2756-2763.
- ¹²⁴ T. J. Fowler, S. M. DeSimone, M. F. Mitton, J. Kurjan, C. A. Raper, *Mol. Biol. Cell* **1999**, 10, 2559-2572.
- ¹²⁵ J. Hegner, C. Siebert-Bartholmei, E. Kothe, *Fungal Genet. Biol.* **1999**, 26, 190-197.
- ¹²⁶ G. A. Caldwell, S. H. Wang, C. B. Xue, Y. Jiang, H. F. Lu, F. Naiser, J. M. Becker, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 19817-19825.
- ¹²⁷ P. J. Kosted, S. A. Gerhardt, C. M. Anderson, A. Stierle, J. E. Sherwood, *Fungal Genet. Biol.* **2000**, 29, 107-117.
- ¹²⁸ M. G. Abel, Y. L. Zhang, H. F. Lu, F. Naider, J. M. Becker, *J. Pept. Res.* **1998**, 52, 95-106.

-
- ¹²⁹ G. A. Caldwell, S. H. Wang, A. L. Dawe, F. Naider, J. M. Becker, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 197, 1173-1178.
- ¹³⁰ Y. L. Zhang, A. L. Dawe, Y. Jiang, J. M. Becker, F. Naider, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 224, 327-331.
- ¹³¹ H. Xie, J. M. Becker, R. A. Gibbs, F. Naider, *J. Pept. Res.* **2000**, 55, 372-383.
- ¹³² B. Ghebremariam, V. Sidorov, S. Matile, *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, 1445-1448.
- ¹³³ T. Ooi, Y. Kondo, K. Maruoka, *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1183-1185.
- ¹³⁴ M. Hoffman, J. Rychlewski, U. Rychlewska, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1912-1921.
- ¹³⁵ H. Kessler, H. Matter, G. Gemmecker, A. Kling, M. J. Kottenhahn, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7550-7563.
- ¹³⁶ H. Kessler, H. Matter, G. Gemmecker, M. Kottenhahn, J. W. Bats, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4805-4818.
- ¹³⁷ A. J. Brown, L. A. Casselton, *Trends Genet.* **2001**, 17, 393-400.
- ¹³⁸ N. S. Olesnicky, A. J. Honda, S. L. Dyos, S. J. Dowell, L. A. Casselton, *Genetics* **2000**, 156, 1025-33.
- ¹³⁹ H. Kessler, H. Matter, G. Gemmecker, H.-J. Diehl, C. Isernia, S. Mronga, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1994**, 43, 47-61.
- ¹⁴⁰ C. M. Wilmot, J. M. Thornton, *Protein Eng.* **1996**, 3, 479-493.
- ¹⁴¹ S. Clarke, J. P. Vogel, R. J. Deschenes, J. Stock, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 4643-4647.
- ¹⁴² J. F. Hancock, A. I. Magee, C. J. Marshall, *Cell* **1989**, 57, 1167-1177.
- ¹⁴³ K. J. Kwon-Chung, J. C. Edman, B. L. Wickers, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 602-605.
- ¹⁴⁴ R. C. Davidson, T. D. Moore, A. R. Odom, J. Heitman, *Mol. Microbiol.* **2000**, 38, 1017-1026.
- ¹⁴⁵ J. L. Beckermann, F. Naider, D. J. Ebbole, *Science* **1997**, 276, 1116-1119.
- ¹⁴⁶ R. J. Anderegg, R. Betz, S. A. Carr, J. W. Crabb, W. Duntze, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 1011-1015.
- ¹⁴⁷ J. Davey, *EMBO J.* **1992**, 11, 951-960.
- ¹⁴⁸ Y. Kamiya, A. Sakurai, S. Tamara, N. Takahashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, 83, 1077-1083.
- ¹⁴⁹ T. Miyakawa, M. Tabata, E. Tsuchiya, S. Fukui, *Eur. J. Biochem.* **1985**, 147, 489-493.
- ¹⁵⁰ Y. Ishibashi, Y. Sakagami, A. Isogai, A. Suzuki, R. J. Bandoni, *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **1983**, 61, 796-801.

-
- ¹⁵¹ W. C. Shen, P. Bobrowicz, D. J. Ebbole, *Fungal Genet. Biol.* **1999**, 253-263.
- ¹⁵² L. Zhang, R. A. Baasiri, N. K. v. Alfen, *Mol. Cell Biol.* **1998**, 18, 953-959.
- ¹⁵³ W.-F. Yu, C.-S. Tung, H. Wang, M. L. Tasayco, *Protein Science* **2000**, 9, 20-28.
- ¹⁵⁴ C. Schiene-Fischer, G. Fischer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6227-6231.
- ¹⁵⁵ A. Jabs, M. S. Weiss, R. Hilgenfeld, *J. Mol. Biol.* **1999**, 286, 291-304.
- ¹⁵⁶ D. E. Stewart, A. Sarkar, J. E. Wampler, *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, 253-260.
- ¹⁵⁷ N. Gresh, G. Tiraboschi, D. R. Salahub, *Biopolymers* **1998**, 45, 405-425.
- ¹⁵⁸ M. Thormann, H.-J. Hofmann, *J. Mol. Structure* **1999**, 469, 63-76.