

CH2Cl2.^[4] Das Keton **13** wurde von Rapoport et al. in drei Stufen in (+)-Anatoxin-a **1** überführt.

Wir haben damit eine der kürzesten und effizientesten Synthesen (34% Gesamtausbeute einschließlich der letzten bekannten Stufen) von enantiomerenangereichertem (+)-Anatoxin-a vorstellen können. Schlüsselschritte unserer Synthese sind die hoch enantioselektive Desymmetrisierung eines Achtringketons und eine neue Kaskadenreaktion zum Aufbau des 9-Azabicyclo[4.2.1]nonan-Gerüsts. Derartige Desymmetrisierungen mittelgroßer und vielleicht auch großer Ringe könnten eine breite präparative Anwendung finden.

Eingegangen am 14. Januar 1999 [Z12911]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1985–1986

Stichwörter: Anatoxin · Asymmetrische Deprotonierungen · Totalsynthesen

- [1] a) W. W. Carmichael, D. F. Biggs, P. R. Gorham, *Science* **1975**, *187*, 542; b) N. A. Mahmood, W. W. Carmichael, *Toxicon* **1987**, *25*, 1221.
- [2] Eine Übersicht über neuere Totalsynthesen von Anatoxin-a: H. L. Mansell, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 6025.
- [3] P. Thomas, M. Stephens, G. Wilkie, M. Amar, G. G. Lunt, P. Whiting, T. Gallagher, E. Pereira, M. Alkondon, E. X. Alburquerque, S. J. Wannacott, *J. Neurochem.* **1993**, *60*, 2308.
- [4] J. S. Petersen, G. Fels, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4539.
- [5] a) P. J. Cox, N. S. Simpkins, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 1; b) P. O'Brien, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 1439.
- [6] Im Verlauf unserer Versuche wurde eine enantioselektive Deprotonierung eines Achtrings beschrieben: W. F. Berkowitz, Y. Wu, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1536.
- [7] a) W. C. Still, I. Galynker, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 3981; b) N. L. Allinger, M. T. Tribble, M. A. Miller, *Tetrahedron* **1972**, *28*, 1173.
- [8] C. M. Cain, R. P. C. Cousins, G. Coubarides, N. S. Simpkins, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 523.
- [9] Newcombe und Simpkins beschrieben eine asymmetrische Synthese von (-)-Anatoxin-a unter Nutzung einer enantioselektiven Deprotonierung eines Tropanons: N. J. Newcombe, N. S. Simpkins, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 831.
- [10] Abkürzungen: AcOH = Essigsäure; Bn = Benzyl; Boc = *tert*-Butoxy-carbonyl; *p*-TsOH = *para*-Toluolsulfosäure; PDC = Pyridiniumdichromat; Tf = Trifluormethansulfonyl; THF = Tetrahydrofuran; Z = Benzyloxycarbonyl.
- [11] Zur Synthese des *N*-Methyl-Analogs des Hemiaminals **8** siehe: J. R. Wiseman, S. Y. Lee, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2485.
- [12] a) B. J. Bunn, N. S. Simpkins, Z. Spavold, M. J. Crimmin, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 3113; b) B. J. Bunn, N. S. Simpkins, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 533; c) M. Majewski, G.-Z. Zheng, *Synlett* **1991**, 173; d) M. Majewski, G.-Z. Zheng, *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 2618; e) M. Majewski, R. Lazny, P. Nowak, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5465.
- [13] Der Enantiomerenüberschuß wurde durch HPLC-Analyse an einer Chiralcel-OD-Säule (Hexan/iPROH, 98/2) bestimmt. Retentionszeiten: (*R*)-**11**: 16.8 min, (*S*)-**11**: 18.7 min.
- [14] K. C. Nicolaou, G.-Q. Shi, J. L. Gunzner, P. Gärtner, Z. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5467.
- [15] Es entstand ein einziges Diastereomer bezüglich C2. Dies steht im Einklang mit einem Bericht, nach dem die Säurekatalyse zu einer Äquilibrierung des Systems zugunsten des Ketons **13** führt.^[4]

Interaktion einer PDZ-Proteindomäne mit einer synthetischen Bibliothek aller C-Termini humarer Proteine**

Ulrich Hoffmüller,* Michael Russwurm, Frank Kleinjung, Jennifer Ashurst, Hartmut Oschkinat, Rudolf Volkmer-Engert,* Doris Koesling und Jens Schneider-Mergener*

Durch die zunehmend effizientere Sequenzierung von Genen und ganzen Genomen werden die Aminosäuresequenzen von unbekannten Proteinen immer schneller aufgeklärt. Dadurch gewinnt die Frage nach der Funktion der auf diese Weise identifizierten Proteine im entsprechenden Organismus zunehmend an Bedeutung. Neben der „klassischen“ Herangehensweise, die Aufgabe dieser Proteine mit molekulärbiologischen/biochemischen Methoden zu analysieren, wird in der Bioinformatik versucht, durch Sequenzvergleiche mit Proteinen bekannter Funktion Informationen über die neuen Proteine zu gewinnen. Dabei zeigte sich, daß große globuläre Proteine gewöhnlich aus einzelnen Domänen aufgebaut sind, die eine eigenständige Faltung und Funktion aufweisen. Viele dieser Domänen sind Proteinmodule, die in mehreren, oft nicht verwandten Proteinen vorkommen.^[1] Durch Sequenzvergleiche von Proteinen können sowohl bekannte Proteindomänen als auch neue, vorher nicht bemerkte homologe Sequenzabschnitte in den neuen Proteinen identifiziert werden.^[2] Während bekannte Domänen bereits Hinweise auf die Aufgabe eines Proteins liefern, muß die Funktion neuer Domänen experimentell ermittelt werden. Proteindomänen lassen sich in der Regel rekombinant herstellen und in vitro falten. Viele Proteindomänen spielen eine Rolle bei Signaltransduktions- und Regulationsprozessen. Hier ist die Identifizierung von Bindungspartnern ein elementarer Schritt zur Aufklärung der Funktion. Zu diesem

