

einschließlich der Substituenten- und Lösungsmiteleinflüsse auf die Isomerenverteilung.

Eingegangen am 17. Juli 2000 [Z15457]

- [1] J. P. Hogan, R. L. Banks (Phillips Petroleum), US-A2825721, **1958** [Chem. Abstr. **1958**, 52, 8621h].
- [2] M. Rätzsch, *Polymerwerkstoffe '98* (Merseburg) 23.–25. September **1998**; M. Rätzsch, *Kunststoffe* **1996**, 86, 6; R. Messere, A. F. Noels, P. Dournel, N. Zandona, J. Breulet, *Proc. Metallocenes '96* (Düsseldorf), 6.–7. März **1996**, 309–322.
- [3] J. R. Briggs, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 674–675.
- [4] M. E. Lashier (Phillips Petroleum Company), EP0 780 353, **1995** [Chem. Abstr. **1995**, 127, P50277g].
- [5] K. H. Theopold, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1998**, 15–24.
- [6] R. Emrich, O. Heinemann, P. W. Jolly, C. Krüger, G. P. J. Verhovnik, *Organometallics* **1997**, 16, 1511–1513.
- [7] C. Pellecchia, D. Pappalardo, L. Oliva, M. Mazzeo, G.-J. Gruter, *Macromolecules* **2000**, 33, 2807–2814.
- [8] a) M. Haufe, R. D. Köhn, G. Kociok-Köhn, A. C. Filippou, *Inorg. Chem. Commun.* **1998**, 1, 263–266; b) R. D. Köhn, G. Kociok-Köhn, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1958–1960; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1877–1879; c) R. D. Köhn, G. Kociok-Köhn, M. Haufe, *J. Organomet. Chem.* **1995**, 501, 303–307; d) M. Haufe, R. D. Köhn, R. Weimann, G. Seifert, D. Zeigan, *J. Organomet. Chem.* **1996**, 520, 121–129; e) R. D. Köhn, M. Haufe, S. Mihan, D. Lilje, *Chem. Commun.* **2000**, 1927–1928.
- [9] Experimentelle Einzelheiten zur Synthese und Analytik neuer Verbindungen und der Trimerisierung sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.
- [10] D. H. Grant, *J. Chem. Educ.* **1995**, 72, 39–40.
- [11] Kristallstrukturanalyse von **2a**: Kristallabmessungen $0.57 \times 0.57 \times 0.01$ mm, monoklin, $P2_1/n$ (Nr.14), $Z = 4$; $a = 6.933(2)$, $b = 36.796(8)$, $c = 12.760(4)$ Å, $\beta = 95.32(4)^\circ$, $V = 3241.3(16)$ Å³, $\rho_{\text{ber}} = 1.193$ g cm⁻³, $F(000) = 1260$, $T = 110(2)$ K, Stoe IPDS Flächenzähler, $2.31^\circ \leq \theta \leq 26.34^\circ$, $(\lambda(\text{MoK}\alpha) = 0.71073$ Å, $\mu = 0.609$ mm⁻¹), 22969 beobachtete Reflexe, davon 6499 unabhängig ($R_{\text{int}} = 0.2330$), 6456 beobachtete Reflexe ($I > 2\sigma(I)$), empirische Absorptionskorrektur (ABSCOR, min. 0.254, max. 1.445) Patterson- und Fourier-Synthese (SHELXS-86 und SHELXL-97), 308 Parameter, $R_1 = 0.1155$, $wR_2 = 0.2469$, GOF = 1.193, max./min. Reste elektronendichte $0.870/-0.951$ e Å⁻³. $\chi = 0.0042(13)$ für sekundäre Extinktion. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-134609“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [12] M. V. Baker, D. H. Brown, B. W. Skelton, A. H. White, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, 763–768.
- [13] S.-J. Wu, G. P. Stahly, F. R. Fronczek, S. F. Watkins, *Acta Crystallogr. C* **1995**, 51, 18–20.

