

# TOPP – eine Aminosäure mit Nitroxid-Spinmarkierungen für EPR-Abstandsmessungen\*\*

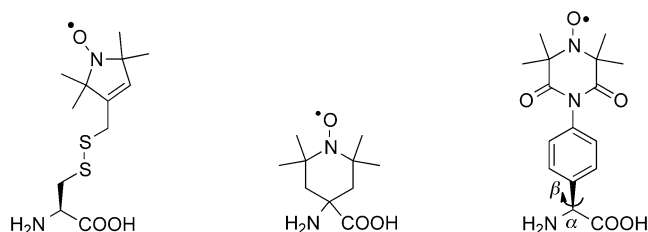
Sven Stoller, Giuseppe Sicoli,\* Tatiana Y. Baranova, Marina Bennati und Ulf Diederichsen\*

Die Elektronenspinresonanz(EPR)-Spektroskopie ist eine wohletablierte Methode für Strukturuntersuchungen an Biomolekülen.<sup>[1]</sup> Insbesondere im letzten Jahrzehnt wurden Abstandsmessungen zwischen Methanthiosulfonat-Spinmarkierungen (MTSSL), die über Cystein an Proteine oder Peptide gebunden sind, erfolgreich eingeführt.<sup>[2]</sup> Vor kurzem wurde über Abstandsbestimmungen hinaus auch über die Ermittlung der relativen Orientierung starr orientierter Aminosäureradikale in Proteinen durch gepulste Elektron-Elektron-Doppelresonanzspektroskopie (PELDOR oder DEER) berichtet.<sup>[3]</sup> Die Bestimmung der relativen Orientierung topologischer Einheiten zusammen mit dem intermolekularen Abstand erfordert konformativ eingeschränkte Spinmarkierungen.<sup>[4]</sup> Da das MTSSL-modifizierte Cystein im Linker zwischen Rückgrat und Nitroxid über erhebliche Rotationsfreiheitsgrade der Einfachbindungen verfügt, wird die Aminosäure 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-amino-4-carbonyl (TOAC) oftmals als konformativ definierte Alternative in Peptiden verwendet (Abbildung 1). TOAC enthält das Nitroxid-Radikal eingebaut im Sechsring, der wiederum den  $\alpha$ -Kohlenstoff des Peptidrückgrats einschließt,

wodurch Abstandsmessungen mit einer höheren Genauigkeit möglich werden.<sup>[5]</sup> Allerdings beeinflusst TOAC als achirale Aminosäure mit einem tetrasubstituierten  $\alpha$ -Kohlenstoff die Sekundärstruktur des Peptids.<sup>[6]</sup> Zudem wird die Bestimmung der relativen Orientierung von zwei spinmarkierten Einheiten durch das Vorkommen verschiedener TOAC-Konformationen erschwert.<sup>[7]</sup> Für Abstandsmessungen und Untersuchungen der relativen Orientierung von Peptid-Sekundärstrukturen oder Peptid-Domänen ist daher eine Spinmarkierung erforderlich, die als reguläre, chirale  $\alpha$ -L-Aminosäure in Peptide eingebaut werden kann und eine konformative Stabilität mitbringt, durch welche die N-O-Bindung des Nitroxid-Radikals räumlich definiert positioniert wird. Für den Entwurf einer neuen Spinmarkierung mit einer definierten Orientierung des Nitroxids muss daher mindestens die Ca-C $\beta$ -Bindung als Rotationsachse einer chiralen  $\alpha$ -Aminosäure berücksichtigt werden. Für die Abstandsinterpretation ist es zudem vorteilhaft, die Nitroxid-Bindung als Verlängerung der Ca-C $\beta$ -Achse anzuordnen.