[*] Dr. U. Hoffmüller, Dr. R. Volkmer-Engert, Priv.-Doz. Dr. J. Schneider-Mergener
Institut für Medizinische Immunologie
Universitätsklinikum Charité
Humboldt-Universität Berlin
Schumannstraße 20/21, D-10098 Berlin
Fax: (+49) 30-2802-6460
E-mail: jsm@charite.de
M. Russwurm, Priv.-Doz. Dr. D. Koesling
Institut für Pharmakologie
Freie Universität Berlin
Thielallee 69–73, D-14195 Berlin
Dr. F. Kleinjung
Institut für Analytische Biochemie
Universität Potsdam
D-14943 Luckenwalde
Dr. J. Ashurst
Department of Plant Sciences
University of Cambridge
Downing St., Cambridge CB2 3EA (Großbritannien)
Prof. Dr. H. Oschkinat
Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
Alfred-Kowale-Straße 4, D-10315 Berlin

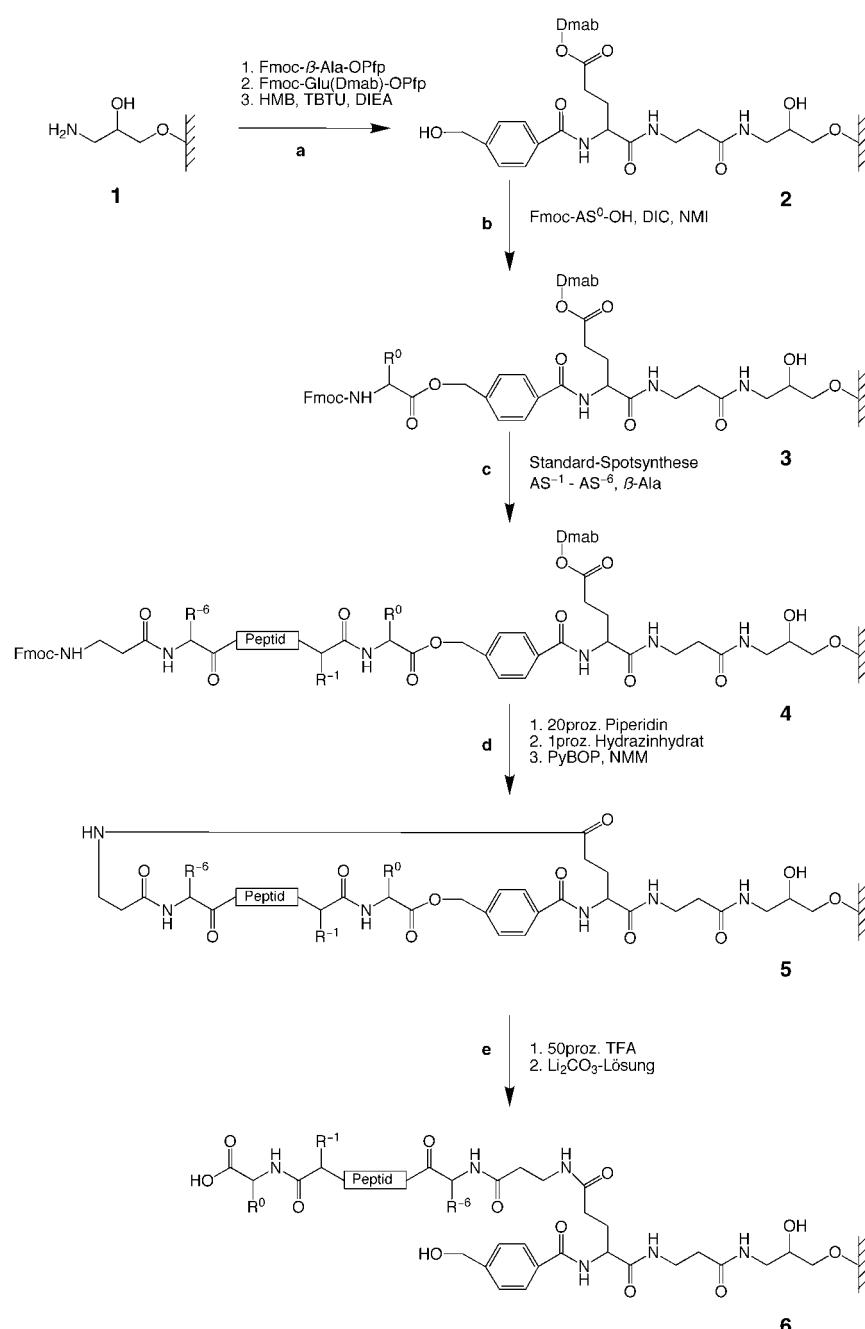
[**] Wir bedanken uns bei M. Affeldt, F. Töpert und R.-D. Stigler für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Diese Arbeit wurde unterstützt durch die DFG, INK 16A1-1, den Fonds der Chemischen Industrie und die Charité.