Analyse des Pheromonbindeprotein-Pheromon-Komplexes des Seidenspinners durch Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie

Neil J. Oldham,* Jürgen Krieger, Heinz Breer, Annette Fishedick, Michal Hoskovec und Aleš Svatoš

Seit Butenandt vor vier Jahrzehnten Bombykol ((10E,12Z)-Hexadeca-10,12-dien-1-ol) als Sexuallockstoff des weiblichen Seidenspinners (*Bombyx mori*)^[1] identifizierte, wurden beachtliche Fortschritte im Verständnis der Pheromonchemie und -biologie erzielt, wobei *B. mori* als ein nützlicher Modellorganismus für detaillierte Untersuchungen zur chemischen Kommunikation diente. So entstand und entsteht ein immer vollständigeres Bild, von der Bombykol-Biosynthese und deren Regulation beim Seidenspinnerweibchen bis hin zur Pheromondetektion und zum Abbau der Signalmoleküle in den Antennen des Männchens.^[2] Gerade auf dem Feld der Pheromondetektion haben zahlreiche Arbeiten ein detailliertes Modell von den Vorgängen auf molekularer Ebene hervorgebracht: Die lipophilen Pheromonmoleküle gelangen durch Poren in der Kutikula in die Sinneshaare der Antennen (Sensillen), wo sie mit der wässrigen Lymphe in Kontakt kommen, welche die Rezeptorzellen (Nervenzellen) umgibt. Sie werden dort durch Komplexbildung mit einem Pheromonbindeprotein (PBP; ein kleines (<20 kDa), wasserlösliches Lipidbindeprotein)^[3] in Lösung gebracht und zur Nervenzellmembran transportiert. In dieser Membran befindet sich der eigentliche Pheromonrezeptor, der aller Wahrscheinlichkeit nach an ein G-Protein assoziiert ist.^[4] Bei Aktivierung des Rezeptors wird eine Second-Messenger-Kaskade ausgelöst; Ionenkanäle öffnen sich und ein Rezeptorpotential wird generiert.

Fortschritte zur vollständigen strukturellen Charakterisierung des *B. mori*-Pheromonbindeproteins (BmPBP) wurden sehr rasch erzielt: Die Klonierung der cDNA resultierte in der Entschlüsselung der Aminosäuresequenz,^[5] das Disulfidbrückenbindungsmuster konnte bestimmt werden,^[6] und schließlich wurde auch die Kristallstruktur des Komplexes aus Bombykol und BmPBP röntgenstrukturanalytisch aufgeklärt.^[7] Um die Wechselwirkungen zwischen dem Pheromon und dem Bindeprotein genauer zu verstehen, untersuchten wir das System mit Hilfe der Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) unter nichtdenaturierenden Bedingungen. Es ist möglich, nichtkovalent gebun-

[*] Dr. N. J. Oldham
Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie
Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (Deutschland)
Fax: (+49) 3641-643-665
E-mail: oldham@ice.mpg.de

Dr. J. Krieger, Prof. Dr. H. Breer, A. Fishedick
Institut für Physiologie
Universität Stuttgart-Hohenheim
Garbenstraße 30, 70593 Stuttgart (Deutschland)

Dr. M. Hoskovec, Dr. A. Svatoš
Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky
Flemingovo nám. 2, Prag 6-Dejvice, 16610 (Tschechische Republik)

dene Protein-Ligand-Komplexe nach sorgfältiger Optimierung der Geräteparameter, unter Verwendung von nahezu neutralem Sprühpuffer und bei niedriger Desolvatisierungsgas-Temperatur (30 °C) in der Gasphase zu beobachten.^[8] Beispiele für Protein-gebundene Liganden, die bereits mit dieser Methode untersucht wurden, sind Enzym-Cofaktoren,^[9] -Substrate^[10] und -Inhibitoren.^[11]

Wir gingen davon aus, dass es möglich ist, diese Methode auch auf das BmPBP-Bombykol-System anzuwenden und dadurch den nichtkovalenten Komplex in der Gasphase zu beobachten. Abbildung 1 zeigt das (transformierte) ESI-