Wir berichten über den Entwurf und die Synthese der chiralen Aminosäure 4-(3,3,5,5-Tetramethyl-2,6-dioxo-4-oxylpiperazin-1-yl)-L-phenylglycine (TOPP), die Nitroxid und Ca-C $\beta$ -Bindungen auf einer gemeinsamen Achse angeordnet enthält (Abbildung 1). Als ein Anwendungsbeispiel wird ein Alanin-reiches Peptid mit TOPP doppelt markiert und der Abstand zwischen den TOPP-Markierungen mittels EPR-Spektroskopie bestimmt. Die spektroskopischen Daten werden mit denen verglichen, die mit dem gleichen, jedoch konventionell MTSSL-markierten Peptid erhalten werden. Der Entwurf der TOPP-Spinmarkierung beruht auf einem planaren, direkt mit Ca verbundenen Phenylring und *para*-Substitution mit einem Dioxopiperazin, das durch die Amid-Funktionalitäten und die geminalen Methylgruppen ebenfalls nahezu planar gehalten wird. Somit wird eine durchgehende Achse vom Ca zur Nitroxid-Bindung erwartet.<sup>[8]</sup> Die fast kollineare Ausrichtung des Nitroxids und der Ca-C $\beta$ -Bindung wurde mithilfe von DFT-Rechnungen des *N*-Acetylmethylamid-Derivats von TOPP bestätigt (siehe Hintergrundinformationen).

Der Schlüsselschritt in der Synthese der die Spinmarkierung tragenden Aminosäure Fmoc-TOPP-OH (**1**) war die Kupfer(II)-katalysierte Chan-Lam-Kupplung von 3,3,5,5-Tetramethylpiperazin-2,6-dion (**2**) mit Boronsäure **3** (Schema 1). Imid **2** wurde in drei Stufen gemäß Literaturvorgaben erhalten.<sup>[9]</sup> Ausgehend von Aceton wurde 2-Amino-2-methylpropionitril hergestellt und unter reduziertem Druck zum Biscyanoamin **4** dimerisiert, welches nach Cyclisierung Imid **2** für die Chan-Lam-Kupplung ergab. Die Synthese der Aminosäure Fmoc-TOPP-OH (**1**) basiert auf der Funktionalisierung des L-Hydroxyphenylglycins (**5**). Mit der Einfüh-



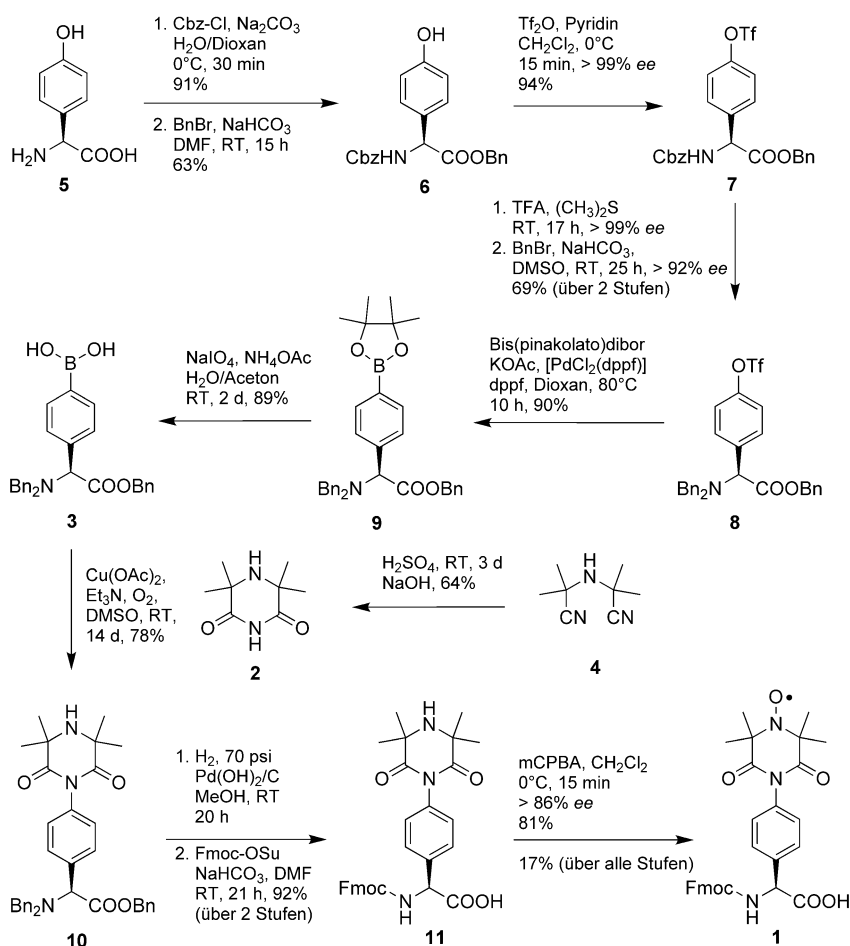
**Abbildung 1.** Spinmarkierungen für EPR-spektroskopische Untersuchungen von Proteinstrukturen: MTSSL-modifiziertes Cystein (links), TOAC (Mitte) und TOPP (rechts).