Zweck wird üblicherweise auf biologisch generierte Proteinbibliotheken zurückgegriffen, die nach potentiellen Bindungspartnern neu entdeckter Domänen durchsucht werden.^[3]

Wir berichten hier über die chemische Synthese einer neuartigen Bibliothek zum Auffinden von Bindungspartnern einer PDZ-Domäne. Diese besteht aus Cellulosemembran-gebundenen Peptiden mit freien Carboxytermini (C-Termini). Die PDZ-Domänen, deren Name von den Anfangsbuchstaben der Proteine, in denen sie zuerst gefunden wurden, abgeleitet wurde (**P**ost synaptic density, **D**isc large, **Z**onula **o**cludens), sind ca. 100 Aminosäuren lange Proteinmodule, die hauptsächlich in Proteinen des Cytoskeletts vorkommen und in der Signalkaskade eine Rolle spielen.^[4] Neben der beobachteten Heterodimerisierung^[5] wechselwirken PDZ-Domänen vor allem mit den C-Termini ihrer Bindungspartner, wobei die terminale Carboxygruppe für die Bindung essentiell ist.^[6]

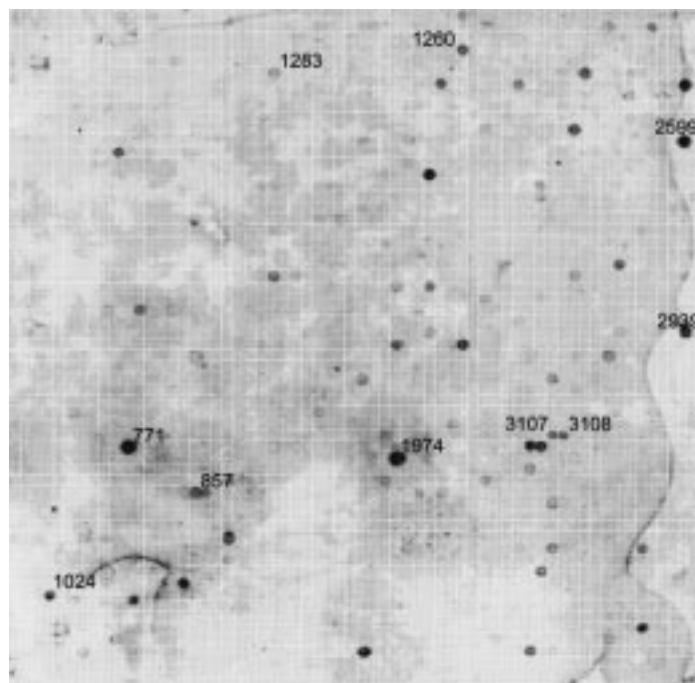
Um diese Interaktion mit Cellulose-gebundenen Peptidbibliotheken untersuchen zu können, wurde eine Methode zur ortsgerichteten Generierung von membrangebundenen, invertierten Peptiden entwickelt. Die Peptide werden durch Spotsynthese synthetisiert,^[7] cyclisiert und anschließend unter Bildung eines freien C-Terminus wieder linearisiert^[8] (Schema 1). Auf diese Weise wurden die C-Termini aller bekannten humanen Proteine (SWISSPROT-Datenbank, release 34, 3514 Sequenzen) synthetisiert und bezüglich der Bindung an eine Syntrophin-PDZ-Domäne^[9] getestet (Abbildung 1). Es wurden 38 deutlich bindende C-Termini identifiziert und von ausgewählten Peptiden die Dissoziationskonstanten des Peptid-PDZ-Komplexes bestimmt (Tabelle 1).

Neben einem spannungsgeregelten Natriumkanal, der zuvor durch zwei unterschiedliche Herangehensweisen als PDZ-Bindungspartner erkannt worden war,^[10, 11] hat die α_2 -Untereinheit der löslichen Guanylatcyclase und der α -1A-adrenerge Rezeptor die am stärksten bindenden C-Termini. Die Wechselwirkung mit dem α -1A-adrenergen Rezeptor ist wahrscheinlich, da sowohl dieses Membranprotein als auch Syntrophin in Herzmuskelzellen vorkommen.^[12] Die potentielle Interaktion der löslichen Guanylatcyclase^[13] ist besonders interessant, da noch keine Bindungspartner dieses Enzyms bekannt sind,