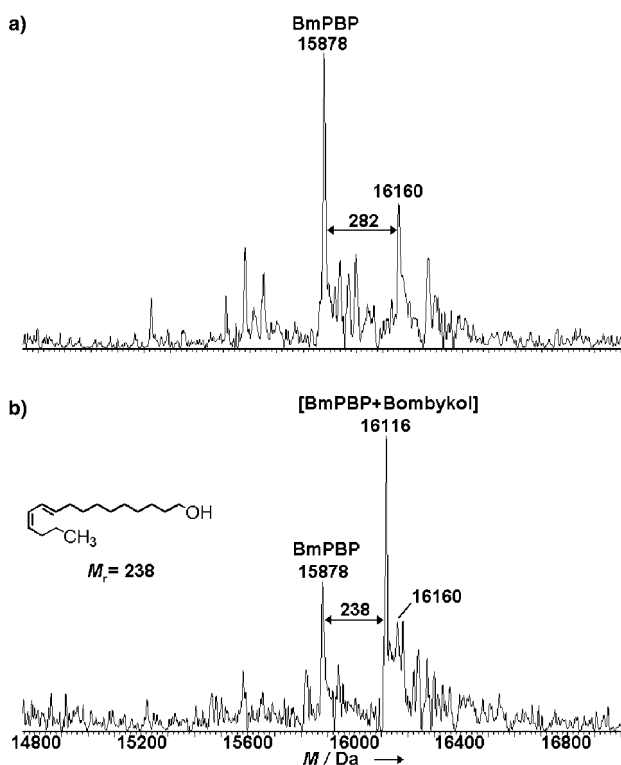


Abbildung 1. Transformiertes ESI-Massenspektrum von BmPBP (a) und von BmPBP nach Inkubation mit Bombykol (b). Die Spektren zeigen deutlich das Vorhandensein des BmPBP-Bombykol-Komplexes bei 16116 Da.^[12]

Massenspektrum von rekombinantem BmPBP sowie das von BmPBP nach Inkubation mit Bombykol (20 Mol-Äquiv., ca. 14 h).^[12] Der größte Peak in der oberen Spur (Abbildung 1a) tritt bei einer Masse von 15878 Da auf. Diese ist identisch mit der theoretischen Masse, die aus der BmPBP-Aminosäuresequenz abgeleitet werden kann, und mit der unter ESI-Standardbedingungen (denaturierend) gemessenen Masse (Sprühlösung: Wasser/Acetonitril (80/20) mit 0.1 % Ameisensäure; Daten nicht aufgeführt). Ein zweiter signifikanter Peak bei 16160 Da erscheint nur unter nichtdenaturierenden Bedingungen und wird deshalb auf ein nichtkovalent gebundenes BmPBP-Addukt mit einem Molekül der Masse 282 Da zurückgeführt. Dieses Molekül wurde wahrscheinlich während der Expression oder Aufreinigung des rekombinanten Proteins in das Protein eingebracht. Interessanterweise hat Ölsäure eine Masse von 282 Da. Die Behandlung von PBP mit dieser verbreiteten Fettsäure im Überschuss führte zu

einer bedeutenden Erhöhung des Peaks bei 16160 Da. Bisher konnten wir jedoch das gebundene Molekül noch nicht eindeutig als Ölsäure identifizieren.

Nach Inkubation von BmPBP mit Bombykol trat ein dritter, intensiver Peak bei 16116 Da im ESI-Massenspektrum auf (Abbildung 1b). Die Masse war reproduzierbar 238 Da (= Molekülmasse von Bombykol) höher als die von BmPBP und wurde dem nichtkovalenten BmPBP-Bombykol-Komplex [BmPBP+Bombykol] zugeordnet. Mit Bombykol in geringeren molaren Überschüssen (der geringste gemessene molare Bombykolüberschuss war fünffach) wurden die gleichen Ergebnisse erhalten.

Abbildung 2 zeigt die Auswirkungen der Änderung der Elektrospray-Cone-Spannung V , der Trocknungsgas-Temperatur T und des pH-Wertes des Sprühpuffers auf das Verhält-

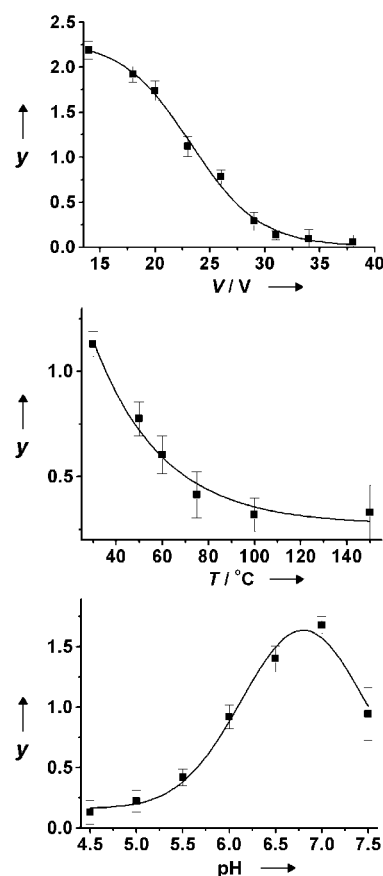


Abbildung 2. Auswirkungen der Elektrospray-Quellenparameter (Cone-Spannung V , Trocknungsgas-Temperatur T und pH-Wert des Sprühpuffers) auf die Stabilität des BmPBP-Bombykol-Komplexes (y = Verhältnis des BmPBP-Bombykol-Komplexes zum freien BmPBP).^[12] Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus fünf Injektionen (die Standardabweichung ist jeweils als Balken dargestellt).