[\*] Dr. S. Stoller, Dr. T. Y. Baranova, Prof. Dr. M. Bennati, Prof. Dr. U. Diederichsen  
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie  
Georg-August-Universität Göttingen  
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)  
E-Mail: [udieder@gwdg.de](mailto:udieder@gwdg.de)  
Homepage: <http://www.diederichsen.chemie.uni-goettingen.de>

Dr. G. Sicoli, Prof. Dr. M. Bennati  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)  
E-Mail: [Giuseppe.Sicoli@mpi-bpc.mpg.de](mailto:Giuseppe.Sicoli@mpi-bpc.mpg.de)

[\*\*] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für großzügige Unterstützung im Rahmen des SFB 803.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201103315> zu finden.



**Schema 1.** Synthese von Fmoc-TOPP-OH (**1**). TFA = Trifluoressigsäure, DMSO = Dimethylsulfoxid, dppf = 1,1'-Bis(diphenylphosphanyl)ferrocen, Fmoc-OSu = *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)succinimid.

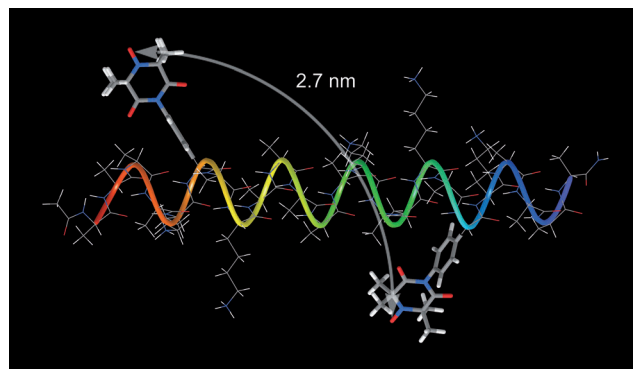
Der Carboxybenzyl (Cbz)- und Benzyl (Bn)-Schutzgruppen war das Phenylglycin-Derivat **6** anfällig für Racemisierung (Schema 1), sodass eine sorgfältige Anpassung der Reaktionsbedingungen während der gesamten Synthese erforderlich war. Die Behandlung von Verbindung **6** mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid lieferte das enantiomerenreine Aryltriflat **7**. Um Racemisierung in den folgenden Stufen zu vermeiden, wurde die *N*-Cbz-Gruppe durch zwei *N*-Bn-Schutzgruppen ersetzt. Das resultierende Aryltriflat **8** wurde durch Borylierung unter Miyaura-Bedingungen in den Arylborsäureester **9** überführt. Oxidation von Verbindung **9** mit NaIO<sub>4</sub> führte zur freien Boronsäure **3**, die direkt mit 3,3,5,5-Tetramethylpiperazin-2,6-dion (**2**) in einer Kupfervermittelten Chan-Lam-Kupplung zum Aminosäurerüst **10** umgesetzt wurde. Die Entschützung der Benzylgruppen wurde hydrogenolytisch bei 70 psi mithilfe des Pearlman-Katalysators erreicht. Aufbringen der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe gelang durch Umsetzung des Rohprodukts, sodass Aminosäure **11** mit einer guten optischen Reinheit erhalten wurde (*ee* > 86%, bestimmt durch Herstellung und HPLC-Analyse der durch Kupplung mit harzgebundenem D-Alanin generierten Dipeptide). Oxidation mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) lieferte die

Zielverbindung **1** in einer Gesamtausbeute von 17% über 11 Stufen.