Schema 1. Synthese von invertierten Peptiden an Cellulosemembranen. Aminopropylether-Cellulose^[17] **1** wird als Träger verwendet. a) β-Alanin dient als Spacer und zur Definition der Syntheseorte.^[7] Dmab-Glutaminsäure als bivalenter Linker und Hydroxymethylbenzoësäure (HMB) als basenlabile Schnittstelle werden gekuppelt (→**2**). b) Die zukünftige C-terminale Aminosäure wird über eine Esterbindung angeknüpft (→**3**). c) Restliche Aminosäuren und β-Alanin als Spacer werden gekuppelt (→**4**). d) Die Fmoc- und Dmab-Schutzgruppe am N-Terminus bzw. an der Seitenkette der Glutaminsäure werden abgespalten, danach erfolgt die Cyclisierung zu **5**. e) Nach Abspaltung der Seitenschutzgruppen wird die Esterbindung hydrolysiert. Diese linearisiert das Konstrukt, und ein freier C-Terminus entsteht (→**6**). – Dmab=α-4-[N-(1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]amino]benzyl, Fmoc=9-Fluorenylmethoxycarbonyl, HMB=4-Hydroxymethylbenzoësäure, TBTU=2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat, DIEA=N,N-Diisopropylethylamin, DIC=Diisopropylcarbodiimid, NMI=N-Methylimidazol, PyBOP=Benzotriazol-1-yloxytrityrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat, NMM=N-Methylmorpholin, TFA=Trifluoressigsäure.

dessen Gen durch cDNA-Sequenzierung identifiziert wurde. Das Enzym lässt sich durch NO aktivieren und bildet dann den Botenstoff cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP).

Tabelle 1. Syntrophin-PDZ-bindende Peptide aus humanen C-Termini.^[a]

| Spot | Sequenz | K _D | Datenbank-Nr. | Proteinbeschreibung in der Datenbank |
|------|----------|----------------|---------------|---|
| 95 | AKRCGCI | | P39905 | glial cell line-derived neurotrophic factor precursor |
| 250 | CHSETVV | | P01135 | transforming growth factor alpha precursor |
| 771 | FLRETSI | 6 μM | P33402 | guanylate cyclase soluble, alpha-2 chain (EC 4.6.1.2) |
| 857 | GDRFFTI | 1.3 mM | P18440 | arylamine N-acetyltransferase, monomorphic (EC 2.3.1.5) |
| 940 | GLNQRRI | | P07766 | T-cell surface glycoprotein CD3 epsilon chain precursor |
| 1016 | GTRLTVV | | P01733 | T-cell receptor beta chain precursor V region (YT35) |
| 1024 | GVKESLV | 76 μM | P35499 | sodium channel protein, skeletal muscle alpha-subunit |
| 1260 | IRTVVKI | 804 μM | P11766 | alcohol dehydrogenase class III chi chain (EC 1.1.1.1) |
| 1283 | ITTKKYI | > 500 μM | P51587 | breast cancer type 2 susceptibility protein |
| 1318 | KAVETDV | | P22459 | potassium channel protein KV1.4 |
| 1477 | KRISKRI | | P07148 | fatty acid-binding protein, liver (L-FABP) |
| 1643 | LKFRTETI | | P49888 | estrogen sulfotransferase (EC 2.8.2.4) |
| 1677 | LLRHERI | | P16415 | zinc finger protein ZFP-36 (fragment) |
| 1774 | LRHWLKV | | Q01959 | sodium-dependent dopamine transporter |
| 1780 | LRRESEI | | P48049 | inward rectifier potassium channel 2 |
| 1974 | NLRETDI | 3 μM | P25100 | alpha-1A adrenergic receptor. |
| 2331 | PSQGHQP | | P28329 | choline O-acetyltransferase (EC 2.3.1.6) |
| 2396 | QSLETSV | | P48050 | calcium-transporting ATPase plasma membrane, isoform 4 |
| 2470 | RGMRGKI | | P15248 | interleukin-9 precursor (IL-9) |
| 2484 | RIRHFKV | | P02765 | alpha-2-HS-glycoprotein precursor (FETUIN) |
| 2499 | RKSRRTI | – | P01589 | interleukin-2 receptor alpha chain precursor |
| 2569 | RRSAGFI | | P48645 | neuromedin U-25 precursor (contains: NMU-25) |
| 2599 | RTRITFV | 45 μM | P33993 | DNA replication licensing factor CDC47 homolog |
| 2666 | SERISSV | | P28335 | 5-hydroxytryptamine 2C receptor |
| 2813 | SQKETSI | | P53618 | coatomer beta subunit (beta coat protein) (beta-COP) (fragment) |
| 2939 | TCRTSII | | P47872 | secretin receptor precursor (SCR-R) |
| 2972 | THFLPRI | | P10767 | fibroblast growth factor-6 precursor (FGF-6) (HBGF-6) |
| 3007 | TKNRFVV | | P06730 | eukar. initiation factor 4 E (EIF-4E) |
| 3107 | TRVTVLG | 246 μM | P01702 | Ig lambda chain V-I region (NIG-64) |
| 3108 | TRTVTLS | 354 μM | P01705 | Ig lambda chain V-II region (NEI) |
| 3125 | TSRETDL | | P22460 | potassium channel protein KV1.5 (HK2) (HPCN1) |
| 3126 | TSRITTL | | P30872 | somatostatin receptor type 1 (SS1R) (SRIF-2) |
| 3165 | VAAFNKI | | P24534 | elongation factor 1-beta (EF-1-BETA) |
| 3181 | VCYQCKI | | P26371 | keratin, ultra high-sulfur matrix protein (UHS keratin) |
| 3307 | VQDKRFI | | Q07001 | acetylcholine receptor protein, delta chain precursor |
| 3346 | VTVETVV | | P04201 | MAS proto-oncogene |
| 3455 | YLRRSDV | | P35080 | profilin II |
| 3485 | YRRESAI | | P48050 | inward rectifier potassium channel 4 |

[a] Die Tabelle zeigt die Spotnummer, die der Position in der Bibliothek entspricht (Abbildung 1), die Aminosäuresequenz, die Datenbanknummer des entsprechenden SWISSPROT-Eintrags und die Proteinbeschreibung der 38 identifizierten C-Termini. Für ausgewählte Peptide wurden die Dissoziationskonstanten (K_D) bestimmt.