nis des BmPBP-Bombykol-Komplexes zu freiem BmPBP. Die Elektrospray-Cone-Spannung, die direkt die Beschleunigung der Ionen durch die Quelle bei atmosphärischem Druck in das Hochvakuum des Massenspektrometers bestimmt, erwies sich als ein kritischer Parameter bei der Detektion des nichtkovalenten Komplexes. Aufgrund von Kollisionsprozessen bei atmosphärischem Druck kann bei einer Cone-Spannung von über 30 V nur sehr wenig des BmPBP-Bombykol-Komplexes beobachtet werden. Die Temperatur des Trocknungsgases

(Stickstoff), welches benötigt wird, um die Elektrospray-Lösungsmitteltropfen zu verdampfen, hatte ebenso einen Einfluss auf die Stabilität des Komplexes. Temperaturen über 50 °C führten, vermutlich wegen thermischer Denaturierung des Proteins, zu einem rapiden Abfall des Verhältnisses von gebundenem zu freiem BmPBP. Bei pH-Werten des Sprüh-puffers zwischen pH 6.5 und 7.0 trat ein deutliches Optimum auf. Die erhebliche Abnahme an intaktem BmPBP-Bombykol-Komplex bei pH-Werten kleiner als 6.0 stimmt mit dem beobachteten Verlust der starren Tertiärstruktur des Bindeproteins bei niedrigen pH-Werten überein.^[13]

Eine sehr nützliche Anwendung dieser Methode besteht in der Untersuchung der Spezifität von Pheromonbindeproteinen (sowie olfaktorischen Rezeptorproteinen im Allgemeinen). Abbildung 3 zeigt, dass BmPBP auch Liganden bindet, die strukturverwandt zu Bombykol sind. Während

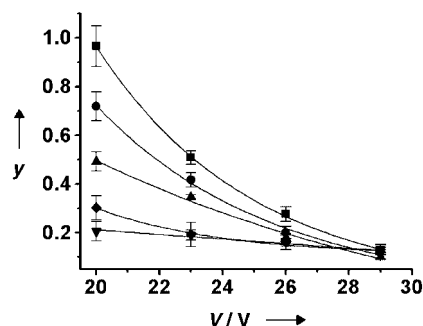


Abbildung 3. Vergleich der Affinität von BmPBP zu einer Auswahl von Liganden: ■ = Bombykol; ● = (11E)-Hexadec-11-en-1-ol; ▲ = (11Z)-Hexadec-11-en-1-ol; ▼ = 3-Phenylpropan-1-ol; ◆ = Kontrolle^[14] (y = Verhältnis des BmPBP-Bombykol-Komplexes zu freiem BmPBP, V = Cone-Spannung). Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus 6–8 Injektionen (die Standardabweichung ist jeweils als Balken dargestellt).

(11E)- und (11Z)-Hexadec-11-en-1-ol eine hohe Affinität zu BmPBP aufweisen, ergaben sich keine Hinweise für die Bildung eines Komplexes mit dem strukturell nicht verwandten Alkohol 3-Phenylpropan-1-ol.^[14] Es war darüber hinaus nicht nur möglich, anhand der Komplexbildungseigenschaften den Monoalkohol von Bombykol zu unterscheiden, sondern auch mit den geometrischen Isomeren von 11-Hexadecenol konnten signifikant unterschiedliche [BmPBP + Ligand]:BmPBP-Verhältnisse erhalten werden. Abbildung 3 zeigt, dass das (11E)-Monoen besser an BmPBP bindet als das (11Z)-Isomer. Interessanterweise nimmt die C11-C12-Bindung von gebundenem Bombykol den Kristallstrukturdaten zufolge eine *transoide* Konformation ein.^[7]

Die ESI-MS-Analyse unter nichtdenaturierenden Bedingungen ist ein leistungsfähiges Instrument, um die Spezifität der Wechselwirkungen zwischen Duftstoffmolekülen und Bindeproteinen einzuschätzen. Diese Methode soll in weiten Arbeiten zu einem kompetitiven Bindungsassay weiterentwickelt werden.

Eingegangen am 9. Mai 2000 [Z15100]

[1] A. Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm, E. Hecker, *Z. Naturforsch. B* **1959**, *14*, 283–284.