Für die Fmoc-Festphasenpeptidsynthese (SPPS) werden ebenfalls Bedingungen benötigt, die eine Racemisierung während der Kupplung des aktivierten Phenylglycin-Derivats **1** vermeiden, sodass das spinmarkierte Fmoc-TOPP-OH (**1**) abweichend von der ansonsten verwendeten HBTU/HOBt-Aktivierung mit 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-on (DEPBT) und NaHCO<sub>3</sub> in THF gekuppelt wurde. Abspaltung vom Harz und Entschützung mit TFA/Triisopropylsilan (TIS)/H<sub>2</sub>O (90:5:5) führten zum entsprechenden Peptid, das die Spinmarkierung TOPP in seiner Hydroxylamin-Form enthielt. Um die Nitroxidgruppe wieder herzustellen, wurde das Peptid vor der HPLC-Reinigung mit Cu(OAc)<sub>2</sub> behandelt. Die Oligomere wurden mittels hochauflösender ESI-Massenspektrometrie, Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie und EPR-Messungen charakterisiert.

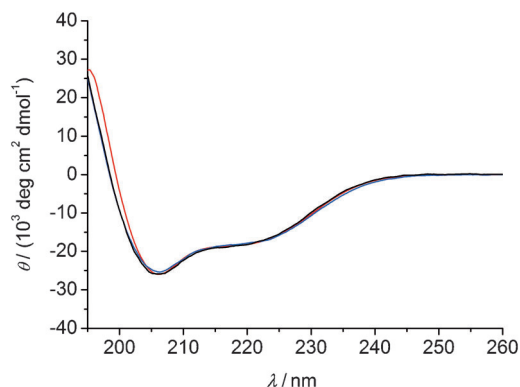
Da Alanin-reiche Peptide einen hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil aufweisen, der sogar bei tieferen Temperaturen zunimmt,<sup>[10]</sup> wurde das Alanin-reiche, zwei TOPP-Spinmarkierungen enthaltende Peptid **P1** (Ac-AAAAK-TOPP-AKA-AAAAKAAKA-TOPP-KAAAA-NH<sub>2</sub>) als Modellsystem für die EPR-Abstandsmessungen verwendet (Abbildung 2). Das entsprechende Peptid **P2** (Ac-AAAAK-Y-AKAAAAKAAKA-Y-KAAAA-NH<sub>2</sub>), in dem die TOPP-Spin-

markierungen durch Tyrosin ersetzt sind, wurde als Referenz hergestellt. Schließlich wurde ein drittes Peptid **P3** (Ac-AAAAK-MTSSL-AKAAAAKAAKA-MTSSL-KAAAA-NH<sub>2</sub>) synthetisiert, das anstelle der Aminosäure TOPP Cystein zur Anbringung der MTSSL-Spinmarkierung enthält.



**Abbildung 2.** Modell der  $\alpha$ -helikalen Struktur des Peptids **P1** (Maestro, Version 9.1, Schrödinger, LLC, New York, 2010).

Der  $\alpha$ -helikale Anteil der Konformation des zweifach TOPP-markierten Peptids **P1** wurde mittels CD-Spektroskopie im Vergleich zu den Peptid-Analoga **P2** und **P3** charakterisiert. Das Minimum bei 208 nm und die Schulter bei 222 nm sind typische Merkmale für eine  $\alpha$ -helikale Peptid-Konformation.<sup>[11]</sup> Angesichts recht ähnlicher CD-Spektren in Trifluorethanol (TFE) kann für alle Peptide von der erwarteten Bildung einer  $\alpha$ -Helix ausgegangen werden (Abbildung 3). Die TOPP-Spinmarkierung kann demnach ohne