Durch Copräzipitation und anschließenden Western Blot wurde die Bindung der nativen Cyclase mit der Syntrophin-PDZ-Domäne bestätigt (Abbildung 2 A). Auch funktionell ist diese Interaktion wahrscheinlich interessant (Abbildung 2 C), da auch die NO-Synthase mit Syntrophin interagiert^[5] und auch die cGMP-abhängige Proteinkinase an der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran nachgewiesen wurde.^[14] Diese räumliche Nähe der drei Komponenten der NO/cGMP-vermittelten Signaltransduktionskaskade ermöglicht lokal höhere Konzentrationen der Enzymaktivatoren NO und cGMP und damit eine effizientere Weiterleitung des Signals.

Abbildung 1. Bibliothek aus carboxyterminalen Peptiden aller bekannten humanen Proteine. Die Cellulose-gebundene Bibliothek enthält die C-Termini (Heptamere) aller humanen Proteine der SWISSPROT-Datenbank (release 34). Die Abbildung zeigt die gemessene Chemolumineszenz nach der Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase-markierter Syntrophin-PDZ-Domäne. Die Nummern entsprechen Peptiden, für die die Dissoziationskonstanten bestimmt wurden. Die 38 am stärksten bindenden Peptide sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

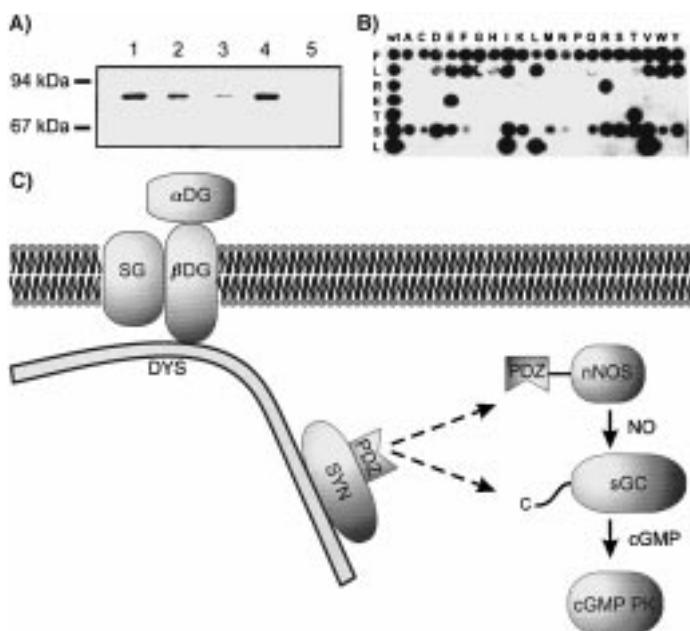


Abbildung 2. A) Wechselwirkung zwischen löslicher Guanylylcyclase und Syntrophin. Guanylylcyclase enthaltendes Zell-Lysat^[20] wurde mit Sepharose-gebundener Syntrophin-PDZ-Domäne inkubiert.^[10] Durch Zentrifugation wurde die PDZ-Domäne präzipitiert, und das Verbleiben der Cyclase wurde durch Western Blot^[22] untersucht. Im Kontrollversuch wurde das C-Terminale Peptid FLRETS-COOH der Cyclase zugesetzt. Spur 1: Zell-Lysat, Spur 2: Überstand, Spur 3: Sediment, Spur 4: Überstand (Kontrollversuch), Spur 5: Sediment (Kontrollversuch). B) Substitutionsanalyse des C-Terminus der Cyclase. Das Peptid FLRETS und seine Einzelaustauschanaloga wurden auf einer Cellulosemembran synthetisiert und die Bindung zur Syntrophin-PDZ-Domäne getestet. Die erste Spalte (wt) enthält als Kontrolle identische Peptide mit der Sequenz FLRETS. An jeder Position wurde die entsprechende Aminosäure (Zeilen) durch alle 20 L-Aminosäuren (Spalten) substituiert. Dadurch wurden die Aminosäuren Arginin (R), Glutaminsäure (G) und Threonin (T) als Schlüsselreste identifiziert, die nicht ohne Bindungsverlust ausgetauscht werden können. An der C-terminalen Position kann neben Leucin (L) auch Isoleucin (I) oder Valin (V) stehen. C) Syntrophin im zellulären Umfeld (Modell). Dystrophin (DYS) ist über α - und β -Dystroglykan (α DG, β DG) und Sarkoglycan (SG) am Sarkolemma in den motorischen Endplatten verankert.^[23] Syntrophin (SYN) hängt am Dystrophin^[24] und bringt die neuronale NO-Synthase (nNOS) und die lösliche Guanylylcyclase (sGC) in räumliche Nähe des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes. nNOS, sGC und die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGMP PK), die ebenfalls mit dem Sarkolemma assoziiert ist, bilden eine Signaltransduktionskaskade mit den Mediatoren NO und cGMP.