[2] a) L. B. Bjostad, W. L. Roelofs, *Insect. Biochem.* **1984**, *14*, 275–278; b) T. Ando, R. Hase, R. Arima, M. Uchiyama, *Agric. Biol. Chem.*

1988, *52*, 473–478; c) A. Svatoš, B. Kalinova, W. Boland, *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *29*, 225–232; d) H. Nagasawa, H. Kuniyoshi, R. Arima, T. Kawano, T. Ando, A. Suzuki, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1994**, *25*, 261–270, zit. Lit.; e) B. S. Hansson, *Experientia* **1995**, *51*, 1003–1027, zit. Lit.; f) K. E. Kaissling, *Chem. Senses* **1996**, *21*, 257–268, zit. Lit.; g) G. Kasang, M. Nicholls, L. Vonproff, *Experientia* **1989**, *45*, 81–87.

[3] a) R. G. Vogt, L. M. Riddiford, *Nature* **1981**, *293*, 161–163; b) P. Pelosi, R. Maida, *Comp. Biochem. Physiol. B* **1995**, *111*, 503–514.

[4] J. Krieger, H. Breer, *Science* **1999**, *286*, 720–723.

[5] J. Krieger, E. von Nickisch-Rosenegk, M. Mameli, P. Pelosi, H. Breer, *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **1996**, *26*, 297–307.

[6] a) W. S. Leal, L. Nikonova, G. Peng, *FEBS Lett.* **1999**, *464*, 85–90; b) A. Scaloni, M. Monti, S. Angeli, P. Pelosi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *266*, 386–391.

[7] B. H. Sandler, L. Nikonova, W. S. Leal, J. Clardy, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 143–151.

[8] M. Przybylski, M. O. Glocker, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 878–899; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 806–826, zit. Lit.

[9] M. Jaquinod, N. Potier, K. Klarskov, J. M. Reymann, O. Sorokine, S. Kieffer, P. Barth, V. Andriantomanga, J. F. Biellmann, A. van Dorselaer, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 893–903.

[10] B. Ganem, Y.-T. Li, J. D. Henion, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7818–7819.

[11] N. Potier, P. Barth, D. Trisch, J. F. Biellmann, A. van Dorselaer, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 274–282.

[12] Die Massenspektren wurden an einem Micromass-Quattro-II-Massenspektrometer, ausgestattet mit einer Z-Spray-Elektrosprayquelle (Micromass, Manchester, Großbritannien), aufgenommen. Als Sprüh-puffer wurde NH_4OAc (2.5 mM, pH 7.0, soweit nicht anders angegeben) mit einer Fließgeschwindigkeit von $5 \mu\text{L min}^{-1}$ verwendet. Die BmPBP-Lösung (5 mg mL^{-1} , $2 \mu\text{L}$, in 2.5 mM NH_4OAc , pH 7.0) wurde mit Hilfe eines Injektionsventils direkt dem Sprühpuffer zugesetzt. Die Cone-Spannung betrug 20 V und die Trocknungsgas-Temperatur 30 °C, soweit nicht anders angegeben. Rekombinantes BmPBP wurde wie bereits beschrieben synthetisiert und aufgereinigt. In Abwandlung zur beschriebenen Methode wurde auf eine Hydroxylapatitsäulenreinigung verzichtet und eine Dialyse gegen 10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(Tris)-Puffer (pH 8.0) mit Hilfe einer Slide-A-Lyzer-Kassette (Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt.^[5, 13] BmPBP wurde unter Verwendung eines Vivaspin-Konzentrators (Molekulargewichts-Cut-off 5000 Da; Vivascience, Lincoln, Großbritannien) angereichert und in den NH_4OAc -Puffer (siehe oben) überführt. Die Daten wurden unter Verwendung des Programms MaxEnt, einem Maximum-Entropy-Algorithmus aus dem Softwarepaket Masslynx 3.1 (Micromass), ausgewertet.

[13] H. Wojtasek, W. S. Leal, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30950–30956.

[14] Die BmPBP-Lösung^[12] wurde mit dem jeweiligen Liganden im 50-fachen molaren Überschuss ca. 14 h bei 4 °C inkubiert. Die Alkohole wurden als 0.6 M Lösungen in Ethanol zur gepufferten BmPBP-Lösung gegeben. Als Kontrolle diente BmPBP ohne Ligand, die sich hier ergebenden Werte ungleich Null sind eine Folge des Untergrundrauschens.