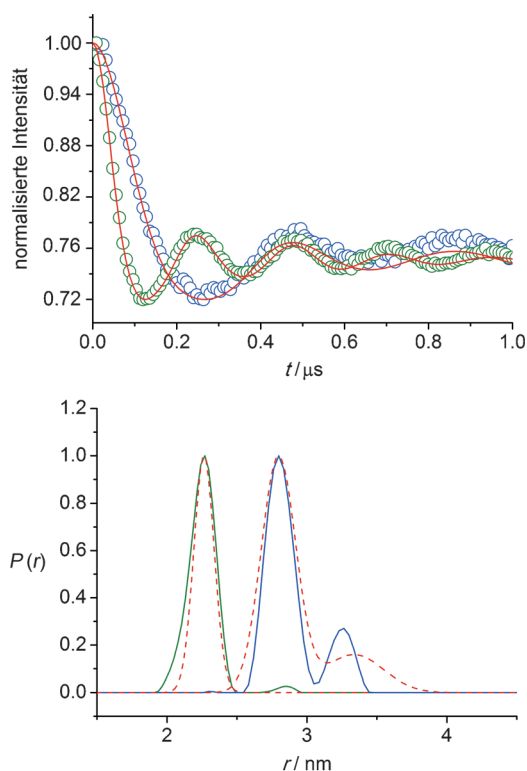


**Abbildung 3.** CD-Spektren der Peptide **P1** (blau), **P2** (rot) und **P3** (schwarz) in TFE bei 20 °C.

konformative Beeinträchtigung der Helixkonformation und ohne jegliches Anzeichen für Epimerisierung der TOPP-Aminosäuren während der Oligomersynthese in Peptidhelices eingebaut werden.

Da der  $\alpha$ -helikale Anteil des Alanin-reichen Peptids bei sinkender Temperatur steigt, wurde das TOPP-markierte Peptid **P1** bei unterschiedlichen Temperaturen zwischen 20 und –40 °C mittels Continuous-Wave (CW)-EPR-Spektroskopie untersucht.<sup>[10,11]</sup> Peptid **P1** wurde in TFE/Glycerin (90:10) gelöst, um ein kryogenes Medium zu gewährleisten. Aus den CW-EPR-Spektren lässt sich ableiten, dass ein Absenken der Temperatur zu einer verringerten Beweglichkeit der Spinmarkierungen führt, welche neben der Viskositätszunahme auch auf den Anstieg des  $\alpha$ -helikalen Anteils zurückgeführt werden kann; dies belegt ein Kontrollexperiment, das ausschließlich mit TOPP im gleichen Medium durchgeführt wurde (Hintergrundinformationen).

Peptid **P1** wurde sowohl in TFE/EtOH/H<sub>2</sub>O als auch in TFE/EtOH/MeOH gelöst und langsam auf –80 °C gekühlt, um den helikalen Anteil zu erhöhen, bevor es in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Analoge Ergebnisse wurden auch in anderen Lösungsmittelmischungen erhalten (Hintergrundinformationen). EPR-Abstandsmessungen im X-Band (9 GHz) zeigten Zeitspuren mit klaren dipolaren Oszillationen, die durch mehrere Perioden charakterisiert waren (Abbildung 4, blaue Kurve). Weiterhin wurden in den Spektren für bestimmte Pump- und Detektionsfrequenzen Abweichungen vom typischen Pake-Muster beobachtet (Hintergrundinformationen); dies kann als Hinweis auf einen durch die Starrheit der Spinmarkierung bedingten Beitrag der Orientierungsselektion gewertet werden.