Die Untersuchung der Bindungsspezifität dieser Syntrophin-PDZ-Domäne wurde durch die neuartige Methode zur Synthese von Peptidbibliotheken mit freiem C-Terminus ermöglicht. Eine Auswahl von bindenden Peptiden zeigte in nichtinvertierter Form auf Cellulose keine oder nur erheblich geringere Bindung (nicht gezeigt). Für eine breitere Anwendung dieser Vorgehensweise zur Identifizierung von linearen Bindungsstellen, die nicht am N- oder C-Terminus liegen, müßte eine wesentlich größere Zahl von Peptiden synthetisiert und getestet werden. Die Auswahl von Sequenzen, die z.B. auf der Oberfläche von Proteinen bekannter Struktur liegen, reduziert die Zahl der Peptide auf ein Maß, das in Zukunft präparativ handhabbar sein wird.

Durch die neu entwickelte Methode steht neben der zukünftigen Identifizierung von Bindungspartnern anderer

PDZ-Domänen nun auch einer detaillierteren Aufklärung ihrer Bindungsspezifität durch Substitutionsanalysen (Abbildung 2B) nichts mehr im Wege. Weitere Protein-Peptid-Interaktionen, bei denen terminale Carboxygruppen eine Rolle spielen, wie z.B. für einige monoklonale Antikörper beschrieben,^[15] lassen sich ebenfalls untersuchen. Variationen dieser Methode ermöglichen zudem die Synthese von Peptiden mit modifizierten C-Terminen.^[16] Dies ebnet den Weg zur Untersuchung der biologischen Funktion von C-terminalen Modifikationen durch Peptidbibliotheken.

Experimentelles

Synthese der Bibliothek (Schema 1): Für die Bibliothek wurden Peptide der Kettenlänge sieben ausgewählt, da in den bisher bekannten PDZ-Peptid-Komplexen die sieben C-terminalen Aminosäuren für die Wechselwirkung ausreichen. Als Träger dient Whatman-50-Filterpapier (20 × 30 cm), das über einen 3-Amino-2-hydroxy-propylether-Anker aminofunktionalisiert ist.^[17] Die Verbindungen werden durch Spot-Technik^[7] synthetisiert. a) 0.3 M Fmoc- β -Alanin-OPfp in DMSO (Pfp = Pentafluorphenylester), Doppelkupplung, 2 × 15 min; Fmoc-Abspaltung, 20proz. Piperidin in DMF, 2 × 5 min; 0.3 M Dmab-Glutaminsäure-OH, 0.6 M DIEA, 0.3 M DIC, 0.3 M Pfp in N-Methylpyrrolidin (NMP), Doppelkupplung, 2 × 15 min; Fmoc-Abspaltung, 20proz. Piperidin in DMF, 2 × 5 min; 0.3 M HMB, 0.6 M DIEA, 0.3 M TBTU, Vierfachkupplung, 4 × 15 min. b) 0.3 M Fmoc-AS-OH, 0.3 M DIC, 0.6 M NMI, Vierfachkupplung, 4 × 15 min. c) 0.3 M Fmoc-AS-OPfp, Standard-Spotssynthese.^[7] d) Fmoc-Abspaltung, 20proz. Piperidin in DMF, 2 × 5 min; Dmab-Abspaltung, 1proz. Hydrazinhydrat in DMF, max. 2 × 3 min (zur Vermeidung der Ester-Hydrazinolyse); Cyclisierung mit 300 mg PyBOP und 100 μ L NMM in 40 mL DMF, 1 × 4 h, 1 × 16 h. e) Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen, 50% TFA, 1% Phenol, 2% Wasser, 3% Triisobutylsilan (TIBS) in CH_2Cl_2 , 2.5 h; Esterhydrolyse, ges. Li_2CO_3 -Lsg. in H_2O , 16 h. Aufgrund der notwendigen stabilen Etherbrücke zur Cellulose sind die Peptide analytisch unzugänglich. Daher wurde zur Bestätigung des Verfahrens die Synthese analog an Tentagel-S-RAM-Harz (Rapp Polymere, Tübingen) durchgeführt. In der Regel liefern die Synthesen an Cellulose sowie am Harz Peptide ähnlicher Reinheit.^[7, 17] Nach Abspaltung vom Harz wurde das Produkt durch Umkehrphasen-HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Verbindung 6 mit der Peptidsequenz NYKQTSV wurde mit 87% Reinheit erhalten, und das Massenspektrum zeigte die berechnete Masse von 6 (nicht gezeigt).

Nachweis der Interaktion der PDZ-Domäne mit der membrangebundenen Peptid-Bibliothek. Die PDZ-Domäne als Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionsprotein^[10] wird mit den Zuckergruppen der Meerrettich-Peroxidase vernetzt.^[18] Die Membran mit der Bibliothek wird mit Ethanol, dann mit TBS (50 mM Tris-Puffer, 100 mM NaCl, pH 8.0) gewaschen, mit Blockierungspuffer (CRB, Northwich, Großbritannien) 2 h blockiert und anschließend mit 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ markierter Domäne in Blockierungspuffer bei 4 °C 16 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Bibliothek mit TBS wird die gebundene Domäne durch Zugabe des Chemolumineszenzsubstrats Lumi-Light Plus Western Blotting Substrate im Lumi-Imager (Boehringer Mannheim) nachgewiesen.