**Abbildung 4.** Oben: Zeitabhängige DEER-Signale des doppelt markierten Peptids **P1** in TFE/EtOH/MeOH (40:40:20). Die Datenpunkte (blaue und grüne Kreise) repräsentieren die experimentellen Daten nach Subtraktion einer Basislinie, während die roten Linien der Zeitdomänen-Simulation der Daten mit dem Programm DeerAnalysis2011 entsprechen.<sup>[13]</sup> Unten: Angleiche der Abstandsverteilungen erhalten durch Tikhonov-Regularisierung (grüne und blaue Kurven). Die gepunkteten roten Kurven stellen Angleiche mit jeweils einer Gauß-Kurve für Peptid **P3** und zwei Gauß-Kurven für Peptid **P1** dar. Das DEER-Experiment wurde mit einem Puls-EPR-Spektrometer (Bruker ELEXYSIS580) bei 50 K durchgeführt; Pulslängen:  $\pi/2 - \pi = 16\text{--}32$  ns;  $\pi_{\text{ELDOR}} = 36$  ns; Mittelungen pro Punkt = 50; Wartezeit nach Pulssequenz = 5 ms; Durchläufe = 249; Messzeit = 12 h.

Um Orientierungsselektion zu unterdrücken und eine Abstandsverteilung zu bekommen, wurde ein Experiment zur Mittelung der Orientierungsselektion bei 11 Feldpositionen durchgeführt. Die gemittelten Spuren (Hintergrundinformationen) zeigten jedoch keinen wesentlichen Unterschied zum Einzelerperiment, welches mit dem Standard-PELDOR-Setup durchgeführt wurde (Abbildung 4). Die Analyse der Spuren ergab eine schmale, bei 2.8 nm zentrierte Abstandsverteilung und eine Breite von  $\Delta r = 0.26$  nm. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem für den Abstand zwischen zwei starren Spinmarkierungen in einem Peptid mit  $\alpha$ -helikaler Konformation ( $\phi = -52^\circ$ ,  $\psi = -53^\circ$ ) abgeschätzten Wert von 2.7 nm (Abbildung 2). Ein zweiter Peak bei 3.15 nm deutet auf eine möglicherweise in kleinerem Umfang auftretende heterogene Population von Strukturen, die ihren Ursprung vermutlich in einer weniger gut definierten Peptidstruktur hat.

Eine vergleichbare Studie an Peptid **P3** führte zu einem Spin-Spin-Abstand von 2.26 nm (Abbildung 4, grüne Kurve). Für diese Probe ergab sich eine ebenso schmale Abstands-

verteilung, wie sie mit der starren Spinmarkierung erhalten wurde. Dieses Ergebnis stellt eine Ausnahme dar im Hinblick auf die meisten literaturbekannten Fälle, in denen gewöhnlich mit der MTSSL-Markierung breite Abstandsverteilungen beobachtet werden.<sup>[12]</sup> Dennoch ist der beobachtete Abstand zwischen den MTSSL-Spinmarkierungen wesentlich kleiner als zwischen den TOPP-Markierungen; dies ist wahrscheinlich begründet in einer spezifischen, wenn auch unbekannten Konformation der flexiblen Spinmarkierungen. Eine einfache molekulare Modellierung zeigt plausible Konformationen, die in Übereinstimmung mit dem beobachteten Abstand sind (Hintergrundinformationen); eine eindeutige Zuordnung des Spin-Spin-Abstands von 2.26 nm zu einer Vorzugskonformation würde anspruchsvollere Modellierungen erfordern. Damit besteht der wesentliche Vorteil bei Verwendung der TOPP-Spinmarkierung im Vergleich zu MTSSL in der einfachen Zuordnung von Abständen basierend auf der starren und leicht vorhersagbaren Struktur der Spinmarkierung.

Zusammenfassend haben wir die Synthese der neuen Aminosäure TOPP vorgestellt, die als Seitenkette eine starre Nitroxid-Spinmarkierung enthält. Von dieser TOPP-Spinmarkierung gehen keine Beeinträchtigungen der Sekundärstruktur aus, sodass ein vielversprechendes Werkzeug für die Strukturuntersuchung von Peptiden und Proteinen zur Verfügung steht. Der Entwurf der TOPP-Aminosäure basiert auf einer Ausrichtung des Nitroxids und der  $\alpha$ -C $\beta$ -Bindung auf einer Achse; zudem galt es für die Aminosäure- und Oligomersynthese Bedingungen zu finden, die Racemisierung an  $\alpha$  unterdrücken. Exemplarisch wurde die direkte Bestimmung von TOPP-Interspinabständen mittels gepulster EPR-Spektroskopie vorgenommen und mit der üblicherweise verwendeten MTSSL-Spinmarkierung verglichen, die aufgrund mehrdeutiger Ergebnisse abweichende Resultate liefert. Weiterhin sollte die reduzierte konformative Freiheit der TOPP-Spinmarkierung von Vorteil sein, um z. B. nach Einbau in interagierende Transmembranpeptide Abstands- und Orientierungsdaten der Peptide in atomarer Auflösung zu erreichen.

Eingegangen am 14. Mai 2011

Online veröffentlicht am 5. September 2011

**Stichwörter:** Abstandsmessungen · EPR-Spektroskopie · Nitroxidradikal · Peptidkonformationen · Spinmarkierungen

- [1] a) M. A. Hemminga, L. Berliner, *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 27, Springer, Heidelberg, **2007**; b) G. Hanson, L. Berliner, *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 28, Springer, Heidelberg, **2009**; c) L. Berliner, S. S. Eaton, G. R. Eaton, R. Gareth, *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 19, Springer, Heidelberg, **2000**.
- [2] a) O. Schiemann, T. F. Prisner, *Q. Rev. Biophys.* **2007**, *40*, 1–37; b) G. Jeschke, Y. Polyhach, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1895–1913; c) G. E. Fanucci, D. S. Cafiso, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 644–653; d) A. D. Milov, A. G. Maryasov, Y. D. Tsvetkov, J. Raap, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *303*, 135–143.
- [3] a) V. P. Denysenkov, D. Biglino, W. Lubitz, T. F. Prisner, M. Bennati, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1244–1247; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1224–1227; b) V. P. Denysenkov, T. F. Prisner, J. Stubbe, M. Bennati, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13386–13390; c) G. Sicoli, T. Argirevic, J. Stubbe, I. Tkach, M. Bennati, *Appl. Magn. Reson.* **2010**, *37*, 539–548.
- [4] a) N. Barhate, P. Cekan, A. P. Massey, S. T. Sigurdsson, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2709–2712; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2655–2658; b) O. Schiemann, P. Cekan, D. Margraf, T. F. Prisner, S. T. Sigurdsson, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3342–3345; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3292–3295.
- [5] C. B. Karim, T. L. Kirby, Z. Zhang, Y. Nesmelov, D. D. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14437–14442.
- [6] J. C. McNulty, D. A. Thompson, M. R. Carrasco, G. L. Millhauser, *FEBS Lett.* **2002**, *529*, 243–248.
- [7] a) M. Crisma, J. R. Deschamps, C. George, J. L. Flippen-Anderson, B. Kaptein, Q. B. Broxterman, A. Moretto, S. Oancea, M. Jost, F. Formaggio, C. Toniolo, *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 564–579; b) M. D'Amore, R. Improta, V. Barone, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 6264–6269; c) D. March, *J. Magn. Reson.* **2006**, *180*, 305–310.
- [8] M. Sajid, G. Jeschke, M. Wiebecke, A. Godt, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12960–12962.
- [9] C. E. Ramey, J. J. Luzzi (Ciba-Geigy AG), US-3920659, **1975**.
- [10] R. J. Moreau, C. R. Schubert, K. A. Nasr, M. Török, J. S. Miller, R. J. Kennedy, D. S. Kemp, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13107–13116.
- [11] P. Wallimann, R. J. Kennedy, J. S. Miller, W. Shalongo, D. S. Kemp, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1203–1220.
- [12] a) G. E. Fanucci, D. Cafiso, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 644–653; b) M. Grote, E. Bordignon, Y. Polyhach, G. Jeschke, H.-J. Steinhoff, E. Schneider, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 2924–2938.
- [13] G. Jeschke, V. Chechik, P. Ionita, A. Godt, H. Zimmermann, J. Banham, C. R. Timmel, D. Hilger, H. Jung, *Appl. Magn. Reson.* **2006**, *30*, 473–498.