ELISA-Messung der Dissoziationskonstanten: Mikrotiterplatten werden mit Streptavidin (125 ng pro Probenvertiefung in 0.1 M Carbonatpuffer, pH 9.6) beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (=10 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7.3)/0.1% Tween 20 (Merck, Darmstadt) werden 50 μL Peptid Biotin- β A- β A-FLRETS-COOH (β A: β -Alanin) (100 μM) in Wasser zugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0.1% Tween 20 wird Meerrettich-Peroxidase-markierte Syntrophin-PDZ-Domäne in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Peptide (0.5–250 μM) in PBS/0.1% Tween 20/6% Gelfundol (Biotez, Dreieich) in die Vertiefungen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0.1% Tween 20 wird die Enzymaktivität durch 5.5 mM o-Phenyldiamindihydrochlorid (Fluka, Buchs, Schweiz)/8.5 mM H_2O_2 in 0.1proz. Citratpuffer (pH 5.0) gemessen. Durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure/0.05 M Natriumsulfit wird die Reaktion abgebrochen. Die Absorption wird bei 492 und 620 nm (Referenz) gemessen. Inhibitionskonstanten wurden nach Friguet et al.^[19]

berechnet. Die durch ELISA ermittelten Werte wurden durch Gitterkopplermessungen bestätigt (F. Kleinjung, nicht gezeigt).

Expression der löslichen Guanylatcyclase und Präzipitationsexperimente: Die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform der löslichen Guanylatcyclase wird in Sf9-Insektenzellen exprimiert.^[20] Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 800 g für 10 min gesammelt, in Pufferlösung (2 mM Dithiothreit, 2 mM EDTA, 0.2 μ M Benzamidin, 0.5 mM Phenylmethansulfonsäurefluorid, 1 μ M Pepstatin A und 50 mM Triethanolamin/HCl, pH 7.4) aufgenommen und durch Ultraschall lysiert; das Cytosol wird durch Ultrazentrifugation (200.000 g, 30 min, 4 °C) gewonnen. – Das Syntrophin-PDZ-GST-Fusionsprotein wird an Glutathion-Sepharose CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) entsprechend den Herstellerangaben gekuppelt. Proteinkonzentrationen werden nach der Methode von Bradford^[21] bestimmt. – Die Präzipitation der Guanylatcyclase wird mit 2 mg cytosolischem Sf9-Zell-Protein und 1 mg Sepharose-gebundener PDZ-Domäne in einem Volumen von 500 μ L (75 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DL-Dithiothreit, 50 mM TEA, pH 7.4) 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Sedimentation der Sepharose erfolgt auf Eis (5 min), anschließend werden die Proteine der entsprechenden Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt (7.5proz. Gel). Zur Detektion der Cyclase wird eine Immunoblot-Analyse, wie bei Harteneck et al.^[22] beschrieben, durchgeführt. Die Antikörper sind gegen das C-terminale Peptid der α_2 -Untereinheit (KKVSYNIGTMFLRETS) gerichtet.

Eingegangen am 23. Dezember 1998 [Z12821]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2000–2004

Stichwörter: Molekulare Erkennung • Peptide • Protein-Protein-Wechselwirkungen

- [1] P. Bork, J. Schultz, C. P. Ponting, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 296–298.
- [2] P. Bork, E. V. Koonin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 366–376.
- [3] a) J. K. Scott, G. P. Smith, *Science* **1990**, *249*, 386–390; b) S. Fields, O. Song, *Nature* **1989**, *340*, 245–246.
- [4] a) K. O. Cho, C. A. Hunt, M. B. Kennedy, *Neuron* **1992**, *9*, 929–942; b) C. P. Ponting, C. Phillips, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 102–103; c) C. P. Ponting, C. Phillips, K. E. Davies, D. J. Blake, *BioEssays* **1997**, *19*, 469–479.
- [5] J. E. Brennan, S. S. Chao, S. H. Gee, A. W. McGee, S. E. Craven, D. R. Santillano, Z. Wu, F. Huang, H. Xia, M. F. Peters, S. C. Froehner, D. S. Brendt, *Cell* **1996**, *84*, 757–767.
- [6] J. Saras, C. Heldin, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 455–458.
- [7] a) R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217–9232; b) R. Frank, H. Overwin, *Methods Mol. Biol.* **1996**, *66*, 149–169; c) A. Kramer, J. Schneider-Mergener, *Methods Mol. Biol.* **1998**, *87*, 25–39.
- [8] a) R. S. Kania, R. N. Zuckermann, C. K. Marlowe, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8835–8836; b) M. Lebl, V. Krchnak, N. F. Sepetov, V. Nikolaev, A. Stierradova, P. Safar, B. Seligmann, P. Stop, P. Thorpse, S. Felder, D. F. Lake, K. S. Lam, S. E. Salmon in *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis* (Hrsg.: R. Epton), Mayflower Worldwide, Oxford, **1994**, S. 233.
- [9] M. E. Adams, T. M. Dwyer, L. L. Dowler, R. A. White, S. C. Froehner, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 25859–25865.
- [10] J. Schultz, U. Hoffmüller, G. Krause, J. Ashurst, M. Macias, P. Schmieder, J. Schneider-Mergener, H. Oschkinat, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 19–24.
- [11] S. H. Gee, R. Madhavan, S. R. Levinson, J. H. Caldwell, R. Sealock, S. C. Froehner, *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 128–137.
- [12] a) L. Fu, G. Wallukat, A. Hjalmarson, J. Hoebeke, *Clin. Exp. Immunol.* **1994**, *97*, 146–151; b) A. H. Ahn, C. A. Freener, E. Gussoni, M. Yoshida, E. Ozawa, L. M. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2724–2730.
- [13] D. Koesling, J. Herz, H. Gausepohl, F. Niroomand, K. D. Hinsch, A. Mulsch, E. Böhme, G. Schultz, R. Frank, *FEBS Lett.* **1988**, *239*, 29–34.
- [14] D. S. Chao, F. Silvagno, H. Xia, T. L. Corwell, T. M., Lincoln, D. S. Bredt, *Neuroscience* **1997**, *76*, 665–672.
- [15] T. C. Liang, W. Luo, J. T. Hsieh, S. H. Lin, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *329*, 208–14

- [16] M. Davies, M. Bradley, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1135–1138; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1097–1099.
- [17] R. Volkmer-Engert, B. Hoffmann, J. Schneider-Mergener, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1029–1032.
- [18] M. B. Wilson, P. K. Nakane in *Immunofluorescence Related Staining Techniques* (Hrsg.: W. Knapp, K. Hlubek, G. Wick), Elsevier, Amsterdam, **1978**, S. 215–224.
- [19] B. Friguet, A. F. Chaffotte, L. Djavadi-Ohaniance, M. E. Goldberg, *J. Immunol. Methods* **1985**, *77*, 305–319.
- [20] M. Russwurm, S. Behrends, C. Harteneck, D. Koesling, *Biochem. J.* **1998**, *335*, 125–130.
- [21] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [22] C. Harteneck, B. Wedel, D. Koesling, J. Malkewitz, E. Böhme, G. Schultz, *FEBS Lett.* **1991**, *292*, 217–222.
- [23] M. Michalak, M. Opas, *Curr. Opin. Neurol.* **1997**, *10*, 436–42.
- [24] A. Castello, V. Brocheriou, P. Chafey, A. Kahn, H. Gilgenkrantz, *FEBS Lett.* **1996**, *383*, 124–128.

Ein polymeres Gastmolekül wandelt Clathrat-käfige in Kanäle um: Einkristall-Röntgenstrukturanalyse von Tetra-n-butylammonium-polyacrylat-Hydrat ($n\text{Bu}_4\text{NPA} \cdot 40\text{H}_2\text{O}$)**

Konstantin A. Udachin und John A. Ripmeester*

Ein tiefergehendes Verständnis der Hydratisierung von Makromolekülen ist hinsichtlich der Anordnung des Wassers im engen Kontakt mit Biopolymeren sowie synthetischen organischen Polymeren von bedeutendem praktischem und theoretischem Interesse.^[1–3] Obwohl die strukturellen Aspekte der Hydratisierung von Biopolymeren gut untersucht sind,^[4] hauptsächlich aufgrund der Fortschritte in der Proteinkristallographie und bei Computersimulationen,^[5] erwies es sich bislang als schwierig, hydratisierte Polymere mit genügend weitreichender Ordnung zu finden, um Beugungsbilder mit Auflösungen wie bei kleinen Molekülen zu erhalten. Hier berichten wir über die erste Strukturuntersuchung eines in einem kristallinen Clathrat eingelagerten Polymers, Polyacrylsäure (PA), mit Tetra-n-butylammoniumhydroxid als zweiter Gastverbindung.

Den umfangreichen Arbeiten von Jeffrey et al.^[6] über die Struktur von Alkylammoniumsalz-Hydraten mit verschiedenen kleinen anionischen Gegenionen folgend berichtete Nakayama^[7] über die ersten Hydrate mit polymeren Anionen. Er ermittelte die Phasendiagramme von $n\text{Bu}_4\text{NPA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ^[8] und $i\text{Am}_4\text{NPA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ und beschrieb die ungefähre Zusammensetzung der Hydrate als $n\text{Bu}_4\text{NPA} \cdot 30\text{H}_2\text{O}$ und $i\text{Am}_4\text{NPA} \cdot 42\text{H}_2\text{O}$. Bemerkenswerterweise fanden Bogatyrov et al.,^[9] daß Tetra-n-alkylammonium-Polyhydrate auch innerhalb

[*] Dr. J. A. Ripmeester, Dr. K. A. Udachin
Steacie Institute for Molecular Sciences
National Research Council of Canada, 100 Sussex Drive
Ottawa, Ontario, K1A 0R6 (Kanada)
Fax: (+1) 613-998-7833
E-mail: jar@ned1.sims.nrc.ca

[**] NRCC-Publikation 40908. K.A.U. wurde im Rahmen des NATO Science Programme durch einen Collaborative Research Grant unterstützt.